



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

**INSTYTUT KATALIZY I FIZYKOCHEMII POWIERZCHNI
im. Jerzego Habera
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

Patrycja Wójcik

**Bakteryjne Δ^1 -dehydrogenazy
3-ketosteroidowe – struktura,
mechanizm reakcji i zastosowanie
w biokatalitycznym odwodornieniu
leków steroidowych**

Praca doktorska

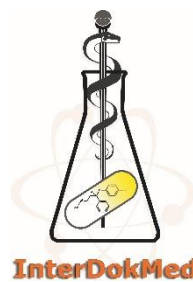
prof. dr hab. Maciej Szaleniec

**Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk**

prof. dr hab. Andrzej Bojarski

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

KRAKÓW 2022



Rozprawa doktorska powstała w trakcie realizacji
Środowiskowych Studiów Doktoranckich
w ramach Projektu nr POWR.03.02.00-00-I013/16,
"Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej" InterDokMed,
realizowanych w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014–2020,
współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego



Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny





Niniejsza rozprawa doktorska została wykonana w ramach projektu OPUS numer 2016/21/B/ST4/03798 „Mechanizm regioselektywnego utleniającego odwodornienia 3-ketosteroidów przez dehydrogenazę Δ^1 -cholest-4-en-3-onu ze *Sterolibacterium denitrificans*” finansowego przez Narodowe Centrum Nauki

Spis treści

Streszczenie w języku polskim	7
Streszczenie w języku angielskim.....	9
Skróty	11
1. Wstęp.....	13
1.1. Δ^1 -Dehydrogenazy 3-ketosteroidowe	14
1.1.1. Pochodzenie i fizjologiczna rola	14
1.1.2. Struktura krystaliczna.....	16
1.1.3. Postulowany mechanizm działania	18
1.1.4. Spektrum substratowe.....	22
1.2. Znaczenie farmakologiczne i otrzymywanie Δ^1 -3-ketosteroidów.....	24
1.2.1. Znaczenie Δ^1 -3-ketosteroidów w przemyśle farmaceutycznym	24
1.2.2. Enzymatyczna synteza Δ^1 -3-ketosteroidów	26
1.3. Wybrane metody badania mechanizmu reakcji enzymatycznych.....	30
1.3.1. Ukierunkowana mutageneza	30
1.3.2. Kinetyka reakcji enzymatycznych.....	33
1.3.3. Kinetyczny efekt izotopowy	38
1.3.4. Kinetyczny efekt lepkości rozpuszczalnika	41
2. Cele pracy.....	45
3. Metodyka badań	46
3.1. Produkcja, oczyszczanie i charakterystyka Δ^1 -KSTD.....	46
3.1.1. Produkcja rekombinowanych enzymów w <i>Escherichia coli</i>	46
3.1.2. Chromatografia powinowactwa	47
3.1.3. Oznaczanie stężenia białka	48
3.1.4. Filtracja żelowa	50
3.1.5. Dynamiczne rozpraszanie światła	52
3.2. Krystalizacja i udokładnianie struktury AcMB.....	52
3.3. Spektrofotometryczny pomiar aktywności Δ^1 -KSTD	53
3.3.1. W stanie stacjonarnym	54
3.3.2. W stanie przedstacjonarnym	54
3.4. Charakterystyka biochemiczna AcMB	55
3.4.1. Optimum temperaturowe AcMB	55
3.4.2. Optimum pH AcMB	55
3.5. Charakterystyka katalityczna Δ^1 -KSTD	58
3.5.1. Kinetyka w stanie stacjonarnymi dla AcMB i akceptorów elektronowych	58
3.5.2. Naturalny akceptor elektronowy	58

3.5.3.	Kinetyka w stanie stacjonarnym dla Δ^1 -KSTD i wybranych steroidów	59
3.6.	Stałe trwałości kompleksu HBC–steroid	60
3.7.	Badanie mechanizmu Δ^1 -dehydrogenacji katalizowanej przez Δ^1 -KSTD	61
3.7.1.	Ukierunkowana mutagenaza AcmB	61
3.7.2.	Kinetyczny efekt izotopowy	63
3.7.3.	Kinetyczny efekt lepkości rozpuszczalnika	65
3.8.	Analiza ilościowa steroidów	65
3.8.1.	W oparciu o HPLC-DAD	65
3.8.2.	W oparciu o LC-MS/MS	68
3.9.	Optymalizacja warunków reakcji Δ^1 -dehydrogenacji	70
3.9.1.	Wpływ zastosowanej frakcji enzymu na przebieg reakcji	70
3.9.2.	Wpływ zastosowanego akceptora elektronowego na przebieg reakcji	70
3.9.3.	Wpływ atmosfery na przebieg reakcji	71
3.9.4.	Warunki syntezy Δ^1 -dehydro-3-ketosteroidów	71
3.9.5.	Oczyszczanie Δ^1 -diosgenonu	73
4.	Wyniki i dyskusja	74
4.1.	Produkcja i oczyszczanie Δ^1 -KSTD	74
4.2.	Charakterystyka strukturalna AcmB	77
4.2.1.	Struktura czwartorzędowa	77
4.2.2.	Struktura krystaliczna	81
4.3.	Charakterystyka biochemiczna AcmB	95
4.3.1.	Optimum temperaturowe i stabilność termiczna	95
4.3.2.	Optimum pH i stabilność zależna od pH przechowywania	96
4.4.	Charakterystyka katalityczna Δ^1 -KSTD	101
4.4.1.	Sztuczne akceptory elektronowe AcmB	101
4.4.2.	Naturalny akceptor elektronowy AcmB	103
4.4.3.	Spektrum substratowe Δ^1 -KSTD	104
4.5.	Mechanizm reakcji katalizowanej przez Δ^1 -KSTD	113
4.5.1.	Rola aminokwasów w centrum aktywnym AcmB	113
4.5.2.	Kolejność wiązania reagentów	115
4.5.3.	Etap limitujący szybkość reakcji dehydrogenacji	116
4.5.4.	Proponowany mechanizm reakcji	122
4.6.	Synteza Δ^1 -dehydro-3-ketosteroidów z wykorzystaniem Δ^1 -KSTD	124
4.6.1.	Optymalizacja warunków Δ^1 -dehydrogenacji	124
4.6.2.	Zwiększanie skali syntezy	127
5.	Podsumowanie	130

6. Literatura.....	133
Dorobek naukowy.....	145

Streszczenie w języku polskim

Δ^1 -Dehydrogenazy 3-ketosteroidowe (Δ^1 -KSTD) to grupa enzymów należących do klasy FAD-zależnych oksydoreduktaz (EC 1.3.99.4), katalizujących kluczowy etap mikrobiologicznego rozkładu steroidów, fitosteroli i cholesterolu. Białka te odpowiadają za regio- i stereoselektywną dehydrogenację 3-ketosteroidów, tj. wprowadzenie wiązania podwójnego pomiędzy węglami C1 i C2 pierścienia A steranu. Głównym przedmiotem zainteresowania niniejszej rozprawy doktorskiej jest Δ^1 -KSTD wyizolowana z fakultatywnie anaerobowej bakterii *Sterolibacterium denitrificans* (AcmB). AcmB jest białkiem zasocjowanym z wewnętrzną błoną komórkową *S. denitrificans*, które *in vitro* tworzy masywne agregaty, o masie przekraczającej 600 kDa. Cechuje je ponadto nietypowo niskie optimum pH katalizowanej reakcji, równe 6,0 (optimum pH większości Δ^1 -KSTD mieści się w zakresie 7–10) oraz szerokie, w porównaniu do innych enzymów tej klasy, spektrum substratowe.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zoptymalizowano proces ekspresji rekombinowanej AcmB w komórkach *Escherichia coli* oraz opracowano proces oczyszczania i deagregacji białka z wykorzystaniem niejonowych detergentów. Przy wykorzystaniu filtracji żelowej oraz dynamicznego rozpraszania światła scharakteryzowano strukturę czwartorzędową AcmB, natomiast z zastosowaniem krystalografii rentgenowskiej rozwiązana została struktura krystaliczna AcmB.

Analiza uzyskanych wyników pozwoliła sformułować hipotezę opisującą mechanizm prowadzący do agregacji enzymu, cechy strukturalne zwiększające jego powinowactwo do C17-rozgałęzionych 3-ketosteroidów oraz wskazać kluczowe aminokwasy, biorące udział w katalizowanej przez AcmB reakcji. Ponadto, aby scharakteryzować AcmB pod względem biochemicznym i wyznaczyć optymalne warunki reakcji dla syntezy 1-dehydro-3-ketosteroidów, określono optimum temperaturowe reakcji dehydrogenacji, termostabilność enzymu, optimum pH zależne i niezależne od obecności sztucznych akceptorów elektronowych oraz stabilność enzymu zależną od pH przechowywania.

W ramach charakterystyki katalitycznej AcmB określono parametry kinetyczne w stanie stacjonarnym dla AcmB i wybranych sztucznych akceptorów elektronowych. Co więcej, by zweryfikować hipotezę zakładającą, iż zdolność do odwodornienia

C17-rozgałęzionych 3-ketosteroidów posiadają tylko nieliczne Δ^1 -KSTD, i zidentyfikować natywny substrat Acmb, wykonano pomiary kinetyczne w stanie stacjonarnym dla Acmb i Δ^1 -KSTD z *Rhodococcus erythropolis* (KSTD1) wobec androst-4-en-3,17-dionu i cholest-4-en-3-onu, w obecności 2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryny jako solubilizatora.

Celem weryfikacji postulowanego w literaturze hipotetycznego mechanizmu reakcji prowadzonej przez Δ^1 -KSTD określono rolę kluczowych aminokwasów w centrum aktywnym badając aktywność homologów Acmb poddanych ukierunkowanej mutagenzie. Ponadto wyznaczono kinetyczny efekt izotopowy (KIE) dla Acmb i KSTD1 w stanie stacjonarnym metodą bezpośrednią i konkurencyjną oraz w stanie przedstacjonarnym z zastosowaniem techniki zatrzymanego przepływu. Poznane wartości KIE oraz kinetycznego efektu lepkości rozpuszczalnika dla KSTD1 pozwoliły wskazać etap limitujący szybkość katalizowanej przez Δ^1 -KSTD reakcji.

Ostatecznie identyfikacja optymalnych warunków reakcji, w tym najefektywniejszej frakcji enzymu oraz optymalnego sztucznego akceptora elektronowego, pozwoliła opracować wydajny proces syntezy Δ^1 -3-ketosteroidów z użyciem Acmb jako katalizatora. Celem tej części pracy było przeprowadzenie syntezy na większą skalę szeregu Δ^1 -3-ketosteroidów o znaczeniu farmakologicznym, w tym Δ^1 -diosgenonu – 3-ketosteroidowej pochodnej saponiny o działaniu biobójczym, przeciwzapalnym i przeciwnowotworowym, której enzymatyczne Δ^1 -odwodornienie nie zostało wcześniej opisane w literaturze.

Streszczenie w języku angielskim

3-Ketosteroid Δ^1 -dehydrogenases (Δ^1 -KSTD) are enzymes belonging to the class of FAD-dependent oxidoreductases (EC 1.3.99.4) that catalyze a key step in the microbial breakdown of ketosteroids, phytosterols and cholesterol. These proteins are responsible for the regio- and stereoselective dehydrogenation of 3-ketosteroids, i.e. the introduction of a double bond between the C1 and C2 atoms of the sterane A-ring. The main object of this PhD thesis is Δ^1 -KSTD isolated from the facultative anaerobic bacteria *Sterolibacterium denitrificans* (AcmB). AcmB is a protein associated with the *S. denitrificans* inner membrane, which *in vitro* forms massive aggregates with a mass above 600 kDa. It also has an unusually low pH optimum that equals 6.0 (the pH optimum of most Δ^1 -KSTD is in the range 7–10) and a broad, compared to other enzymes of this class, substrate spectrum.

As part of this PhD thesis, the process of recombinant AcmB expression in *Escherichia coli* was optimized and the process of protein purification and disaggregation using non-ionic detergents was developed. The quaternary structure of AcmB was characterized using gel filtration and dynamic light scattering, while the crystal structure of AcmB was solved using X-ray crystallography.

The analysis of the obtained results allowed the hypotheses formulation describing the aggregation enzyme mechanism and structural features increasing its affinity to C17-substituted 3-ketosteroids, as well as to indicate the key amino acids involved in the reaction catalyzed by AcmB. Moreover, to characterize AcmB biochemistry and to determine the optimal reaction conditions for the synthesis of 1-dehydro-3-ketosteroids, the temperature optimum of the dehydrogenation reaction, enzyme thermostability, its pH optimum dependent and independent on the artificial electron acceptors presence, and the effect of pH on the enzyme stability were determined.

As part of the catalytic characterization of AcmB, the steady-state kinetic parameters for AcmB and selected artificial electron acceptors were determined. Moreover, to verify the hypothesis suggesting that only a few Δ^1 -KSTD have the ability to dehydrogenate C17-substituted 3-ketosteroids, and to determine the AcmB's native substrate, kinetic studies for AcmB and Δ^1 -KSTD from *Rhodococcus erythropolis* (KSTD1)

were conducted with androst-4-en-3,17-dione and cholest-4-en-3-one, in the presence of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin as a solubilizer.

In order to verify the hypothetical, postulated in the literature mechanism of the Δ^1 -KSTD reaction, the role of key amino acids in the active site of Acmb was determined using site-directed mutagenesis. Moreover, the steady-state analysis of the kinetic isotope effect (KIE) was performed for Acmb and KSTD1 using the direct and competitive method and the pre-steady-state analysis of the KIE was performed using the stopped-flow technique. The KIE studies and the kinetic effect of the solvent viscosity measured for KSTD1 allowed to indicate the rate-limiting step of the reaction catalyzed by Δ^1 -KSTD.

Finally, the identification of the optimal reaction conditions, including the most effective enzyme fraction and the optimal artificial electron acceptor, allowed the development of an efficient, Acmb-catalyzed process for the synthesis of Δ^1 -3-ketosteroids. This part of the work aimed at the large-scale synthesis of the pharmacologically active Δ^1 -3-ketosteroids, including Δ^1 -diosgenone – a 3-ketosteroid saponin derivative, which exhibits biocidal, anti-inflammatory and anticancer properties and which enzymatic Δ^1 -dehydrogenation has not been previously described in the literature.

Skróty

Δ^1 -KSTD	Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowe
1° KIE	pierwszorzędowy kinetyczny efekt izotopowy
2° KIE	drugorzędowy kinetyczny efekt izotopowy
17MT	17-metylotestosteron
AcmB	Δ^1 -dehydrogenaza 3-ketosteroidowa ze <i>Sterolibacterium denitrificans</i> (ang. A noxic c holesterol m etabolism e nzyme B)
ACN	acetonitryl
AD	androst-4-en-3,17-dion
ADD	androst-1,4-dien-3,17-dion
BME	2-merkaptoetanol
BSA	albumina wołowa (ang. B ovine S erum A lbumin)
CD	cyklodekstryny
CV	objętość kolumny (ang. C olumn V olume)
DAD	detektor o matrycy diodowej (ang. D iode- A rray D etection)
DCPIP	2,6-dichloroindofenol
DHT	dihydrotestosteron
DLS	dynamiczne rozpraszanie światła (ang. D ynamic L ight S cattering)
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe
E:P	kompleks enzym–produkt
E:S	kompleks enzym–substrat
E^0	potencjał standardowy redoks
E1cB	dwustopniowy unimolekularny mechanizm eliminacji sprzężonym z zasadą
E2	uzgodniony mechanizm eliminacji bimolekularnej
EGME	2-metoksyetanol
ESI	jonizacja przez rozpylenie w polu elektrycznym (ang. E lectrospray I onization)
FAD	dinukleotyd flawinoadeninowy
FPLC	szybka chromatografia cieczowa białek (ang. F ast P rotein L iquid C hromatography)
GR	rodzina strukturalna reduktazy glutationowej (ang. G lutathione R eductase)
HBC	2-hydroksypropylo- β -cyklodekstryna
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. H igh- P erformance L iquid C hromatography)
IPA	izopropanol
IPTG	izopropyl- β -D-1-tiogalaktopiranozyd
k_{cat}	stała katalityczna
K_D	stała dysocjacji kompleksu E:S
K_i	stała inhibicji

KIE	kinetyczny efekt izotopowy (ang. K inetic I sotope E ffect)
K _m	stała Michaelisa
KSTD1	Δ ¹ -dehydrogenaza 3-ketosteroidowa z <i>Rhodococcus erythropolis</i>
KSVE	kinetyczny efekt lepkości rozpuszczalnika (ang. K inetic S olvent V iscosity E ffect)
LB	pożywka L ennox B roth
LC	chromatografia cieczowa (ang. L iquid C hromatography)
MD	dynamika molekularna (ang. M olecular D ynamics)
MR	podstawienie molekularne (ang. M olecular R eplacement)
MS	spektrometria mas (ang. M ass S pectrometry)
MTD	metandienon, 1-dehydro-17-metylotestosteron
MWCO	odcięcie masy molekularnej (ang. M olecular W eight C ut- O ff)
NMR	magnetyczny rezonans jądrowy (ang. N uclear M agnetic R esonance)
OD	gęstość optyczna (ang. O ptical D ensity)
OHR	reakcja połówkowa utleniania (ang. O xidation H alf- R eaction)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. P olymerase C hain R eaction)
PDB	P rotein D ata B ank
PEG	glikol polietylenowy
PG	progesteron
pI	punkt izoelektryczny
PMS	metosiarczan fenazyny
PMSF	fluorek fenylometylosulfonylu
RHR	reakcja połówkowa redukcji (ang. R eduction H alf- R eaction)
RMSD	średnia kwadratowa odchylenia położenia atomów (ang. R oot M ean S quare D eviation)
rpm	obrotny na minutę (ang. revolutions p er m inute)
SDS	laurylosiarczan sodu
SDS-PAGE	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących
SIM	tryb monitorowania wybranych jonów (ang. S electd I on M onitoring)
TCEP	chlorowodorek tris-(2-karboksyetylo)fosfiny
TE	1-dehydro-dihydrotestosteron
TEV	poteaza wirusa wżerkowej plamistości tytoniu (ang. T obacco E tch V irus P tease)
USD	dolar amerykański
V	szybkość reakcji enzymatycznej
V _{max}	maksymalna szybkość reakcji enzymatycznej
v/v	stężenie procentowe objętościowo/objętościowe
w/v	stężenie procentowe wagowo/objętościowe
WT	dzikiego typu (ang. w ild- t ype)

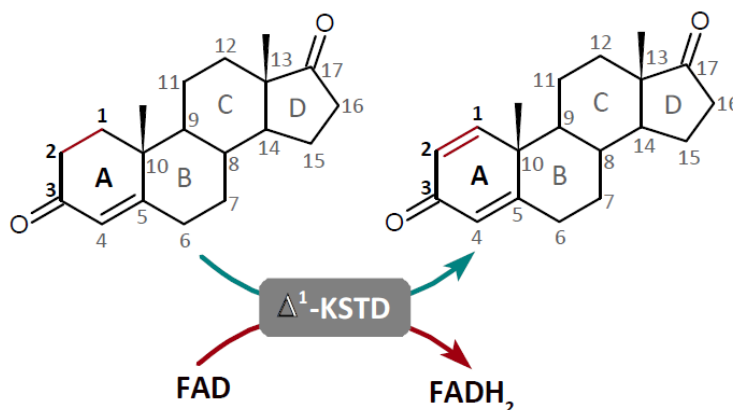
1. Wstęp

Steroidy stanowią liczną grupę związków biologicznie aktywnych, których wspólną cechą strukturalną jest obecność czteropierścieniowego rdzenia zbudowanego z 17 atomów węgla (steranu) [1]. Steroidy są integralną częścią błon komórkowych, ale funkcjonują także jako cząsteczki sygnałowe w szlakach metabolicznych, mechanizmach przetrwania komórek, reprodukcji oraz stanach chorobowych [1,2]. Aby związki te mogły wypełniać tak zróżnicowane biologiczne role, steroidowy rdzeń ulega w komórkach subtelnym modyfikacjom, prowadzącym przede wszystkim do zmiany stopnia utleniania steranu i/lub dołączenia do niego dodatkowych grup funkcyjnych. Obecnie znanych jest ponad 250 naturalnych związków steroidowych, a wiele z nich stanowi prekursorów do produkcji farmaceutyków o działaniu przeciwgrzybicznym, przeciwdrobnoustrojowym, przeciwwirusowym, immunomodulującym, przeciwnowotworowym czy przeciwdrgawkowym [2]. Ponad 300 naturalnych, półsyntetycznych i syntetycznych steroidów zastało zatwierdzonych do użytku klinicznego. Sprawia to, że steroidy, zaraz po antybiotykach, zajmują drugie miejsce na rynku substancji aktywnych, a ich wartość rynkowa przekracza 10 miliardów USD rocznie [1,3]. Co więcej, szacuje się, że w 2025 roku może ona wynieść nawet 17 miliardów USD [4].

Chemiczna synteza steroidowych substancji aktywnych składa się w wielu etapów, które charakteryzuje niska regio- i stereoselektywność oraz niska wydajność. Obniżenie kosztów wieloetapowych syntez farmaceutyków, a także poprawa ich selektywności i wydajności mogą zostać osiągnięte poprzez zastosowanie do ich produkcji enzymów. Do chwili obecnej wiele typowych steroidowych substancji aktywnych produkowanych jest na drodze syntezy chemicznej, jednakże najczęściej obejmuje ona mikrobiologiczne biotransformacje, które dostarczają kluczowych półproduktów lub odpowiadają za funkcjonalizację steroidów na ostatnich etapach syntezy. Przemysłowo istotne modyfikacje steroidów, katalizowane przez enzymy stanowią m.in. utlenianie Baeyera-Villigera, uwodornienie wiązań C=C, dehydrogenacja wiązań C–C oraz konwersja grup hydroksylowych do karbonylowych i odwrotnie [5]. Jedną z wyżej wymienionych reakcji, odwodornienie wiązania C–C, katalizowana przez bakteryjne Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowe (Δ^1 -KSTD), stanowi przedmiot badań niniejszej rozprawy doktorskiej.

1.1. Δ^1 -Dehydrogenazy 3-ketosteroidowe

Δ^1 -Dehydrogenazy 3-ketosteroidowe to grupa enzymów należących do klasy oksydoreduktaz (EC 1.3.99.4), posiadających w swojej strukturze kofaktor – dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD). Białka te katalizują regio- i stereoselektywną dehydrogenację 3-ketosteroidów. Wprowadzenie wiązania podwójnego następuje pomiędzy węglami C1 i C2 pierścienia A steranu (**Rys. 1**) [6].



Rys. 1. Schemat reakcji katalizowanej przez Δ^1 -KSTD na przykładzie androst-4-en-3,17-dionu.

1.1.1. Pochodzenie i fizjologiczna rola

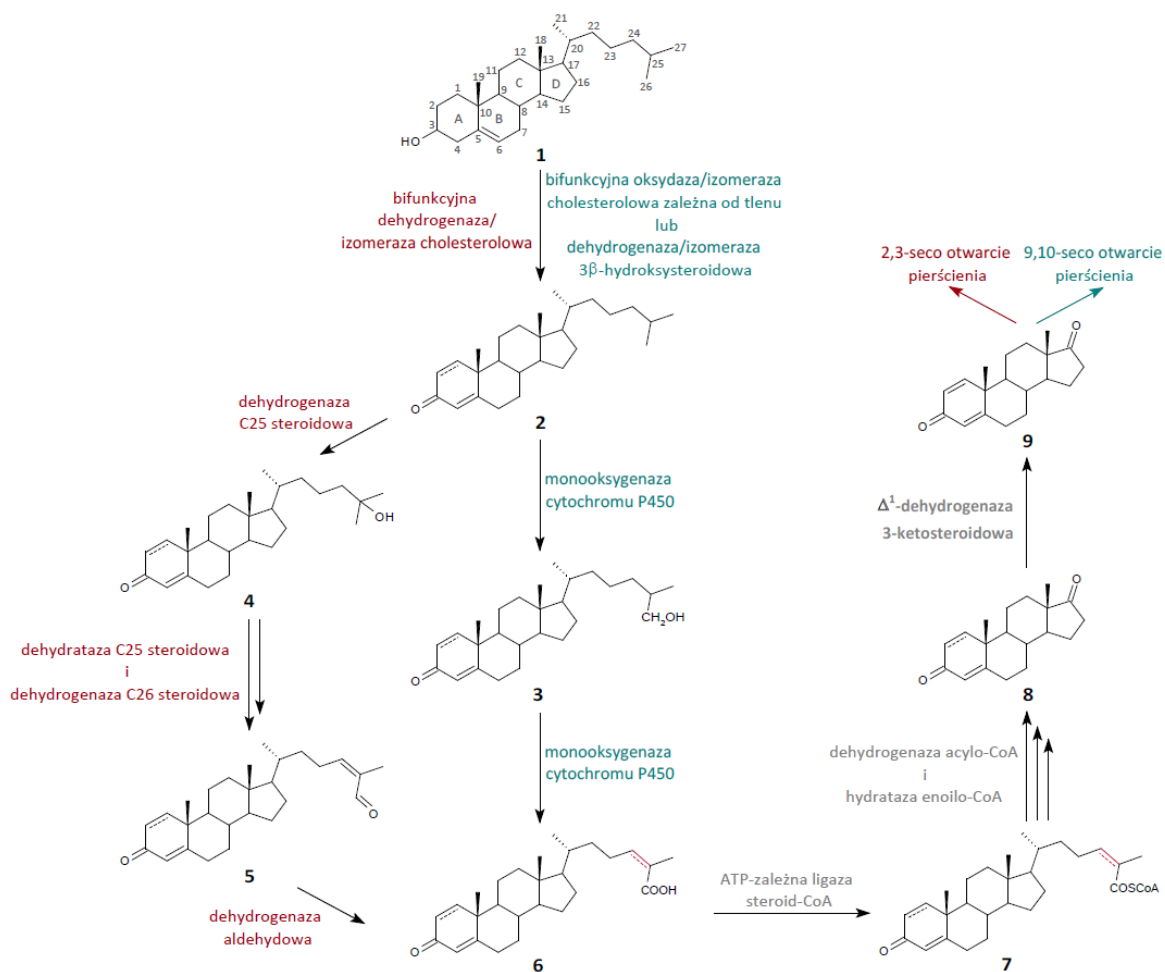
Steroidy są związkami szeroko rozpowszechnionymi w przyrodzie. Stanowią one podstawowy składnik komórek eukariotycznych (bakteryjnych, grzybiczych oraz zwierzęcych), a także roślinnych. Cholesterol jest prekursorem wszystkich zwierzęcych związków steroidowych i tym samym jednym z najczęściej występujących steroli. Stanowi on przede wszystkim składnik budulcowy błon komórkowych, który zapewnia ich przepuszczalności i płynność. Ponadto organizmy wyższe wykorzystują cholesterol jako materiał zapasowy, przekształcając go w estry długocięcych kwasów tłuszczowych [7]. Ze względu na jego powszechną obecność bakterie na drodze ewolucji wykształciły mechanizmy pozwalające na jego wchłanianie i mineralizację, celem pozyskania węgla i energii. Co więcej, mechanizmy te chronią drobnoustroje przed pochłonięciem (fagocytozą) przez komórki układu odpornościowego, jak i zachowaniem drapieżnym ze strony komórek eukariotycznych [8].

Rozkład cholesterolu przez bakterie może odbywać się zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Niezależnie od obecności tlenu, proces degradacji cholesterolu rozpoczyna się rozkładem łańcucha bocznego w pozycji C17, a dopiero w kolejnych etapach następuje rozpad steroidowego rdzenia [6]. Pierwszy etap szlaku

stanowi utlenienie bądź dehydrogenacja cholesterolu (**1**; **Rys. 2**) do cholest-5-en-3-onu, a następnie izomeryzacja do cholest-4-en-3-onu (**2**) [2,9–11]. Rozkład alifatycznego łańcucha cholest-4-en-3-onu w warunkach tlenowych rozpoczyna hydroksylacja na atomie węgla C26 (**3**) lub C27, po czym następuje wprowadzenie grupy karboksylowej w pozycji odpowiednio C26 (**6**) lub C27 [12–14] i aktywacja powstałego produktu pośredniego poprzez utworzenie jego pochodnej koenzymu A (**7**) [15,16]. Kolejno 3 cykle procesu analogicznego do β -oksydacji kwasów tłuszczowych prowadzą do powstania androst-4-en-3,17-dionu (AD; **8**) [17–19]. W warunkach beztlenowych degradacja łańcucha bocznego cholesterolu postępuje analogicznie, z tą różnicą, iż hydroksylacja cholest-4-en-3-onu zachodzi w pozycji C25 (**3**) [9,10,18], a po niej następuje odwodornienie między atomami C24–C25 i ponowna hydroksylacja steroidu do 26-karboksydesmost-1,4-dien-3-onu (**5**) oraz utlenianie do związku **6** [20].

Degradacja steroidowego rdzenia w warunkach tlenowych i beztlenowych inicjowana jest poprzez wprowadzenie wiązania podwójnego pomiędzy atomami C1 i C2 pierścienia A steranu, katalizowane przez Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowe. Jest to kluczowy etap rozpadu jądra steroidu, w wyniku którego powstaje androst-1,4-dien-3,17-dion (ADD; **9**). Kolejno związek **9** ulega dalszej degradacji na drodze 2,3-seco (w warunkach beztlenowych) lub 9,10-seco (w warunkach tlenowych) otwarcia pierścienia [6].

Etap rozkładu cholesterolu, na którym dochodzi do 1,2-dehydrogenacji pierścienia, pozostaje kwestią dyskusyjną w przypadku niektórych bakterii, np. *Sterolibacterium denitrificans*. Początkowo postulowano, iż wprowadzenie wiązania podwójnego w przypadku tego mikroorganizmu następuje na wczesnym etapie degradacji, a substratem natywnym Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowej z *S. denitrificans* (AcmB) może być cholest-4-en-3-on [9,10,21]. Świadczyć miało o tym m.in. wykrycie nowych metabolitów – cholest-1,4-dien-3-onu oraz 25-hydroksycholest-4,1-dien-3-onu [9,10]. Późniejsze badania wykazały, że lokalizacja AcmB oraz jej wysokie powinowactwo do steroidów C19-C21 wskazują na androst-4-en-3,17-dion jako substrat natywny [8,20,22]. Jednakże, ze względu na pewne niejasności w tej kwestii na **Rys. 2** zaprezentowano, iż 1,2-dehydrogenacja może zachodzić tuż po utlenieniu/dehydrogenacji i izomeryzacji cholesterolu.



Rys. 2. Postulowany, bakteryjny szlak rozkładu łańcucha alifatycznego cholesterolu w warunkach **tlenowych i beztlenowych**.

Δ^1 -KSTD wykryto u prawie 500 różnych gatunków grzybów i bakterii, a wiele z nich produkuje kilka izoenzymów, co potwierdza ważną rolę tej grupy białek w funkcjonowaniu drobnoustrojów [6]. Powyższy opis szlaku degradacji cholesterolu oraz kolejne rozdziały dotyczą jedynie bakteryjnych Δ^1 -KSTD, jako że dwie z nich stanowią przedmiot badań tej pracy – AcMB ze *Sterolibacterium denitrificans* oraz Δ^1 -dehydrogenaza 3-ketosteroidowa z *Rhodococcus erythropolis* (KSTD1).

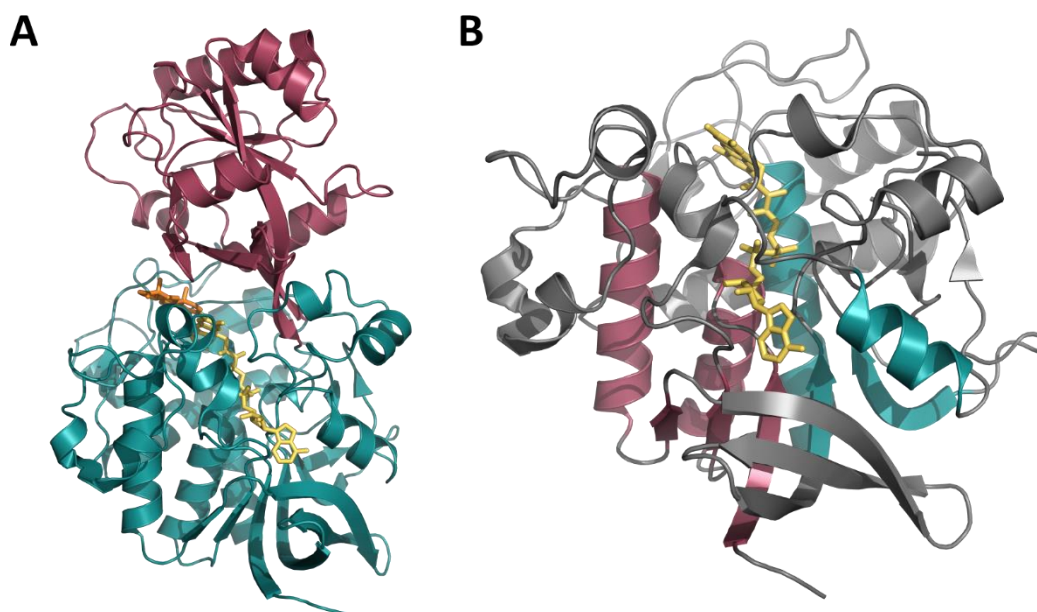
1.1.2. Struktura krystaliczna

Pomimo, iż Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowe stanowią liczną i dobrze scharakteryzowaną pod względem katalitycznym grupę białek enzymatycznych, do tej pory opublikowana została zaledwie jedna struktura krystaliczna Δ^1 -KSTD – KSTD1 z *Rhodococcus erythropolis* (PDB ID: 4C3X, 4C3Y) [23,24].

KSTD1 skryształizowano jako holoenzym oraz w kompleksie z produktem reakcji dehydrogenacji – androst-1,4-dien-3,17-dionem (9). W jednostce asymetrycznej znalazło

się 8 monomerów KSTD1, tworzących dwa niezależne tetramery. Pomimo licznych wiązań wodorowych występujących w strukturze krystalicznej pomiędzy di- i tetramerami białka, filtracja żelowa wykazała, iż w roztworze enzym występuje jako monomer, a wspomniane wiązania wodorowe wydają się biologicznie nieistotne [23,24].

Pojedyncza cząsteczka KSTD1 ma wydłużony kształt i składa się z dwóch domen – wiążącej FAD oraz katalitycznej (**Rys. 3A**). Domena wiążąca FAD z kolei złożona jest z dwóch subdomen (FAD-A i FAD-B), z których subdomena A zawiera charakterystyczny dla białek wiążących nukleotydy motyw Rossmanna [24,25]. W przypadku KSTD1 motyw ten tworzy układ trzech nici β naprzeciwległych do dwóch α -helis po jednej stronie oraz dwóch nici β i dwóch α -helis ułożonych w kolejności α - β - β - α po drugiej stronie (**Rys. 3B**). Pierwsza z opisanych części motywu Rossmanna bardzo przypomina jego podstawową wersję, drugą natomiast odróżnia brak trzeciej nici β . Co więcej, obie części połączone są przez β -meander złożony z trzech nici β , a nie klasycznie przez α -helisę [24].

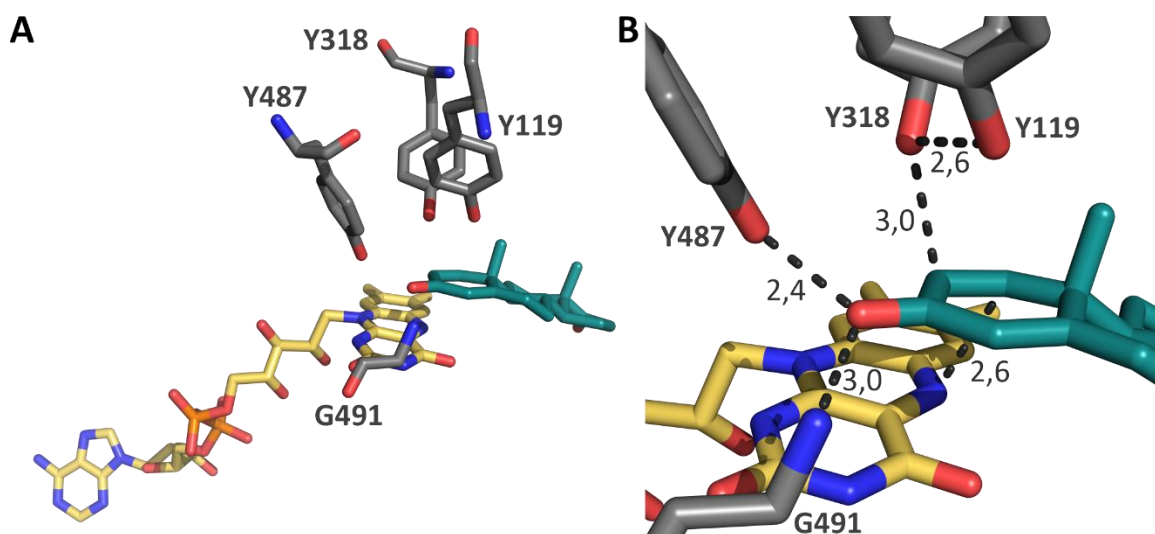


Rys. 3. Struktura krystaliczna KSTD1: **domena katalityczna, ADD** i **domena wiążąca FAD (A)**, domena wiążąca **FAD** – motyw Rossmanna: pierwsza część **β - α - β - α - β** i druga część **α - β - β - α** (**B**) (PDB ID: 4C3Y) [24].

Cząsteczka utlenionego kofaktora przyjmuje wydłużoną konformację i ulokowana jest wzdłuż domeny wiążącej FAD. Planarny pierścień flawinowy znajduje się na skraju domeny i skierowany jest w stronę domeny katalitycznej. Z kolei adeninowy koniec FAD znajduje się w hydrofobowej kieszeni i ulokowany jest przed równoległym β -arkuszem tworzącym motyw Rossmanna. Kofaktor związany jest z białkiem niekowalencyjnie, stabilizowany

przez różne oddziaływania z resztami aminokwasowymi, m.in. wiązania wodorowe, oddziaływania van der Waalsa i dipol-dipol.

W centrum aktywnym struktury krystalicznej KSTD1 (PDB ID: 4C3Y) widoczny jest ADD (**9**), zlokalizowany w płaszczyźnie pomiędzy domeną wiążącą FAD i domeną katalityczną. Ligand utrzymywany jest w hydrofobowej kieszeni przez liczne oddziaływania van der Waalsa oraz wiązania wodorowe. Pierścień A 3-ketosteroidowego rdzenia jest prawie płaski i ułożony równoległe do izoalloksazyny. Z jednej strony (α) pierścienia A znajduje się pierścień pirydynowy cząsteczki FAD, z drugiej (β) reszty tyrozyn Y119 i Y318 (**Rys. 4**). Pozostała część 5-członowego rdzenia steroidu znajduje się w przestrzeni dostępnej dla rozpuszczalnika blisko wejścia do centrum aktywnego. Atom tlenu grupy karbonylowej z pozycji C3 3-ketosteroidu tworzy wiązania wodorowe z resztą aminokwasową tyrozyny Y487 i glicyny G491. Biorące udział w reakcji atomy węgla C1 i C2 znajdują się, odpowiednio, blisko atomu azotu N5 pierścienia izoalloksazyny i grupy hydroksylowej tyrozyny Y318 [24].



Rys. 4. Centrum aktywne KSTD1: **FAD**, **androst-1,4-dien-3,17-dion** oraz kluczowe aminokwasy (**A**), przerywane linie obrazują wiązania wodorowe i bliskie kontakty, odległości zostały wyrażone w Angstrmach (**B**) (PDB ID: 4C3Y) [24].

1.1.3. Postulowany mechanizm działania

Pełny cykl katalityczny flawoprotein obejmuje dwie reakcje półokwowe – redukcji (RHR) oraz utleniania (OHR). W pierwszym etapie grupa prostetyczna flawiny ulega dwuelektronowej redukcji przez substrat, w drugim dochodzi do jej utleniania pod wpływem akceptora elektronowego (naturalnego bądź sztucznego) [26]. Opisany w niniejszym rozdziale mechanizm reakcji dotyczyć będzie pierwszego z procesów –

reakcji połówkowej redukcji. Hipoteza mechanistyczna opisująca mechanizm reakcji katalizowanej przez Δ^1 -KSTD została sformułowana w oparciu o opisaną w poprzednim rozdziale strukturę krystaliczną KSTD1, testy aktywności zmutowanego w centrum aktywnym białka [24,27] oraz liczne badania kinetyczne, które określiły wartość kinetycznego efektu izotopowego (KIE) dla znakowanych chiralnie deuterem i trytem substratów [28–32].

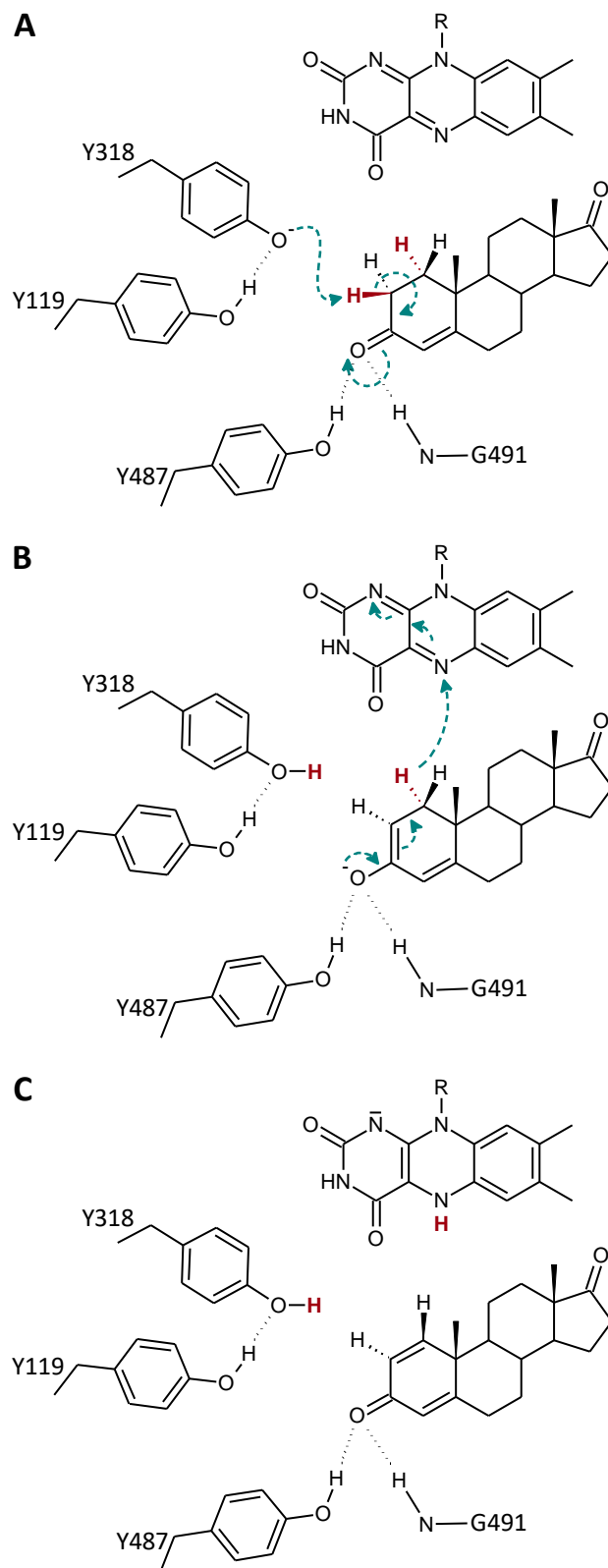
Postuluje się, że odwodornienie katalizowane przez Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowe następuje poprzez bezpośrednią eliminację dwóch atomów wodoru z substratu, a nie przez uprzednią hydroksylację, a następnie odwodnienie [6]. Tezę tę potwierdza fakt, że Δ^1 -KSTD zachowują pełną funkcjonalność w warunkach beztlenowych [21,33], podczas gdy wiele flawinowych enzymów katalizujących hydroksylację wymaga obecności tlenu cząsteczkowego [34]. Co więcej, wykazano że 1α -hydroksyandrost-4-en-3,17-dion jest nieaktywny w reakcji z Δ^1 -KSTD z *Bacillus sphaericus* [29].

Kolejny z postulatów zakłada, że odwodornienie przebiega preferencyjnie przez *trans*-osiową eliminację wodoru $2H\beta$ z atomu węgla C2 steroidu oraz $1H\alpha$ z atomu węgla C1 (**Rys. 5**) [24,29–32]. Obecność wodoru w pozycji 1α jest niezbędna dla zachowania aktywności enzymów – 3-ketosteroidy podstawione w pozycji 1α nie ulegają Δ^1 -dehydrogenacji, podczas gdy ich 1β -podstawione analogi są z sukcesem konwertowane przez Δ^1 -KSTD [29,30,35]. Wykazano też, że w przypadku reakcji ze znakowanymi chiralnie deuterem substratami, każdorazowo dochodzi do oderwania deuteru z pozycji 1α , a w trakcie katalizowanej przez Δ^1 -KSTD transdehydrogenacji następuje przeniesienie na 1-dehydrosteroid wodoru pochodzącego z pozycji 1α [30,32,36]. Z drugiej strony, obecność wodoru w pozycji 2β wydaje się być nieobowiązkowa. W przypadku Δ^1 -KSTD z *Bacillus sphaericus* zaobserwowano, że konwersji ulega także 2β -hydroksyandrost-4-en-3,17-dion, choć w znacznie mniejszym stopniu niż 2α -podstawione steroidy [29,37]. Ten brak specyficzności może być spowodowany tworzeniem przejściowych form reaktywnych, które mogą podlegać szybkiej wymianie na wodór ze środowiska [6].

Zaproponowano także, że enzymatyczne odwodornienie odbywa się etapowo, zgodnie z dwustopniowym unimolekularnym mechanizmem eliminacji sprzężonym z zasadą (E1cB), w którym odejście protonu 2β , któremu towarzyszy tworzenie produktu przejściowego, poprzedza odejście jonu wodorkowego 1α . Jednoetapowy, uzgodniony mechanizm eliminacji bimolekularnej (E2), w którym dwa atomy wodoru odchodzą

jednocześnie bez tworzenia jakiegokolwiek produktu przejściowego, uznano za mniej prawdopodobny. Dowodzi temu fakt, że Δ^1 -KSTD są w stanie katalizować reakcję oderwania nietrwałych w środowisku zasadowym atomów deuteru czy trytu z pozycji C2 substratu, nawet jeśli kofaktor utrzymywany jest w stanie zredukowanym [30–32]. Hipoteza wysunięta przez naukowców już w latach 60 XX wieku sugeruje, iż pierwszy etap – oderwanie wodoru od atomu C2 i utworzenie enolowego [30,31] lub karbonylowego [32] produktu przejściowego, poprzedzone przez oddziaływanie tlenu karbonylowego przy węglu C3 z elektrofilem (**Rys. 5A**) następuje szybko. Natomiast drugi etap – utworzenie wiązania podwójnego pomiędzy węglem C1 i C2 oraz przeniesienie wodoru z węgla C1 na grupę prostetyczną flawiny (**Rys. 5B**) limituje szybkość reakcji [30–32].

Rozwiązanie struktury krystalicznej KSTD1 opisanej w **Rozdziale 1.1.2** pozwoliło na określenie pozycji i funkcji aminokwasów kluczowych z punktu widzenia katalizowanej przez enzym reakcji. Autorzy struktury dopatryli się czterech silnie zakonserwowanych reszt aminokwasowych w centrum aktywnym białka, które stanowiły tyrozyny nr Y119, Y318 i Y487 oraz glicyna nr G491. Tyrozyny zostały poddane ukierunkowanej mutagenie i zamienione na fenyloalaniny. Testy aktywności zmutowanych białek wykazały, że mutacja Y318F prowadzi do całkowitej utraty aktywności enzymu. W związku z tym, że grupa hydroksylowa Y318 znajduje się blisko atomu C2 substratu, przyjęto, że ten aminokwas pełni rolę zasady odpowiedzialnej za oderwanie pierwszego z wodorów – 2H β (**Rys. 5A**). Również wprowadzenie mutacji w pozycji Y119 doprowadziło do znaczącego spadku aktywności (~0,05% aktywności w porównaniu do typu dzikiego (WT)). Biorąc pod uwagę, że tyrozyna Y119 nie znajduje się w bliskim kontakcie z żadnym z atomów substratu, ale może tworzyć wiązanie wodorowe z grupą hydroksylową Y318 (**Rys. 5**) założono, że stabilizuje zdeprotonowaną Y318 i/lub uczestniczy w szklaku przekazania protonu do środowiska. Zmutowanie ostatniej z tyrozyń – Y487 również nie spowodowało całkowitej utraty aktywności enzymu (~2,6% aktywności WT). Aminokwas ten wraz z G491 mogą być odpowiedzialne za stabilizację produktu przejściowego, przez utworzenie wiązań wodorowych z tlenem karbonylowym w pozycji C3 substratu. Dowodem na znaczenie glicyny w procesie katalitycznym jest fakt, że po wprowadzeniu mutacji Y487F KSTD1 pozostało aktywne [24].



Rys. 5. Postulowany mechanizm działania Δ^1 -KSTD na przykładzie dehydrogenacji androst-4-en-3,17-dionu przez KSTD1.

Jedną z hipotez postulowanego mechanizmu reakcji dehydrogenacji katalizowanej przez Δ^1 -KSTD zakłada, że za oderwanie pierwszego protonu odpowiada zdeprotonowana

tyrozyna [6]. Istotnym argumentem na poparcie tej tezy jest optimum pH reakcji, które w przypadku większości Δ^1 -KSTD znajduje się w zakresie od neutralnego (pH 7–8) po zasadowe (pH 9–10) [33,38–42]. Dodatkowo większość enzymów charakteryzuje się wysoką stabilnością w pH zasadowym [23,43,44]. Wyjątkiem od reguły okazała się Acmb, której optimum pH reakcji, w obecności sztucznego akceptora elektronowego 2,6-dichlorindofenolu (DCPIP) wyniosło 6,0 [21]. Ta obserwacja zrodziła pytanie, czy mechanizm działania tego enzymu może różnić się od pozostałych Δ^1 -KSTD, a jeśli nie, to jakie czynniki umożliwiają mu pracę w środowisku kwaśnym.

1.1.4. Spektrum substratowe

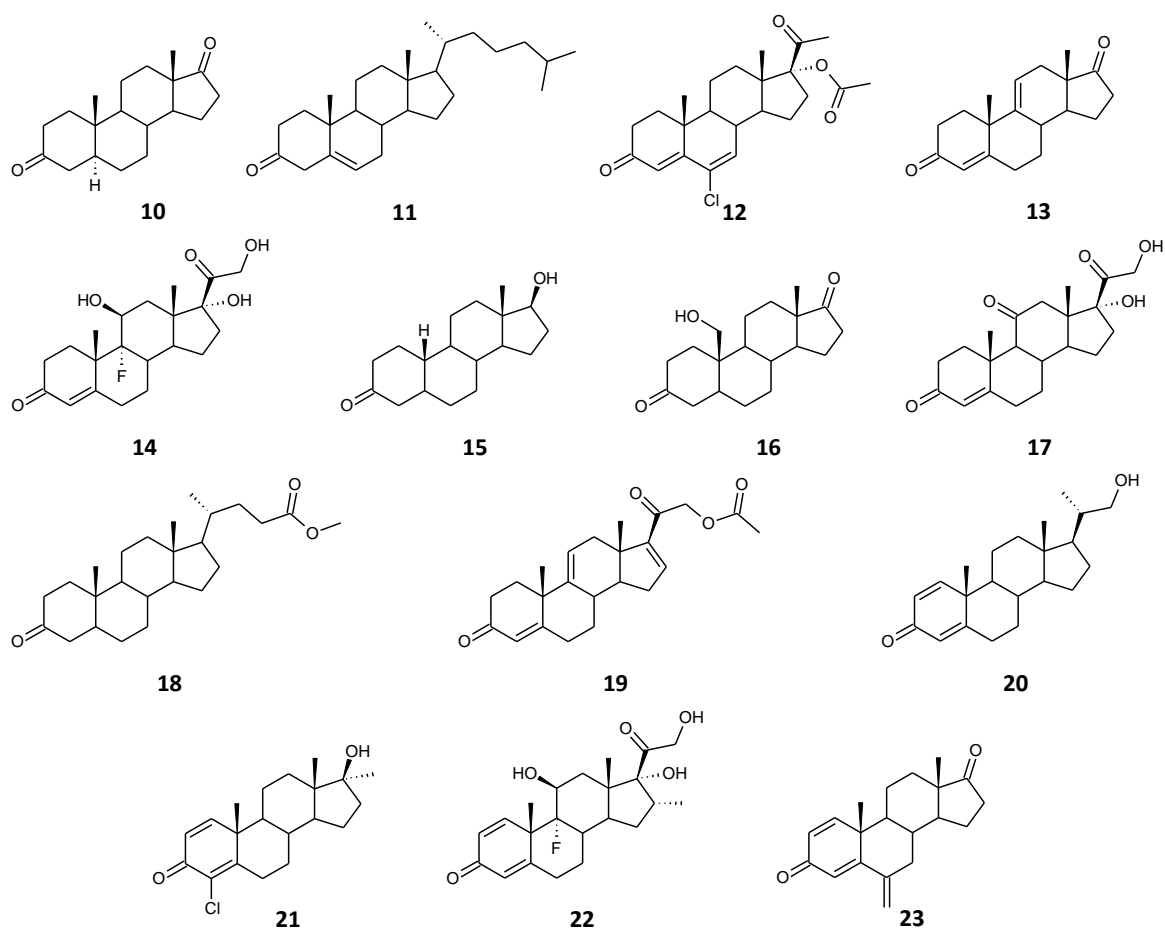
Różnorodność substratów mogących brać udział w reakcji katalizowanej przez Δ^1 -KSTD czyni te białka świetnymi biokatalizatorami do syntezy steroidowych farmaceutyków (**Rozdział 1.2.2**). Kluczowa z punktu widzenia procesu katalitycznego jest obecność grupy karbonylowej w pozycji C3. Badano aktywność Δ^1 -KSTD wobec steroidów podstawionych innymi grupami funkcyjnymi w pozycji C3 i w każdym z przypadków enzymy okazywały się być nieaktywne [21,28,33,35,45]. Między innymi na podstawie tych obserwacji zaproponowano interakcję grupy karbonylowej z resztami elektrofilowymi lub będącymi donorem protonu, która miałaby stabilizować produkt pośredni (**Rys. 5**) [24,29–32].

Obecność dodatkowego wiązania podwójnego w pozycji C4–C5 może mieć różnoraki wpływ na aktywność Δ^1 -KSTD. Wiele z substratów przekształcanych przez tę klasę enzymów, posiada to dodatkowe wiązanie podwójne w pierścieniu A, jak np. AD (**8**). W przypadku niektórych z enzymów, jak Δ^1 -KSTD z *Arthrobacter simplex* [35,38] czy *Mycobacterium fortuitum* [46], to wiązanie jest wręcz wymagane. Z drugiej strony niektóre enzymy wykazują większe powinowactwo do steroidów o nasyconym pierścieniu A, takich jak 5 α -androstan-3,17-dion (**10**; **Rys. 6**) [45]. Badania wykazały również aktywność Δ^1 -dehydrogenaz 3-ketosteroidowych wobec steroidów z dodatkowym wiązaniem w pozycji C5–C6 – cholest-5-en-3-on (**11**) [21], C6–C7 – octan chlormadinonu (**12**) [47] czy C9–C11 – androst-4,9-dien-3,17-dion (**13**) [41].

Różny wpływ na aktywność Δ^1 -KSTD ma także obecność podstawników przy steroidowym rdzeniu. Δ^1 -KSTD z *Rhodococcus equi* (synonim *Nocardia restrictus*) jest przykładem dehydrogenazy, która wykazuje zbliżoną aktywność względną wobec

9 α -fluorokortyzolu (**14**) czy 9 α -fluoro-16 α -hydroksykortyzolu i kortyzolu [48]. Natomiast jeden z kluczowych produktów pośrednich w szlaku rozkładu cholesterolu – 9 α -hydroksyandrost-4-en-3,17-dion jest z sukcesem konwertowany przez dwa z trzech izoenzymów Δ^1 -KSTD z *R. erythropolis*, m.in. KSTD1 [45]. Z kolei grupa metylowa w pozycji C10, która jest elementem struktury wszystkich opisanych do tej pory steroidów, wydaje się nie być niezbędną do prawidłowego funkcjonowania Δ^1 -KSTD. Choć analiza struktury krystalicznej KSTD1 wykazała możliwe oddziaływania van der Waalsa pomiędzy ową grupą a łańcuchami bocznymi aminokwasów F116, F294, Y318 i I354, wiele dehydrogenaz 3-ketosteroidowych jest aktywnych wobec np. 19-nortestosteronu (**15**) [21,28,38,48] czy 19-norandrost-4-en-3,17-dionu [33]. Ponadto, Δ^1 -KSTD z gatunku *Moraxella* okazała się być zdolną do dehydrogenacji substratu z grupą hydroksymetylową w pozycji 10 β , tj. androst-4-en-19-ol-3,17-dionu (**16**) [49]. Również obecność podstawników w pozycji C11 może wywierać dwojaki wpływ na aktywność enzymów. Spora grupa Δ^1 -KSTD pochodzących z gatunków Gram-dodatnich jest w stanie prowadzić reakcję z 11 β -hydroksy- (**14**), 11 α -hydroksy- oraz 11-keto-3-ketosteroidami, jak kortyzon (**17**) [33,38,45,48]. Tymczasem dla dehydrogenaz wyizolowanych z bakterii Gram-ujemnych grupa hydroksylowa w pozycji 11 α bądź grupa karbonylowa przy węglu C11 często stanowi zawadę sferyczną [21,28].

Patrząc na struktury opisanych do tej pory steroidów można zauważyć sporą różnorodność podstawników ulokowanych w pozycji C17. Większość enzymów z klasy dehydrogenaz 3-ketosteroidowych preferuje jednak steroidy z niewielkimi podstawnikami w tej pozycji, jak grupa karbonylowa, hydroksylowa czy acetylowa [6]. Tylko kilka z nich wykazywało aktywność wobec bardziej rozgałęzionych substratów, takich jak cholest-4-en-3-on (**2**), cholest-5-en-3-on (**11**), kwas 3-okso-5 β -cholan-24-owy, ester metylowy kwasu 3-okso-4-cholen-24-owego (**18**), octan kortyzonu, octan hydrokortyzonu lub 21-acetoksypregna-4,9(11),16-trien-3,20-dion (**19**) [21,35,43,44,50,51]. Należy zaznaczyć, że w przypadku związków z długimi, alifatycznymi podstawnikami w pozycji C17 badanie specyficzności substratowej jest dodatkowo utrudnione przez ich znikomą rozpuszczalność w środowisku wodnym, w którym prowadzone są wszystkie testy kinetyczne. AcnB jest jednym z nielicznych enzymów tej klasy, który posiada tę nietypową zdolność dehydrogenacji C17-rozgałęzionych steroidów, co czyni go ciekawym obiektem badań.



Rys. 6. Wybrane substraty Δ^1 -KSTD: 5 α -androstan-3,17-dion (**10**), cholest-5-en-3-on (**11**), octan chlormadinonu (**12**), androst-4,9-dien-3,17-dion (**13**), 9 α -fluorokortyzol (**14**), 19-nortestosteron (**15**), 4-androsten-19-ol-3,17-dion (**16**), kortyzon (**17**), ester metylowy kwasu 3-okso-4-cholen-24-owego (**18**), 21-acetoksypregna-4,9(11),16-trien-3,20-dion (**19**). Wybrane Δ^1 -3-ketosteroidy stosowane w przemyśle farmaceutycznym: 22-hydroksy-23,24-bisnorchol-1,4-dien-3-on (**20**), 4-chlorodehydrometylttestosteron (**21**), deksametazon (**22**) oraz eksemestan (**23**).

1.2. Znaczenie farmakologiczne i otrzymywanie Δ^1 -3-ketosteroidów

Jak już wspomniano, różnorodność strukturalna Δ^1 -3-ketosteroidów sprawia, że posiadają one zróżnicowane działanie biologiczne i wykorzystywane są w przemyśle farmaceutycznym zarówno jako substancje aktywne, jak i prekursory do produkcji farmaceutyków [2,3].

1.2.1. Znaczenie Δ^1 -3-ketosteroidów w przemyśle farmaceutycznym

Często produkcje drogich steroidowych substancji aktywnych rozpoczyna stosunkowo tani produkt pośredni, jakim może być Δ^1 -3-ketosteroidowy półprodukt. Dobrym przykładem takiego związku jest ADD (**9**), który produkowany jest z naturalnych surowców (fitosteroli pochodzących z soi, drzew iglastych lub nasion rzepaku), a łączna wielkość rynku światowego AD (**8**) i ADD (**9**) przekracza 1000 ton rocznie. ADD

wykorzystywany jest jako podstawowy substrat do dalszej produkcji leków na drodze syntezy chemicznej i biotechnologicznej [52], np. środków antykoncepcyjnych – estrogenów i progestagenów [53,54]. Kolejnym przykładem 3-ketosteroidu odwodornionego w pozycji C1–C2 i stosowanego jako półprodukt do syntezy m.in. progestagenów oraz hormonów kory nadnerczy jest 22-hydroksy-23,24-bisnorchol-1,4-dien-3-on (**20**) [55].

Δ^1 -3-Ketosteroidy stanowią też liczną grupę substancji czynnych, do których zalicza się m.in. 1,2-odwodorniona pochodna kortyzonu (**17**) – prednizon, który ma działanie przeciwalergiczne, przeciwzapalne i immunosupresyjne, czy steroidy anaboliczno-androgenne, jak 4-chlorodehydrometylt testosteron (**21**) [56]. Z kolei deksametazon (**22**), lek o działaniu przeciwzapalnym, znalazł zastosowanie w terapii pacjentów chorych na Covid-19 – zapobiega lub łagodzi uszkodzenia płuc [57,58]. Innym przykładem Δ^1 -3-ketosteroidu o znaczeniu farmakologicznym jest eksemestan (**23**) – inhibitor aromatazy, stosowany w leczeniu raka piersi [59]. Popularność Δ^1 -3-ketosteroidów wiąże się często z ich silniejszym działaniem w porównaniu do nasyconych analogów. Dla przykładu, działanie przeciwzapalne prednizolonu jest 4-krotnie silniejsze od hydrokortyzonu, podczas gdy siła działania wspomnianego już prednizonu jest 5 razy większa niż kortyzonu (**17**) [60,61].

Pisząc o Δ^1 -dehydroganzach 3-ketosteroidowych i znaczeniu farmakologicznym Δ^1 -3-ketosteroidów nie sposób nie wspomnieć o nich w kontekście wywoływanej przez *Mycobacterium tuberculosis* gruźlicy. Mikroorganizmy te posiadają wyjątkową zdolność przetrwania i namnażania się w ubogim w składniki odżywcze środowisku, jakie stanowią ludzkie makrofagi. Mechanizm, dzięki któremu bakterie przeżywają w makrofagach, jest trudny do zrozumienia [56]. Jednak badania z zakresu genomiki, transkryptomiki i biochemii wykazały, że *M. tuberculosis* jest w stanie jako źródło węgla i energii wykorzystywać cholesterol pochodzący z błon komórkowych gospodarza [62–64]. Jak opisano w **Rozdziale 1.1.1**, enzymem kluczowym z punktu widzenia bakteryjnego katabolizmu cholesterolu jest właśnie Δ^1 -KSTD. Również w przypadku genomu *M. tuberculosis* zidentyfikowano gen kodujący Δ^1 -KSTD, a jego kluczowej roli w procesie inwazyjnym dowiedziono poprzez jego delecję, która spowodowała powstanie mutantów o osłabionej zdolności do namnażania się w makrofagach pochodzących z ludzkiej linii komórkowej THP-1 [45,65]. Jako że badany szczep *M. tuberculosis* H37Rv posiada tylko jeden gen kodujący Δ^1 -KSTD, a ortologów tego enzymu nie znaleziono u ludzi [66], wydaje

się, że Δ^1 -dehydrogenaza 3-ketosteroidowa może stanowić dobry cel terapeutyczny w leczeniu gruźlicy, a wśród Δ^1 -3-ketosteroidów można poszukiwać potencjalnego inhibitora.

1.2.2. Enzymatyczna synteza Δ^1 -3-ketosteroidów

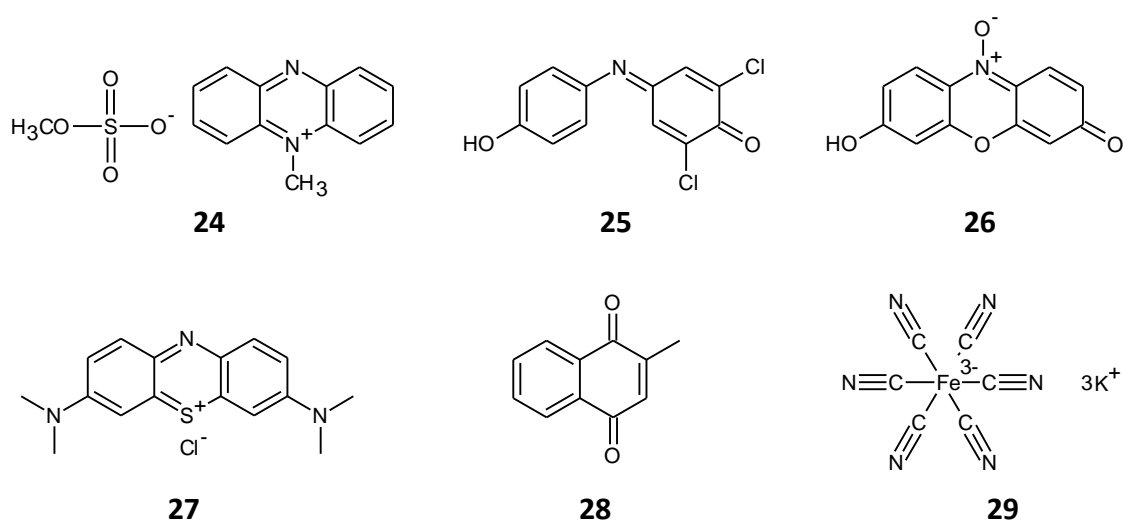
Do przeprowadzenia 1,2-dehydrogenacji ketosteroidów mogą zostać zastosowane metody chemiczne, jak i biotechnologiczne – mikrobiologiczne biotransformacje lub przemiany wykorzystujące wyizolowane enzymy. Chemiczne odwodornienie, w porównaniu do metod biotechnologicznych, cechuje niska regio- i stereoselektywność [5,67–69]. Wykazano też, że synteza chemiczna AD (8) i ADD (9) z fitosteroli wymaga wytworzenia półproduktów z zabezpieczonymi grupami funkcyjnymi, które po reakcji należy odbezpieczyć, co wydłuża proces produkcji. Co więcej, steroidowy rdzeń jest też wrażliwy na rozkład pod wpływem szeregu odczynników chemicznych [70]. Ponadto reakcje chemiczne wymagają dużej ilości toksycznych, szkodliwych dla środowiska odczynników i rozpuszczalników, generują koszty związane z wysokim zużyciem energii (gdy prowadzone są w wysokich temperaturach), a ich wydajność często jest bardzo niska [3,70,71]. Z drugiej strony reakcje katalizowane przez enzymy, czy to formie wyizolowanej czy całych komórek bakteryjnych, najczęściej prowadzone są w roztworach wodnych, w pH bliskim obojętnemu, temperaturze zbliżonej do pokojowej i pod ciśnieniem atmosferycznym [72]. Co więcej, często nawet gdy steroidy syntezowane/funkcjonalizowane są w wyniku wieloetapowej syntezy chemicznej to odwodornienie pomiędzy atomami C1–C2 katalizowane jest przez mikroorganizmy [73].

Niestety enzymatyczna synteza Δ^1 -3-ketosteroidów posiada również istotne ograniczenia. Pierwszym z nich jest bardzo niska rozpuszczalność steroidów w środowisku wodnym, która powoduje zmniejszenie dostępności substratu dla enzymu/mikroorganizmu i tym samym mniejszy uzysk z procesu [2]. Jednym ze sposobów na obejście problemu miała być „pseudo-krystalofermentacja”, którą naukowcy wykorzystali do odwodornienia hydrokortyzonu do prenizolonu. Hydrokortyzon został dodany w formie proszku do hodowli *N. simplex* i w miarę postępu fermentacji i dehydrogenacji do prednizolonu, substrat stopniowo rozpuszczał się. Z kolei niska rozpuszczalność produktu powodowała jego krystalizację. Wydajność procesu wynosiła ponad 93%, a w wyniku rekrytalizacji uzyskano prednizolon o czystości wynoszącej ponad

97%. Niestety pomimo prób zastosowania analogicznej technologii do odwodornienia innych substratów okazała się ona być skuteczną tylko w tym specyficznym przypadku, tj. dehydrogenacji hydrokortyzonu przez *N. simplex* [74,75]. Inną metodą zwiększania dostępności steroidów jest zastosowanie rozpuszczalników organicznych. Optymalizacja warunków fermentacji z dodatkiem rozpuszczalników organicznych, czy w układach dwufazowych może doprowadzić do poprawy wydajności biotransformacji i ułatwić odzyskiwanie produktu [70,76]. Jednak zastosowanie rozpuszczalników organicznych najczęściej prowadzi do spadku aktywności i/lub stabilności biokatalizatora. W takim wypadku koniecznym jest poszukiwanie szczepów bakteryjnych i enzymów odpornych na działanie rozpuszczalników organicznych. Dehydrogenazy takie pozyskano z różnych szczepów wspomnianego już *N. simplex*. Zastosowanie systemu, w którym Δ^1 -KSTD z *N. simplex* ekspresjonowane było w komórkach *Escherichia coli*, doprowadziło każdorazowo do uzyskania wyższych wydajności i konwersji AD (**8**) do ADD (**9**) w przypadku 5% (v/v) dodatku różnych rozpuszczalników organicznych niż przy ich braku [40]. Również izolowane Δ^1 -KSTD pochodzące z *N. simplex* 156 i CGMCC 14539 okazały się tolerować rozpuszczalniki organiczne w stężeniu nawet do 50% (v/v) [44,77]. Jednakże większość enzymów tej klasy nie toleruje rozpuszczalników organicznych w tak wysokich stężeniach, co wymusiło poszukiwania alternatywnych solubilizatorów. Wśród testowanych substancji znalazły się m.in. olej silikonowy, oleje roślinne, surfaktanty, fosfolipidy, glikole oraz dekstrany [56]. Choć środki te cechują się niższą toksycznością niż rozpuszczalniki organiczne, nadal mogą mieć niekorzystny wpływ na enzymy i drobnoustroje [78]. Dobrym rozwiązaniem natomiast wydają się być cyklodekstryny (CD) – cykliczne oligosacharydy składające się z sześciu do ośmiu jednostek D-glukozy połączonych wiązaniami α -1,4-glikozydowymi. CD są dobrze rozpuszczalne w wodzie, a jednocześnie posiadają hydrofobową kieszeń w kształcie stożka, która może otoczyć i poprawić rozpuszczalność cząsteczki hydrofobowej [79]. Co więcej, uważa się, że CD są biokompatybilne, gdybyż nie zakłócają wzrostu mikroorganizmu, ani nie wpływają negatywnie na aktywności i stabilność enzymów. Po zakończeniu reakcji można je odzyskać i ponownie wykorzystać [79,80]. Dodatek hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (HBC) na poziomie 4,5% (w/v) do medium fermentacyjnego pozwolił na rozpuszczenie ponad 36 razy większej ilości substratu – octanu kortyzonu [81]. Poza oczywistym wzrostem uzysku z reakcji prowadzonych w obecności CD, zanotowano też wzrost

szybkości biotransformacji, zmniejszenie ilości produktów ubocznych i zahamowanie rozpadu steroidowego rdzenia [56]. Co ciekawe, tworzenie kompleksów inkluzyjnych pomiędzy CD a steroidowym substratem/produktem może ograniczać inhibicję substratową/produktową [81,82].

Katalizowanej przez Δ^1 -KSTD dehydrogenacji substratu towarzyszy redukcja kofaktora FAD, aby enzym mógł przeprowadzić kolejny cykl katalityczny konieczne jest jego reutlenienie. Proces ten następuje dzięki przeniesieniu dwóch elektronów ze zredukowanej formy FAD na akceptor elektronowy. Zastosowanie jako biokatalizatora żywych komórek pozwala na wykorzystanie akceptorów elektronowych dostępnych w mikroorganizmach, których natura nie została jeszcze w pełni zidentyfikowana. Wadami takiego systemu są – stosunkowo wolny transfer elektronów i regeneracja FAD oraz wrażliwość na składniki medium reakcyjnego, m.in. rozpuszczalniki organiczne [56]. Zamiast akceptor elektronowy może posłużyć też tlen cząsteczkowy [45,50,83]. Jednakże transfer elektronów na tlen cząsteczkowy również jest wolny, a w wyniku procesu generuje się potencjalnie szkodliwy dla białek nadtlenek wodoru [83]. Problem ograniczeń kinetycznych można obejść stosując elektrochemiczny system regeneracji FAD [84]. Natomiast aby wyeliminować toksyczny efekt, jaki wywołuje na komórkach bakteryjnych powstający w reakcji produkt uboczny, nadtlenek wodoru, skonstruowano system, w którym Δ^1 -KSTD z *Mycobacterium neoaurum* koekspresjonowano z katalazą (rozkładającą nadtlenek wodoru do wody i tlenu) [85].



Rys. 7. Wybrane akceptory elektronowe Δ^1 -KSTD: metosiarcczan fenazyiny (**24**), 2,6-dichloroindofenol (**25**), resazuryna (**26**), błękit metylenowy (**27**), menadion (**28**) oraz heksacyjanożelazian (III) potasu (**29**).

Mimo wszystko najczęściej wybieraną opcją jest dodatek do medium reakcyjnego zewnętrznego, sztucznego akceptora elektronowego. W literaturze odnotowano szereg substancji chemicznych, które mogą posłużyć jako wydajne akceptory elektronowe dla dehydrogenacji katalizowanej przez całe komórki, jak i wyizolowane Δ^1 -KSTD [6]. Do tej grupy zalicza się np. metosiarczan fenazy (PMS; **24**; Rys. 7), DCPIP (**25**), resazuryna (**26**), błękit metylenowy (**27**), menadion (**28**) i inne chinony, czy heksacyjanożelazian (III) potasu (**29**) [6,21].

Choć przemysłowo powszechnie jako katalizatory 1,2-dehydrogenacji stosowane są całe komórki bakteryjne, synteza wykorzystująca mikroorganizmy nie jest pozbawiona wad [56]. Poza opisaną już wcześniej ograniczoną rozpuszczalnością steroidów, problem stanowi toksyczność samych substratów oraz fakt, że enzymy katalizujące odwodornienie są ulokowane wewnątrz komórki, a steroid musi pokonać barierę w postaci błon komórkowych [5,56]. Co więcej, synteza z wykorzystaniem całych komórek bateryjnych zwiększa ryzyko zanieczyszczenia leków endotoksynami (lipopolisacharydami budującymi zewnętrzną błonę komórkową bakterii Gram-ujemnych) o działaniu pirogennym [86]. Często niski uzysk produktu powiązany jest też z niskim poziomem ekspresji enzymów modyfikujących steroidy w rekombinowanych systemach *E. coli* czy *Saccharomyces cerevisiae* [5]. Jednym ze sposobów na zwiększenie wydajności syntezy katalizowanej przez całe komórki bakteryjne jest zwiększenie przepuszczalności błon komórkowych przez zastosowanie związków modyfikujących ich strukturę, jak surfaktanty czy lecytyna. Podobny efekt osiąga się stosując nietypowe źródła węgla (jak izopropanol), hodując bakterie w warunkach stresowych (np. przy zwiększonym stężeniu etanolu) lub przez delecję genów odpowiedzialnych za ekspresję enzymów niebędących niezbędnymi do przetrwania mikroorganizmu. Ta ostatnia metoda skutkuje wadami w ciągłości ściany komórkowej [56]. W celu poprawy wydajności biotransformacji wykorzystywane są również komórki immobilizowane. Zwiększona wydajność objętościowa jest najczęściej związana z wysoką gęstością immobilizowanych komórek. Inne zalety takiego systemu to wysoka retencja biomasy w przypadku procesów ciągłych, łatwiejsza separacja produktów, wyższa stabilność operacyjna immobilizowanych komórek oraz możliwość ich ponownego wykorzystania [70]. Komórki *Bacillus pumilus* immobilizowane w kriożelu, zbudowanym z polimeru alkoholu winylowego, zostały z sukcesem zastosowane do produkcji prednizolonu [87], z kolei *N. simplex*, immobilizowane w mikrokapsułkach

złożonych z siarczanu celulozy sodowej/chlorku poli-dimetylo-diallilo-amoniowego, wykorzystano do odwodornienia 11 α -hydroksy-16 α ,17-epoksyprogesteronu w systemie dwufazowym woda/faza ogranicza [76]. Dehydrogenacja może zostać również przeprowadzona z wykorzystaniem ekstraktów pozbawionych komórek lub oczyszczonych Δ^1 -KSTD. Dla przykładu, ekstraktu z komórek *E. coli*, w których ekspresjonowano Δ^1 -KSTD z *Gordonia neofelifaecis*, użyto do utlenienia androst-4,9(11)-dien-3,17-dionu, uzyskując wyniki porównywalne do otrzymanych z zastosowaniem całych komórek bakteryjnych [88]. Ostatnio podjęto się też kowalencyjnej immobilizacji Δ^1 -KSTD z *N. simplex* na żywicy epoksydowej, a tak uzyskany katalizator wykazywał wyższą tolerancję na rozpuszczalniki organiczne oraz lepszą stabilność przechowywania i działania niż wolny enzym [89].

1.3. Wybrane metody badania mechanizmu reakcji enzymatycznych

Badanie mechanizmu reakcji katalizowanej przez enzymy wymaga zastosowania szeregu technik, które mogą dostarczyć szczegółowych informacji o zmianach konformacyjnych badanego białka, zachodzących w trakcie katalizowanego procesu, kluczowych aminokwasach biorących udział w reakcji oraz jej chemicznych i kinetycznych etapach koniecznych do zamknięcia cyklu katalitycznego. W niniejszym rozdziale zostaną opisane wybrane techniki badania mechanizmu reakcji enzymatycznych, które zostały zastosowane do rozwikłania mechanizmu działania Δ^1 -dehydrogenaz 3-ketosteroidowych.

1.3.1. Ukierunkowana mutageneza

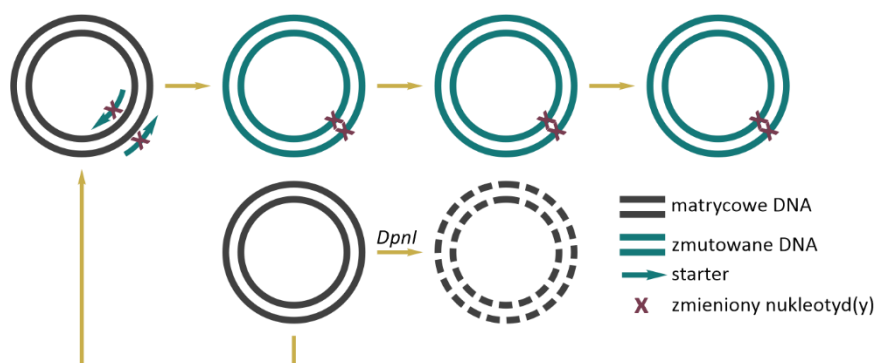
Enzymy katalizują bardzo złożone reakcje chemiczne dzięki zdolności do wiązania i odpowiedniego orientowania substratów w centrum aktywnym oraz regioselektywne oddziaływanie z poszczególnymi ich fragmentami poprzez znajdujące się w nim aminokwasy. Analiza struktur krystalicznych enzymów pokazuje, że wiązanie substratów zachodzi dzięki kombinacji wiązań jonowych, wodorowych oraz oddziaływań van der Waalsa. Z kolei specyfika enzymów wynika z wielu interakcji, które określają wielkość i kształt centrum aktywnego. Enzymy katalizują reakcje, wpływając na solwatację reagentów i środowisko elektrostatyczne oraz ułatwiając przenoszenie atomów/grup funkcyjnych i tworzenie wiązań kowalencyjnych [90]. Inżynieria białek stała się głównym sposobem badania centrum aktywnego enzymów, identyfikacji i określenia roli reszt aminokwasowych w wiązaniu ligandów, specyficzności substratowej i samej katalizie.

Ukierunkowana mutageneza jest techniką, która poszerzyła wiedzę zdobytą dzięki krystalografii rentgenowskiej i dostarczyła dowodów, że skomplikowana geometria centrum aktywnego jest wspierana przez pozostałą część białkowej infrastruktury dla osiągnięcia maksymalnej wydajności katalitycznej [91].

Początkowo identyfikacja reszt aminokwasowych i określenie ich roli w centrum aktywnym bazowały na analizie parametrów kinetycznych substratów i ich analogów oraz na chemicznej modyfikacji białek. Szybki rozwój technik biologii molekularnej umożliwił zamianę poszczególnych aminokwasów lub podjednostek strukturalnych enzymów. W wielu przypadkach eksperymenty wykorzystujące ukierunkowaną mutagenezę potwierdzały katalityczną rolę łańcuchów bocznych aminokwasów w centrum aktywnym, jaką wskazywała wcześniej modyfikacja chemiczna lub analiza struktury krystalicznej [91]. Innym celem ukierunkowanej mutagenezy jest zrozumienie ewolucji enzymów oraz badanie cech strukturalnych, które kontrolują zmiany konformacyjne, efekty allosteryczne i dynamikę białek [90].

Mutagenezą nazywa się technikę służącą do wprowadzania zmian w sekwencji DNA, w celu sprawdzenia jej wpływu na gen lub funkcje DNA. Może zostać ona przeprowadzona *in vivo* lub *in vitro* (zazwyczaj przy wykorzystaniu konstruktów w postaci plazmidów). O ukierunkowanej mutagenezie mówi się, gdy zmiany w interesującej sekwencji DNA generowane są w dokładnie określonym miejscu. Opublikowano kilka podejść do tej techniki, które wykorzystują jako szablon jednoniciowe, jak i dwuniciowe DNA. Jednak metody wykorzystujące jednoniciowe DNA są znacznie bardziej czasochłonne. Dla metod wykorzystujących dwuniciowe DNA opracowanych zostało kilka komercyjnie dostępnych zestawów. W niniejszej pracy ukierunkowaną mutagenezę przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu QuikChange™ (Stratagene). Wykorzystuje on reakcję łańcuchową polimerazy, gdzie pierwszym krokiem jest denaturacja dwuniciowego plazmidu, następnie przyłączenie zaprojektowanych starterów (zawierających pożądaną mutację) i kolejno ich wydłużenie z udziałem odpowiedniej polimerazy. Unikalną cechą tego systemu jest fakt, że matrycowe DNA jest trawione przez enzym restrykcyjny – endonukleazę *DpnI*. *DpnI* rozpoznaje i trawi metylowane lub hemimetylowane sekwencje w matrycowym DNA. DNA wyizolowane z prawie wszystkich szczepów *E. coli* jest Dam metylowane, a zatem matrycowe DNA jest podatne na trawienie przez *DpnI*, podczas gdy

enzym nie trawi nowo zsyntetyzowanego, zmutowanego DNA, jako że *in vitro* nie uległo metylacji (**Rys. 8**).



Rys. 8. Schemat działania zestawu QuikChange™ (Stratagene) wykorzystującego trawienie matrycowego DNA przez *DpnI*.

Finalnie następuje transformacja zmutowanych plazmidów do komórek bakteryjnych, które są w stanie naprawić nacięcia. Inne zestawy stosują metylację DNA jako krok przed reakcją PCR (GeneTailor™, Invitrogen), metodę selekcji pod wpływem antybiotyków przy użyciu oligonukleotydów komplementarnych z regionem genu oporności na ampicylinę (GeneEditor™, Promega), bądź metodę „overlap extension”, która umożliwia amplifikację docelowego genu z genomowego DNA lub cDNA bez konieczności klonowania interesującego genu do plazmidu [92]. Wszystkie ze wspomnianych metod stosuje się do wprowadzania pojedynczych mutacji do sekwencji białka. Do jednoczesnego wprowadzenia większej ilości mutacji stosowane są bardziej złożone techniki [93].

Znajomość struktury przestrzennej enzymu jest nieoceniona, jeśli chodzi o racjonalny wybór aminokwasów, które poddane zostaną mutagenie. Gdy struktura krystaliczna enzymu pozostaje nieznana z pomocą może przyjść modelowanie homologiczne. Alternatywnie można zastosować bardziej spekulatywne metody, jak np. skanowanie alaninowe, gdzie wszystkie naładowane aminokwasy są systematycznie zastępowane alaniną, celem identyfikacji tych kluczowych z punktu widzenia katalizy. Poza wyborem odpowiednich aminokwasów, w badaniach mających na celu identyfikację i określenie roli łańcuchów bocznych w mechanizmie działania enzymów, istotnym jest zastosowanie podstawienia, które zminimalizuje zmiany strukturalne białka. Tak też histydynę można zamienić na asparaginę czy glutaminę, cysteinę na serynę, tyrozynę na fenyloalaninę, treoninę na walinę, kwas asparaginowy na asparaginę, a kwas glutaminowy na glutaminę i odwrotnie. Niemniej zmiany te mogą wpływać na tworzenie wiązań

wodorowych przez te aminokwasy. Z kolei zastąpienie dużego łańcucha bocznego alaniną (jak w metodzie skanowania alaninowego) wiąże się ze znaczącą zmianą w rozmiarze, a tym samym efekty strukturalne mogą być większe. Zwiększenie rozmiaru łańcucha bocznego może natomiast skutkować wygenerowaniem interferencji stycznych, które są energetycznie jeszcze bardziej niekorzystne niż pustka wytworzona przez za mały aminokwas. Kiedy dla aktywności enzymu kluczowe są zmiany konformacyjne, ruch poszczególnych części enzymu można testować rozluźniając lub usztywniając strukturę przez zamianę prolin na glicyny czy alaniny lub odwrotnie. Alternatywnie, aby unikać dylematu wyboru odpowiedniego podstawienia można zastosować mutagenezę z wysyceniem, która generuje całą bibliotekę mutantów [90].

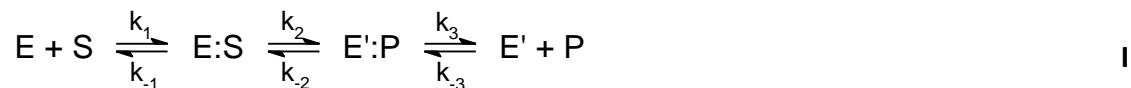
1.3.2. Kinetyka reakcji enzymatycznych

Analiza kinetyki reakcji enzymatycznych jest jednym z najczęściej stosowanych sposobów wyjaśniania mechanizmu reakcji enzymatycznych, zwłaszcza w połączeniu z opisaną wcześniej inżynierią białek i identyfikacją katalitycznie istotnych elementów strukturalnych [94].

Już pod koniec XVIII wieku znana była większość praw rządzących wpływem stężenia reagentów na szybkość reakcji chemicznych, jednak reakcje enzymatyczne nie zawsze były zgodne z tymi prostymi prawami. W 1902 Victor Henri zaproponował pierwsze użyteczne równanie szybkości reakcji enzymatycznej [95]. Równanie Henriego uwzględniało znane właściwości enzymów, w tym fakt, że enzymy są wysoce specyficzne wobec określonego substratu (lub klasy substratów), substraty często chronią enzymy przed termiczną inaktywacją oraz że wykres szybkości początkowej w funkcji stężenia substratu jest hiperboliczny. Kolejni naukowcy, w tym Michaelis i Menten (1913), Van Slyke i Cullen (1914) oraz Briggs i Haldane (1925), potwierdzili i/lub rozszerzyli równanie Henriego dostarczając jednak podstaw teoretycznych opisujących aktywność [96].

Równanie definiujące szybkość reakcji enzymatycznej (zwane równaniem Michaelisa-Menten) można wyprowadzić w oparciu o dwa podejścia, tj. przybliżenie szybkiego stanu równowagi Henriego-Michaelisa-Menten (The Rapid Equilibrium Assumption), bądź bardziej ogólne przybliżenie stanu stacjonarnego Briggsa i Haldane'a (The Steady-State Assumption). Ogólny przebieg jednosubstratowej reakcji enzymatycznej przedstawia schemat I, jednakże oba ze wspomnianych podejść zakładają,

że po utworzeniu przez wolny enzym (E) i wolny substrat (S) kompleksu enzym–substrat (E:S), następuje jednokierunkowa, ograniczająca szybkość reakcji przemiana kompleksu E:S w enzym i produkt (P). Umożliwia to uproszczenie schematu reakcji II [94,96].



W ramach przybliżenia szybkiego stanu równowagi Henriego-Michaelisa-Menten przyjmuje się, że stała szybkości dysocjacji kompleksu E:S jest znacznie wyższa od stałej etapu katalitycznego ($k_{-1} \gg k_2$). W efekcie stężenia E, S i E:S pozostają w stanie równowagi. Ponadto ze względu na duży nadmiar stężenia substratu względem stężenia enzymu przyjmuje się, że stężenie wolnego substratu $[S]_f$ nie jest zaburzone przez stężenie kompleksu E:S i jest bliskie całkowitemu stężeniu substratu dodanemu do reakcji ($[S]_f \cong [S]$). Stąd też stałą równowagi dysocjacji kompleksu E:S przedstawia wzór III.

$$K_D = \frac{[E]_f[S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad \text{III}$$

Całkowite stężenie enzymu jest sumą stężenia wolnego enzymu i związanego w kompleksie E:S (IV). Wzór na stałą dysocjacji E:S (V) można zapisać uwzględniając równanie IV.

$$[E] = [E]_f + [ES] \quad \text{IV}$$

$$K_D = \frac{([E] - [ES])[S]}{[ES]} \quad \text{V}$$

Po przekształceniu równania V względem $[ES]$ otrzymuje się VI:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_D + [S]} \quad \text{VI}$$

Kompleks E:S rozpada się w wyniku szeregu etapów chemicznych dając produkt i wolny enzym. W najprostszym przypadku zakładamy jeden etap opisany pierwszorzędową stałą kinetyczną k_2 . Częściej jednak mamy do czynienia z szeregiem szybkich procesów chemicznych następujących po sobie, którym kolektywnie przypisujemy jedną pierwszorzędową stałą k_{cat} (VII).



W związku z tym szybkość tworzenia produktu jest opisana równaniem dla reakcji pierwszego rzędu **VIII**.

$$v = k_{cat}[ES] \quad \text{VIII}$$

W wyniku połączenia równań **VI** i **VIII** uzyskuje się **IX**:

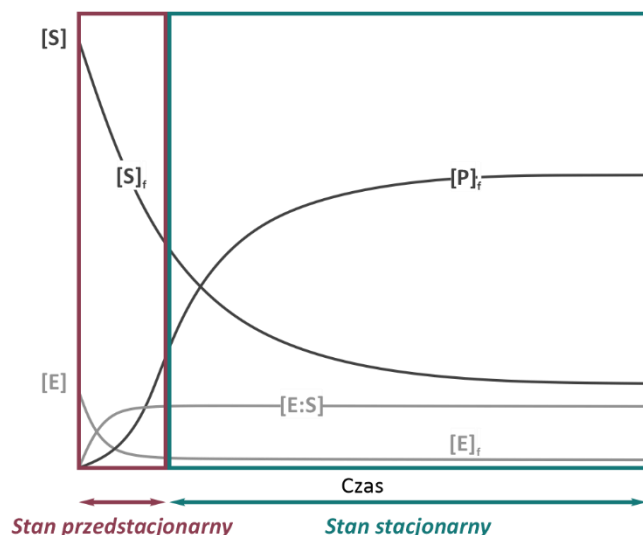
$$v = \frac{k_{cat}[E][S]}{K_D + [S]} \quad \text{IX}$$

Wartość $k_{cat}[E]$ definiuje się natomiast jako maksymalną szybkość reakcji (V_{max}), jako że cały enzym jest zaangażowany w tworzenie E:S. Podstawienie maksymalnej szybkości do równania **IX** pozwala uzyskać równanie Michaelisa-Menten **X** [94,96].

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_D + [S]} \quad \text{X}$$

Powyższe wyprowadzenie jest użyteczne dla pomiarów szybkiej kinetyki, np. reakcji w stanie przedstacjonarnym, jakie wykonywano w tej pracy z wykorzystaniem techniki zatrzymanego przepływu (**Rozdział 3.3.2**). Jednak większość eksperymentalnych pomiarów szybkości reakcji katalizowanych enzymatycznie ma miejsce, gdy kompleks E:S jest obecny w stałym stężeniu, w stanie quasi-stacjonarnym (**Rozdział 3.3.1**). Takie warunki opisuje drugie ze wspomnianych na początku rozdziału przybliżeń, zaproponowane przez Briggsa i Haldane [94,96]. Zmianę stężenia reagentów w funkcji czasu w stanie przedstacjonarnym i stacjonarnym zaprezentowano na **Rys. 9** [97].

Przybliżenie stanu stacjonarnego nie wymaga spełnienia założenia $k_{-1} \gg k_2$, a zakłada, że pomiar dotyczy etapu reakcji, w czasie którego szybkość tworzenia kompleksu E:S jest równa szybkości jego rozpadu (na wolny enzym i substrat bądź produkt). Tę fazę kinetyczną można osiągnąć, gdy stężenie cząsteczek substratu znacznie przekracza stężenie wolnego enzymu. Ponadto w początkowej fazie postępu reakcji konwersja substratu jest bardzo niska w stosunku do stężenia początkowego, stąd możemy przyjąć, że $[S]_f$ jest równe $[S]$ [94]. W praktyce ubytek ten nie powinien przekroczyć 10% [96].



Rys. 9. Zmiana stężenia reagentów w trakcie reakcji katalizowanej enzymatycznie, w funkcji czasu [97].

Stosując założenia stanu ustalonego można zapisać równania **XI – XIII**, jako że stężenie kompleksu E:S jest w tej fazie stałe i zależy od szybkości jego tworzenia i rozpadu.

$$\frac{[ES]}{dt} = 0 \quad \text{XI}$$

$$\frac{[ES]}{dt} = k_1[E]_f[S]_f \quad \text{XII}$$

$$-\frac{[ES]}{dt} = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad \text{XIII}$$

Równania **XII** i **XIII** muszą być sobie równe (**XIV**), a po przekształceniu względem $[ES]$ uzyskuje się **XV**:

$$k_1[E]_f[S]_f = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad \text{XIV}$$

$$[ES] = \frac{k_1[E]_f[S]_f}{(k_{-1} + k_2)} = \frac{[E]_f[S]_f}{K_m} \quad \text{XV}$$

gdzie trzy stałe szybkości zostały połączone w jedną stałą kinetyczną K_m (**XVI**), zwaną stałą Michaelisa.

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{XVI}$$

W związku z tym, że zanik substratu jest znikomy, stężenie wolnego substratu $[S]_f$ we wzorze **XV** można zastąpić stężeniem całkowitym $[S]$, które w warunkach

eksperymentalnych znacznie łatwiej określić. Z kolei w miejsce $[E]_f$ wstawić można ($[E] - [ES]$) z równania **IV**, uzyskując **XVII**:

$$[ES] = [E] \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad \text{XVII}$$

Po połączeniu równania **XVII**, z równaniem szybkości reakcji **VIII** otrzymuje się **XVIII**:

$$v = k_{cat}[E] \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad \text{XVIII}$$

W wyniku podstawienia V_{max} do wzoru **XVIII** uzyskuje się równanie **XIX**, analogiczne do wyprowadzonego wcześniej **X**, za wyjątkiem stałej występującej w mianowniku [94,96].

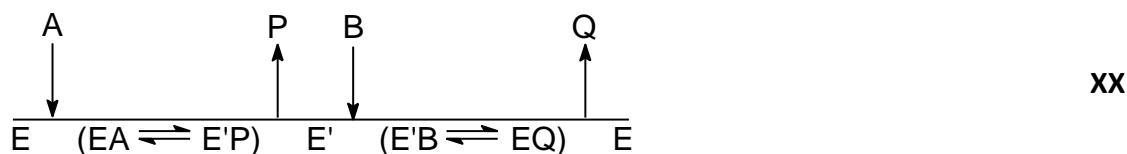
$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{XIX}$$

Stałą Michaelisa (K_m) definiuje się jako stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji jest równa połowie maksymalnej szybkości reakcji enzymatycznej, uzyskanej w warunkach wysycenia substratem. Parametr ten stosowany jest jako względna miara powinowactwa enzymu do substratu. Z kolei stałą katalityczną (k_{cat}) uzyskuje się poprzez podzielenie V_{max} przez całkowite stężenie enzymu użytego w reakcji $[E]$. Wartość k_{cat} czasami opisywana jest jako liczba obrotów enzymu, ponieważ określa liczbę cykli katalitycznych występujących w danej jednostce czasu. Definiuje ona maksymalną szybkość reakcji przy określonym stężeniu enzymu, w warunkach wysycenia substratem. Stała k_{cat} odnosi się do etapów chemicznych następujących po związaniu substratu przez enzym (schemat **VII**) i może zmieniać się w wyniku zmian zachodzących w enzymie (mutacji), zmiany warunków reakcji (pH, siła jonowa, temperatura itd.), czy zmian w samej strukturze substratu. Natomiast najbardziej obiektywnym parametrem kinetycznym, pozwalającym porównywać różne enzymy między sobą jest wydajność katalityczna, czyli stosunek k_{cat} do K_m . Wartości k_{cat}/K_m jest też dobrym parametrem pozwalającym opisać specyficzność substratową danego enzymu. Porównując parametry kinetyczne różnych substratów dla danego enzymu, niejednokrotnie większe różnice można zauważyć w wartościach k_{cat} niż K_m . Dzieje się tak, ponieważ specyficzność substratowa często wynika z różnic w stanie przejściowym, a nie interakcji występujących podczas wiązania substratu przez enzym. Wartość k_{cat}/K_m oddaje wpływ substratu na dowolną stałą

szybkości reakcji i uważana jest za najlepszy wskaźnik pozwalający opisać specyficzności substratową [94].

Warto zaznaczyć, że większość enzymów katalizuje reakcje pomiędzy dwoma lub większą ilością substratów, uwalniając dwa lub więcej produktów. Ponadto substraty i produkty mogą wiązać się z centrum aktywnym w sposób losowy lub uporządkowany, przez co kinetyczny opis enzymatycznych reakcji wielosubstratowych jest bardziej złożony [96]. Często głównym celem pomiarów kinetycznych w stanie stacjonarnym jest w takim przypadku rozróżnienie pomiędzy kilkoma mechanizmami wielosubstratowymi [94].

Przykładem kinetyki dwusubstratowej jest mechanizm Ping Pong *bi bi* (schemat **XX**), w przypadku którego dopiero po zajściu pierwszej reakcji i opuszczeniu centrum aktywnego przez pierwszy substrat (A) dochodzi do związania drugiego substratu (B) ze zmienioną formą enzymu (E'). Kolejny drugi z produktów opuszcza centrum aktywne, a enzym wraca do pierwotnej formy.



Kinetykę reakcji początkowej tego mechanizmu opisuje równanie **XXI**, a szybkość reakcji jest zależna od stężenia obu substratów i powinowactwa do centrum aktywnego obu substratów [94].

$$v = \frac{V_{max}[A][B]}{K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]} \quad \text{XXI}$$

Wykazano, że Δ^1 -dehydrogenacja katalizowana przez Δ^1 -KSTD zachodzi zgodnie z mechanizmem Ping Pong *bi bi*, gdzie pierwszym substratem jest 3-ketosteroid, natomiast drugim Δ^1 -3-ketosteroid działający jako akceptor elektronowy [32].

1.3.3. Kinetyczny efekt izotopowy

Kinetyczny efekt izotopowy (KIE) jest techniką mogącą dostarczyć informacji na temat etapu determinującego szybkość całkowitego obrotu reakcji enzymatycznej i struktury stanu przejściowego [98]. Jest to możliwe, gdy etap limitujący szybkość reakcji stanowi przeniesienie atomu/grupy chemicznej lub utworzenie wiązania [94]. Ze względu na pozycję, w której substrat uległ podstawieniu cięższym izotopem, substratowe KIE

możemy podzielić na pierwszo- i drugorzędowe. O pierwszorzędowym KIE (1° KIE) mówi się, gdy podstawienie izotopowe następuje na atomie tworzącym wiązanie, które w trakcie reakcji enzymatycznej ulega utworzeniu lub rozerwaniu (tj. przenoszony jest podstawiany atom). Drugorzędowe KIE (2° KIE) obserwuje się, kiedy podstawienie izotopowe ma miejsce na atomie nietworzącym formowanego/rozrywanego wiązania. W zależności od pozycji izotopu względem atomu tworzącego kluczowe dla reakcji wiązanie, 2° KIE można dalej podzielić na efekty α - i β -drugorzędowe [99]. Do identyfikacji atomów podlegających przeniesieniu w trakcie etapu katalizy można dodatkowo wykorzystać znakowanie izotopowe [94].

KIE określa stosunek stałych szybkości dwóch reakcji – wyznaczonej dla substratu zawierającego lżejszy i cięższy izotop danego atomu (XXII). Na przykładzie podstawienia protu (k_H) deuterem (k_D), KIE można wyznaczyć z następującego stosunku stałych szybkości reakcji:

$$KIE = \frac{k_H}{k_D} \quad \text{XXII}$$

Kinetyczne efekty izotopowe powiązane są ze zmianami masy atomu, które z kolei wpływają na częstotliwości drgań reagujących wiązań (w ujęciu mechaniki klasycznej) lub energię punktu zerowego (w ujęciu mechaniki kwantowej) [99]. Energia oscylacyjna wiązania chemicznego na najniższym możliwym poziomie jest niezerowa i zależy od częstotliwości drgań wiązania (XXIII), a tym samym masy zredukowanej tworzących go pierwiastków (XXIV). Im cięższy pierwiastek, tym większa energia będzie potrzebna do rozerwania wiązania.

$$v = \frac{k}{\sqrt{m_r}} \quad \begin{array}{l} v\text{- częstotliwość drgań oscylacyjnych} \\ k\text{- stała siłowa} \\ m_r\text{- masa zredukowana} \end{array} \quad \text{XXIII}$$

$$m_r = \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \quad \text{XXIV}$$

O występowaniu normalnego KIE wnioskuje się, gdy wartość $k_H/k_D > 1$. Gdy stosunek k_H/k_D jest równy 1 KIE nie występuje, natomiast gdy stosunek ten jest mniejszy od 1 mówi się o odwrotnym KIE [94].

Izotopowemu podstawieniu można poddać też rozpuszczalnik (wodę w przypadku większości reakcji enzymatycznych), jeśli służy on jako donor protonów (lub tlenu)

podczas katalizy, bądź gdy grupa enzymu lub substratu pełniąca funkcję donora protonów może ulegać szybkiej wymianie izotopowej z rozpuszczalnikiem. Takie efekty określa się jako rozpuszczalnikowy kinetyczny efekt izotopowy. W przypadku prostych systemów enzymatycznych, rozpuszczalnikowy KIE może zostać wykorzystany do określenia ilości protonów ulegających transferowi w trakcie etapu limitującego szybkości reakcji. Odbywa się to poprzez pomiar szybkości reakcji w funkcji procentowej zawartości D₂O w układzie rozpuszczalników H₂O/D₂O. Jeśli za KIE odpowiedzialne będzie przeniesienie jednego H⁺, to do danych na wykresie będzie można dopasować funkcję liniową, natomiast gdy transferowi ulegać będą dwa H⁺, dane będą pasować do przebiegu funkcji kwadratowej, gdy trzy to sześcienniej, itd. [94].

Pomiary KIE mogą obejmować różne atomy, np. H/D, H/T, ¹²C/¹³C, ¹⁴N/¹⁵N lub ¹⁶O/¹⁸O. Zmiany w stałej szybkości reakcji będą tym większe, im większa jest relatywna zmiana masy pomiędzy izotopami. Zamiana protu na deuter powoduje 2-krotny wzrost masy, tym samym 1° KIE (k_H/k_D) zwykle przyjmują wartości rzędu 6–10. W przypadku wymiany węgla ¹²C na ¹³C, wzrost masy jest zaledwie 1,08-krotny, a typowe wartości 1° KIE (k_{12C}/k_{13C}) są znacznie niższe (około 1,04). Również 2° KIE przyjmują wartości znacząco niższe od tych uzyskanych dla 1° KIE, a ich pochodzenie może zostać przypisane różnorodnym efektom, w tym zmianom właściwości elektronowych (np. hybrydyzacji, hiperkoniugacji, indukcji) [99].

Trzy najczęściej stosowane metody pomiaru KIE stanowią: bezpośrednie porównanie szybkości reakcji lub stałej szybkości reakcji zmierzonej dla substratu nieznakowanego i znakowanego, metoda wewnętrznej konkurencji oraz metoda zaburzeń równowagi. Metoda wewnętrznej konkurencji jest bardzo precyzyjna i najczęściej stosowana do badania niskich KIE. Z przyczyn technicznych ogranicza się do określenia KIE jako stosunku V/K_m [100]. Metoda polega na śledzeniu zmian w stosunku masowym substratu lub produktu w miarę postępu reakcji enzymatycznej (więcej szczegółów w **Rozdziale 3.8.2**) [101]. Główną jej zaletą jest unikanie systematycznych błędów poprzez jednoczesny pomiar zmian stężenia dwóch izotopologów. Do określenia stosunku izotopów lekkich i ciężkich atomów stosuje się spektrometrię mas (MS) lub magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) [100]. Z kolei metoda zaburzeń równowagi wymaga przygotowania mieszaniny reakcyjnej w stanie bliskim równowagi, gdzie reagent nieznakowany znajduje się po jednej stronie, a znakowany po drugiej. Po dodaniu enzymu

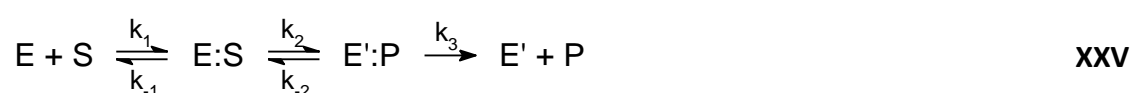
do takiej mieszaniny, reagent nieoznakowany ulega reakcji szybciej niż znakowany analog, a reakcja oddala się od stanu równowagi. Finalnie, gdy zachodzi mieszanie izotopowe, reakcja wraca do stanu równowagi chemicznej, jak i izotopowej [101].

Porównanie KIE wyznaczonego doświadczalnie i metodami teoretycznymi jest jedną z najlepszych metod pozwalających wskazać etap limitujący szybkość reakcji, przetestować hipotezę dotyczącą struktury stanu przejściowego czy ogólniej zweryfikować hipotezę mechanistyczną reakcji katalitycznej.

1.3.4. Kinetyczny efekt lepkości rozpuszczalnika

Kolejną, stosunkowo rzadko wykorzystywaną techniką jest kinetyczny efekt lepkości rozpuszczalnika (KSVE). KSVE pozwala określić czy etap wiązania substratu i uwalniania produktu są limitowane dyfuzyjnie oraz który etap reakcji limituje szybkość procesu katalitycznego. Co więcej, KSVE umożliwia zidentyfikowanie ważnego dla katalizy etapu izomeryzacji. W połączeniu z innymi technikami, jak opisane wcześniej ukierunkowana mutageneza i kinetyczny efekt izotopowy, pozwala szczegółowo opisać mechanizm działania enzymu [98].

Równanie II (**Rozdział 1.3.2**) określa minimalną liczbę etapów, które należy uwzględnić w opisie reakcji *uni uni* (jeden substrat, jeden produkt). Bardziej realistyczny schemat uwzględnia etap przekształcenia kompleksu E:S w kompleks enzym–produkt (E:P) przez chemiczny etap katalizy (**XXV**).



Ruch cząsteczek enzymu i substratu w roztworze podlega podstawowym zasadom dyfuzji. Drugorzędową stałą tworzenia kompleksu pomiędzy cząsteczką enzymu i cząsteczką substratu można opisać za pomocą równania Smoluchowskiego (**XXVI**).

$$k_1 = 4\pi N_0 r_0 (D_A + D_B) \quad \begin{array}{l} N_0 - \text{liczba Avogadro} \\ r_0 - \text{sumaryczny promień reagujących cząsteczek} \\ D_A, D_B - \text{współczynnik dyfuzji cząsteczek} \end{array} \quad \text{XXVI}$$

Współczynnik dyfuzji cząsteczek (D_i) określony jest z kolei równaniem Stokesa-Einsteina (**XXVII**) i dla kuli o promieniu r_i jest odwrotnie proporcjonalny do siły tarcia odczuwanej przez cząstkę w roztworze, która z kolei zależy od lepkości rozpuszczalnika.

$$D_i = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_i}$$

k_B - stała Boltzmana
 T - temperatura bezwzględna
 η - lepkość roztworu

XXVII

Zatem dyfuzja enzymów i substratów, prowadząca do utworzenia kompleksu enzym-substrat, jest odwrotnie proporcjonalna do lepkości roztworu określonej równaniem **XXVII** [98]. Również Kramers postulował, że dyfuzja cząsteczek jest odwrotnie proporcjonalna do tarcia wywołanego przez lepkość rozpuszczalnika, przez co etapy tworzenia kompleksu E:S oraz uwalniania produktu (a tym samym stałe k_1 , k_{-1} i k_3) są na nią wrażliwe [102]. Zakłada się, że etap katalizy (k_2 , k_{-2}) pozostaje niezależny od lepkości medium reakcyjnego, choć dla enzymów katalizujących transfer jonów wodorkowych lub protonów zanotowano przypadki, w których lepkość rozpuszczalnika wpływała na szybkość przeniesienia H^- i H^+ [103,104].

Spore znaczenie w przypadku badań nad KSVE ma odczynnik zastosowany do zwiększenia lepkości środowiska reakcji. Istotnym jest rozróżnienie mikrolepkości od makrolepkości rozpuszczalnika. Ta pierwsza stanowi parametr fizykochemiczny w równaniu **XXVII**, który determinuje opór jakiegoś doświadcza cząsteczka podczas ruchu w roztworze. Natomiast makrolepkość determinuje wolną objętość roztworu, w której może poruszać się cząsteczka. Aby zwiększyć mikrolepkości i określić KSVE stosuje się związki małowcząsteczkowe, jak glicerol, glikol etylenowy, glukoza czy sacharoza. Wielkocząsteczkowe dodatki, np. glikol polietylenowy (PEG), Ficoll-400 lub albumina wołowa (BSA), stosowane są jako kontrola do KSVE, by jednoznacznie potwierdzić, że obserwowany efekt jest wynikiem ograniczeń dyfuzyjnych, a nie efektem stłoczenia lub ruchu większych domen enzymu [98,105,106].

Określenie KSVE jest możliwe dzięki wyznaczeniu parametrów kinetycznych enzymu, np. stosując przybliżenie Michaelisa-Menten dla enzymu jednosubstratowego: stałej Michaelisa (K_m) i stałej katalitycznej (k_{cat}) w przypadku kinetyki mierzonej w stanie stacjonarnym, w roztworach o różnej lepkości. Dla reakcji opisanej schematem **XXV**, stałą katalityczną k_{cat} opisuje wzór **XXVIII**, natomiast iloraz k_{cat} i K_m wzór **XXIX**.

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_{-2} + k_3}$$

XXVIII

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_1 k_2 k_3}{k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3}$$

XXIX

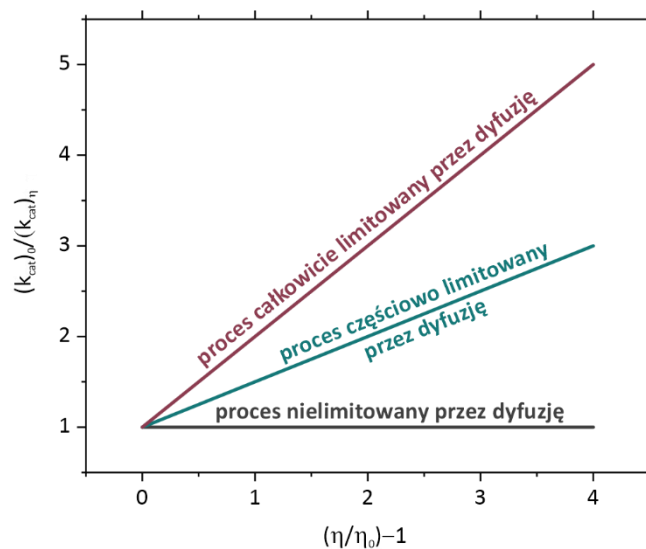
Stała k_{cat} niesie informacje nie tylko o etapie katalitycznym (k_2, k_{-2}), ale i o etapie uwalniania produktu (k_3). Z kolei wydajność katalityczna – k_{cat}/K_m informuje o etapach kinetycznych wiązania (k_1) i dysocjacji (k_{-1}) substratu do i z kompleksu E:S. Uzyskane z pomiarów kinetycznych dane przedstawia się w postaci znormalizowanej, odpowiednio $(k_{cat})_0/(k_{cat})_\eta$ lub $(k_{cat}/K_m)_0/(k_{cat}/K_m)_\eta$ w funkcji relatywnej lepkości η/η_0 , gdzie indeks 0 oznacza pomiar przy najniższej lepkości medium, a η przy każdej kolejnej. Do danych dopasowuje się funkcję liniową przedstawioną wzorem **XXX**, gdzie m to współczynnik kierunkowy prostej, reprezentujący stopień zależności znormalizowanego parametru kinetycznego od lepkości roztworu.

$$\frac{(k_{cat})_0}{(k_{cat})_\eta} = m \left(\frac{\eta}{\eta_0} - 1 \right) + 1 \quad \text{XXX}$$

Upraszczając, kiedy wartości współczynnika kierunkowego prostej m jest równa 1 dla wykresu $(k_{cat}/K_m)_0/(k_{cat}/K_m)_\eta$ lub $(k_{cat})_0/(k_{cat})_\eta$ (**Rys. 10**) można wnioskować, iż szybkość procesu wychwytu substratu lub uwalniania produktu przez enzym jest całkowicie limitowana przez dyfuzję. Gdy wartość m mieści się w zakresie od 0 do 1 procesy są jedynie częściowo limitowane dyfuzyjnie, a na wartość parametrów kinetycznych mają wpływ wszystkie stałe szybkości. Współczynnik kierunkowy prostej równy 0 informuje, że reakcja jest w pełni limitowana przez etap katalityczny. Natomiast gdy $m > 1$ lub $m < 0$, to wpływ czynnika zwiększającego lepkość nie jest ściśle powiązany z ograniczeniem dyfuzji cząstek, jednak może ono częściowo przyczyniać się do ogólnego efektu. W takim wypadku prawidłowa interpretacja wyniku wymaga dalszych badań strukturalnych, mechanistycznych lub obliczeniowych [98,106].

Wykres zależności znormalizowanych parametrów kinetycznych ($(k_{cat})_0/(k_{cat})_\eta$ lub $(k_{cat}/K_m)_0/(k_{cat}/K_m)_\eta$) od relatywnej lepkości (η/η_0) może mieć też przebieg ujemnej hiperboli, co świadczy o zachodzeniu wrażliwej na rozpuszczalnik wewnętrznej izomeryzacji kompleksu E:S bądź E:P. W niektórych przypadkach, gdy wewnętrzna równowaga kompleksów enzymatycznych jest zaburzona przez wysokie stężenie czynnika zwiększającego lepkość, na wykresie można zaobserwować też ujemną zależność liniową. W obu przypadkach można wykluczyć wpływ procesów dyfuzyjnych na tworzenie i rozpad kompleksów E:S i E:P. W przypadku ujemnej hiperboli parametry kinetyczne zmierzone w obecności czynnika zwiększającego lepkość są wyższe niż bez jego dodatku, co świadczy

o „preferencji” owego czynnika wobec wyższych form kompleksu w cyklu katalitycznym. Zaobserwowanie takiego przebiegu dla obu parametrów – k_{cat} i k_{cat}/K_m , gdy reakcja jest odwracalna pozwala stwierdzić, iż izomeryzacja zachodzi w przypadku kompleksu E:S, a nie E:P. Do tej pory w literaturze nie opisano aby wykres zależności $(k_{cat})_0/(k_{cat})_\eta$ lub $(k_{cat}/K_m)_0/(k_{cat}/K_m)_\eta$ od η/η_0 mógł mieć przebieg hiperboli dodatniej, prawdopodobnie dlatego, że trudno jest odróżnić go od trendu liniowego ze względu na błąd generowany podczas pomiaru parametrów kinetycznych [98,107].



Rys. 10. Wykres zależności $(k_{cat})_0/(k_{cat})_\eta$ od $(\eta/\eta_0)-1$ dla reakcji enzymatycznej **całkowicie limitowanej przez dyfuzję**, **częściowo limitowanej przez dyfuzję** i nielimitowanej dyfuzyjnie.

2. Cele pracy

Ogólnym celem niniejszej rozprawy było poznanie struktury krystalicznej Acmb, weryfikacja hipotezy mechanicznej dotyczącej reakcji katalizowanej przez bakteryjne Δ^1 -KSTD oraz zastosowanie Acmb do syntezy Δ^1 -odwodornionych steroidów.

Szczegółowe cele niniejszej rozprawy doktorskiej były następujące:

- **Charakterystyka strukturalna Acmb** – poznanie struktury czwartorzędowej białka i mechanizmów prowadzących do jego agregacji oraz poznanie struktury krystalicznej Acmb. Cel ten zakładał poszerzenie wiedzy na temat całej klasy Δ^1 -KSTD i uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy istnieją cechy strukturalne zwiększające powinowactwo enzymu do C17-rozbudowanych substratów. Poznanie struktury krystalicznej Acmb stanowiło też punkt wyjścia do identyfikacji kluczowych reszt aminokwasowych znajdujących się w centrum aktywnym enzymu i weryfikacji ich roli metodą ukierunkowanej mutagenyzy.
- **Charakterystyka biochemiczna Acmb** – określenie jak na stabilność i aktywność Acmb wpływają czynniki takie jak temperatura, pH czy obecność tlenu.
- **Charakterystyka katalityczna Acmb oraz KSTD1** – mająca na celu weryfikację hipotezy przypisującej zdolność do odwodornienia C17-rozgałęzionych 3-ketosteroidów tylko nielicznym Δ^1 -KSTD (np. Acmb).
- **Weryfikacja postulowanego w literaturze hipotetycznego mechanizmu reakcji prowadzonej przez Δ^1 -KSTD** – przez identyfikację i określenie roli kluczowych aminokwasów w centrum aktywnym Acmb, określenie kinetycznego efektu izotopowego dla Acmb i KSTD1 oraz wyznaczenie kinetycznego efektu lepkości rozpuszczalnika dla KSTD1, co pozwoliłoby wskazać etap limitujący szybkość katalizowanej reakcji.
- **Opracowanie wydajnego procesu syntezy Δ^1 -3-ketosteroidów z użyciem Acmb jako katalizatora** – identyfikacja optymalnych warunków reakcji, w tym najefektywniejszej frakcji enzymu oraz optymalnego sztucznego akceptora elektronowego. Docelowo celem tej części pracy było przeprowadzenie syntezy na większą skalę szeregu Δ^1 -3-ketosteroidów o znaczeniu farmakologicznym z zastosowaniem Acmb.

3. Metodyka badań

Wszystkie materiały użyte do eksperymentów zostały zakupione w Sigma-Aldrich (Merck), Carl Roth, Tokyo Chemical Industry, BioShop, Cyclolab lub POCH (Avantor), chyba że określono inaczej. Wszystkie odczynniki posiadały czystość na poziomie co najmniej cz.d.a.

3.1. Produkcja, oczyszczanie i charakterystyka Δ^1 -KSTD

W niniejszym rozdziale przedstawiono zoptymalizowane warunki produkcji i oczyszczania Δ^1 -KSTD oraz metody stosowane do określenia ich stężenia w uzyskanych preparatach. Ponadto opisano techniki wykorzystane do określenia struktury czwartorzędowej Acmb – filtrację żelową i dynamiczne rozpraszanie światła (DLS).

3.1.1. Produkcja rekombinowanych enzymów w *Escherichia coli*

Acmb

Gen kodujący Acmb został wklonowany do wektora pMCSG7 [108] i transformowany do ukompetentnionych chemicznie komórek *Escherichia coli* BL21 (DE3) Magic (Creative Biolabs). Komórki *E. coli* hodowano w 50 mL 2% (w/v) pożywki Lennox Broth (LB) z dodatkiem ampicyliny w stężeniu 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ oraz kanamycyny w stężeniu 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ w temperaturze 37°C, przy 180 rpm przez noc. Następnie wstępna kultura bakteryjna została rozcieńczona tysiąckrotnie w 1 L LB z dodatkiem antybiotyków, a bakterie hodowano w analogicznych warunkach do momentu, w którym ich gęstość optyczna przy długości fali 600 nm (OD_{600}) osiągnęła wartość 0,6. Kolejno temperatura hodowli została zredukowana do 16°C, a nadprodukcja Acmb zaindukowana 250 μM izopropyl- β -D-1-tiogalaktopiranozydem (IPTG). Po 24 h komórki bakteryjne zostały zebrane poprzez wirowanie przy przyspieszeniu kątowym 4500 g i w temperaturze 4°C przez 1 h. Osad bakteryjny został rozcieńczony w proporcji 1:5 (w/v) w buforze 50 mM Tris-HCl pH 8,5, zawierającym 150 mM NaCl, 5 mM imidazol, 5 mM 2-merkaptoetanol (BME), 10% (w/v) glicerol i 100 μM fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF). Następnie zawiesina komórek została poddana lizie z wykorzystaniem ultrasonifikacji (Sonics Vibra-Cell VCX500, cykle: 3 s on, 5 s off, przez 5 min, amplituda 40%, energia 150 000 J). Rozbite komórki inkubowano z dodatkiem 0,5% (v/v) Triton X-100 i 100 μM FAD przez noc w 4°C,

po czym resztki komórek bakteryjnych oddzielono od nadsącza poprzez ultrawierowanie przy przyspieszeniu 40000 g, w temperaturze 4°C przez 1 h.

KSTD1

Gen kodujący KSTD1 został wklonowany do wektora pET15b [23] i transformowany do ukompetentnionych chemicznie komórek *Escherichia coli* BL21 (DE3) Magic. Komórki *E. coli* hodowano w 50 mL 2% (w/v) pożywki LB z dodatkiem ampicyliny w stężeniu 100 µg mL⁻¹ oraz kanamycyny w stężeniu 50 µg mL⁻¹ w temperaturze 37°C, przy 180 rpm przez noc. Następnie wstępna kultura bakteryjna została rozcieńczona tysiąckrotnie w 1 L LB z dodatkiem 0,5 M D-sorbitolu i antybiotyków, a bakterie hodowano w analogicznych warunkach do momentu, gdy wartość OD₆₀₀ osiągnęła 0,6. Kolejno temperatura hodowli została zredukowana do 16°C, a nadprodukcja KSTD1 zaindukowana 100 µM IPTG. Po 48 h komórki bakteryjne zostały zebrane poprzez wirowanie przy przyspieszeniu 4500 g i w temperaturze 4°C przez 1 h. Osad bakteryjny został rozcieńczony w proporcji 1:5 (w/v) w buforze 50 mM Tris-HCl pH 8,0, zawierającym 100 mM NaCl, 10 mM imidazol, 5 mM BME, 10% (w/v) glicerol i 100 µM PMSF. Następnie zawiesina komórek została poddana lizie z wykorzystaniem ultrasonikacji (Sonics Vibra-Cell VCX500, cykle: 3 s on, 5 s off, przez 5 min, amplituda 40%, energia 150 000 J), a resztki komórek bakteryjnych oddzielono od nadsącza poprzez ultrawierowanie przy przyspieszeniu 40000 g, w temperaturze 4°C przez 1 h.

3.1.2. Chromatografia powinowactwa

Pierwszy etap oczyszczania obu Δ¹-KSTD stanowiła chromatografia powinowactwa. Wykorzystano powinowactwo metki histydynowej (polipeptydu złożonego z 6 histydyn), dołączonej do białek na etapie projektowania konstruktów genetycznych, do immobilizowanych jonów niklu stanowiących wypełnienie kolumny chromatograficznej. Oczyszczanie odbywało się z zastosowaniem szybkiej chromatografii cieczowej białek (FPLC; BioRad NGC Quest 10 Plus) oraz kolumn HisTrap HP o objętości 5 mL (Cytiva), których wypełnienie stanowiła sefaroza z immobilizowanymi jonami niklu, przy przepływie 5 mL min⁻¹. Zbierano frakcje elucji absorbujące promieniowanie z zakresu UV-Vis o długości 450 nm, jako że przy tej długości fali promieniowanie absorbuje znajdujący się w centrum aktywnym obu enzymów kofaktor FAD [109]. Po tym

etapie oczyszczania uzyskiwano preparat enzymatyczny o czystości wystarczającej do przeprowadzenia testów aktywności.

AcmB

Uzyskany po odwirowaniu komórek nadsącz został zaaplikowany na kolumnę HisTrap HP. Następnie, aby pozbyć się białek niespecyficznie związanych ze złożem kolumna została przepłukana 8 objętościami (CV) buforu 50 mM Tris-HCl pH 8,5, zawierającego 150 mM NaCl, 15 mM imidazol, 5 mM BME, 10% (w/v) glicerol i 0,5% (v/v) Triton X-100. AcmB zostało wypłukane z kolumny w kolejnym kroku, przy użyciu 8 CV analogicznego buforu o wyższym stężeniu imidazolu, równym 300 mM. Frakcje absorbujące promieniowanie UV-Vis o długości fali 450 nm zebrano, poddano całonocnej dializie do buforu 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 150 mM NaCl, 5 mM BME, 10% (w/v) glicerol, 0,05% Triton X-100 i przechowywano w temperaturze -20°C .

W przypadku frakcji enzymu przeznaczonych do późniejszej krystalizacji, na etapie całonocnej dializy do białka dodano proteazę wirusa wżerkowej plamistości tytoniu (TEV), celem odcięcia metki histydynowej od reszty białka.

KSTD1

Uzyskany po odwirowaniu komórek nadsącz został zaaplikowany na kolumnę HisTrap HP. KSTD1 eluowano z kolumny z zastosowaniem 10 CV buforu 50 mM Tris-HCl pH 8,0, zawierającego 100 mM NaCl, 5 mM BME, 10% (w/v) glicerol, w gradiencie imidazolu od 10 mM do 300 mM. Frakcje absorbujące promieniowanie UV-Vis o długości fali 450 nm zebrano, poddano całonocnej dializie do opisanego wcześniej buforu, niezawierającego imidazolu i przechowywano w temperaturze -20°C .

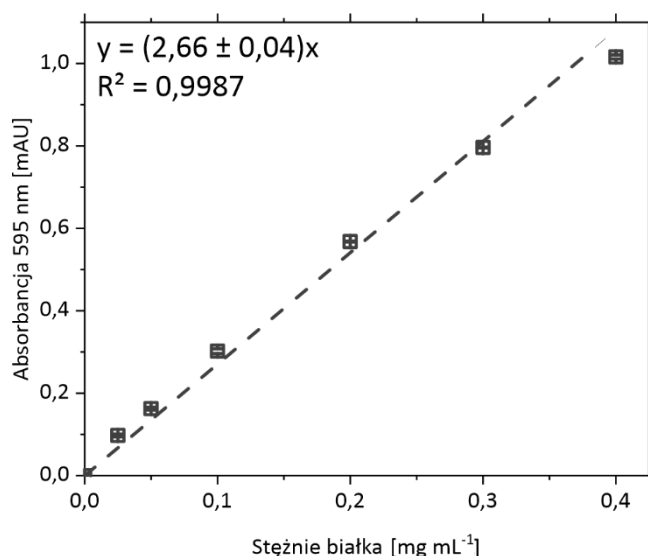
3.1.3. Oznaczanie stężenia białka

Stężenie oczyszczonego białka było określane metodą Bradforda [110] oraz poprzez ilościowe oznaczenie zawartości FAD w frakcji enzymu. Porównanie obu wartości umożliwiło oszacowanie procentowej zawartości kofaktora w preparacie enzymatycznym.

Metoda Bradforda

Przygotowano roztwory BSA w jałowej wodzie o następujących stężeniach: $0,025\text{ mg mL}^{-1}$, $0,05\text{ mg mL}^{-1}$, $0,1\text{ mg mL}^{-1}$, $0,2\text{ mg mL}^{-1}$, $0,3\text{ mg mL}^{-1}$ oraz $0,4\text{ mg mL}^{-1}$. Tak przygotowane roztwory zmieszano w proporcji 1:9 (v/v) z odczynnikiem Bradforda i inkubowano w ciemności przez 5 min. Po tym czasie dokonano pomiaru absorbancji

roztworu przy fali o długości 595 nm z użyciem spektrometru UV-Vis (Shimadzu UV-2700) i na podstawie uzyskanych wyników wykreślono krzywą wzorcową (**Rys. 11**). Analogicznie postępowano z próbkami białka.



Rys. 11. Krzywa wzorcową stężenia białka oznaczanego metodą Bradforda.

Zawartość FAD

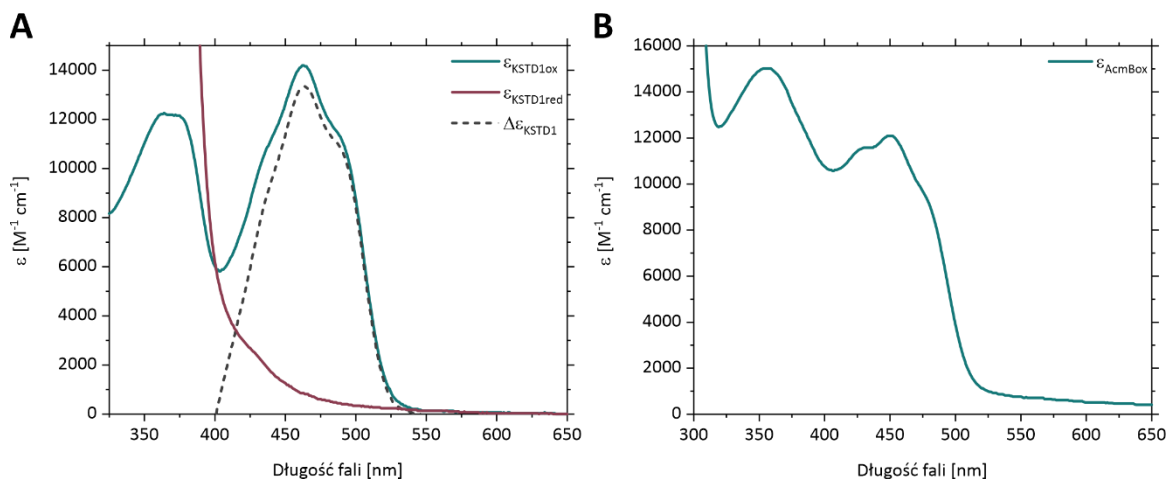
W celu określenia molowego współczynnika ekstynkcji Δ^1 -KSTD-FAD (ϵ_{KSTDox}) zmierzono widmo UV-vis białek w zakresie 300–650 nm przed i po denaturacji cieplnej próbki w temperaturze 90°C przez 10 min. ϵ_{KSTDox} wyliczono z wzoru **XXXI**, gdzie współczynnik ekstynkcji wolnego FAD przy długości fali równej 450 nm wynosi 11300 M⁻¹ cm⁻¹ [109]. Wyniki dla tej długości fali przedstawiono w **Tab. 1**.

$$\epsilon_{KSTDox} = \frac{\text{wartość absorbancji przed denaturacją}}{\text{wartość absorbancji po denaturacji}} \times 11300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad \text{XXXI}$$

Tab. 1. Wartość molowego współczynnika ekstynkcji Acmb i KSTD1 przy długości fali 450 nm.

Parametr	Acmb	KSTD1
ϵ_{KSTDox} [M ⁻¹ cm ⁻¹]	12094	12627
$\Delta\epsilon_{KSTD}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	–	11368

$\Delta\epsilon_{KSTD}$ wyznaczono spektrofotometrycznie jako różnicę pomiędzy widmem KSTD1 z utlenionym FAD a widmem enzymu z flawiną zredukowaną nadmiarem ditionianu (III) sodu w warunkach beztlenowych (98:2 (v/v) N₂:H₂), podzieloną przez stężenie białka. Wartości molowego współczynnika ekstynkcji utlenionego KSTD1 i Acmb, zredukowanego KSTD1 oraz $\Delta\epsilon_{KSTD1}$ zależne od długości fali zostały przedstawione na **Rys. 12**.



Rys. 12. Zależność wartości molowego współczynnika ekstynkcji **utlenionej** i **zredukowanej** formy KSTD1 oraz $\Delta\epsilon_{KSTD1}$ **(A)**, i **utlenionej** formy AcmbB **(B)** od długości fali.

Stężenie białka obsadzonego kofaktorem oznaczano poprzez wykonanie pomiaru absorpcji UV-Vis w zakresie od 300–650 nm. Wartość absorpcji odczytana dla fali o długości 450 nm posłużyła do wyznaczenia stężenia białek na podstawie prawa Lamberta-Beera i wyznaczonych molowych współczynników ekstynkcji dla utlenionych Δ^1 -KSTD (ϵ_{KSTDox}) **(XXXII)**.

$$C = \frac{A}{\epsilon_{KSTDox} l} \quad \begin{array}{l} C - \text{stężenie [M]} \\ A - \text{absorbancja} \\ \epsilon_{KSTDox} - \text{molowy współczynnik ekstynkcji [M}^{-1} \text{cm}^{-1}] \\ l - \text{długość drogi optycznej [cm]} \end{array} \quad \text{XXXII}$$

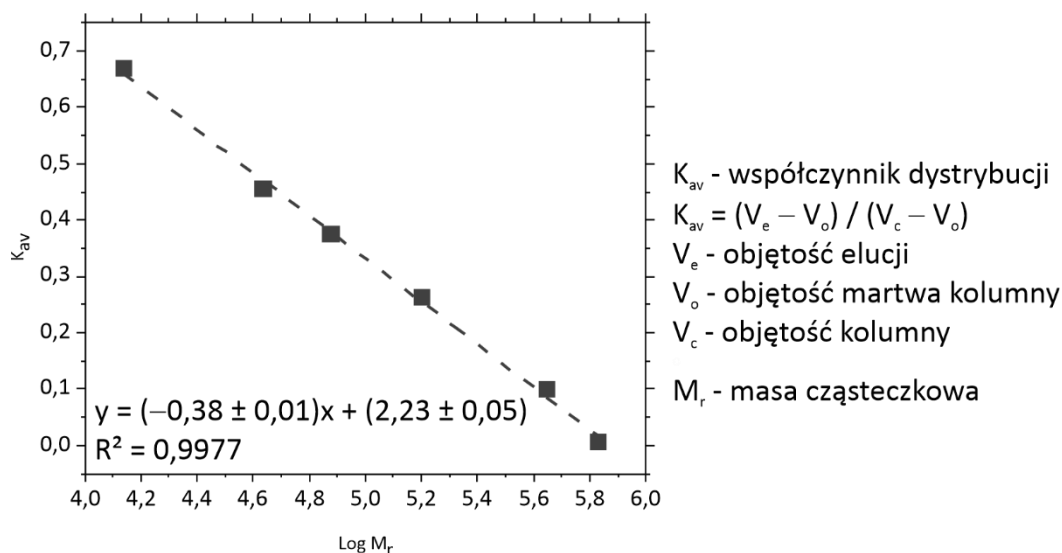
3.1.4. Filtracja żelowa

Drugi etap oczyszczania, stosowany wyłącznie w przypadku AcmbB, stanowiła filtracja żelowa. Ta technika chromatograficzna pozwala na rozdział białek ze względu na ich ciężar cząsteczkowy. Zastosowanie dodatkowego etapu oczyszczania podnosi czystość preparatu enzymatycznego. Ponadto filtracja żelowa umożliwia określenie struktury czwartorzędowej białka, poprzez przybliżone oznaczenie masy molowej eluowanej frakcji białka. Oczyszczanie odbywało się z zastosowaniem systemu FPLC oraz kolumny chromatograficznej HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (Cytiva), której matrycę stanowi dekstran w połączeniu z wysoko usieciowaną agarozą, przy przepływie 1 mL min^{-1} . Kolumna jest w stanie rozdzielać białka w zakresie mas od ok. 10 kDa do 600 kDa.

Krzywa kalibracyjna

Zgodnie z zaleceniami producenta kolumny jej objętość martwą wyznaczono przy użyciu dekstranu o masie 2000 kDa. Krzywa kalibracyjna **(Rys. 13)** została wyznaczona na

podstawie czasów wymywania następujących białek: rybonukleazy A (13,7 kDa), owalbuminy (43 kDa), konalbuminy (75 kDa), aldolazy (158 kDa), ferrytyny (440 kDa) oraz tyroglobuliny (669 kDa).



Rys. 13. Krzywa wzorcowa rozdziłu białek na kolumnie HiLoad 16/600 Superdex 200 pg.

Oczyszczanie Acmb

Celem określenia struktury czwartorzędowej i deagregacji Acmb poddano filtracji żelowej z użyciem detergentu. Po dializie białko zostało zatężone z wykorzystaniem wirówkowych jednostek filtracyjnych Amicon Ultra (Merck) o odcięciu masy molekularnej (MWCO) równym 50 kDa lub 100 kDa. Enzym eluowano z kolumny buforem 50 mM Tris-HCl pH 8,5, zawierającym 150 mM NaCl, 5 mM BME oraz odpowiednio 0%, 0,1% i 0,2% (v/v) Tween 20.

W przypadku frakcji białka, które było przeznaczone do krystalizacji na tym etapie oczyszczania zastosowano bufor o następującym składzie: 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM chlorowodorek tris-(2-karboksyetylo)fosfiny (TCEP), 0,2% (v/v) Tween 20.

Odsalanie Acmb

Aby zmienić pH buforu, w którym znajdowało się Acmb po oczyszczeniu z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa, białko odsalano z użyciem kolumn grawitacyjnych Econo-Pac 10DG (BioRad) do buforów: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5% (w/v) glicerol (pH 7,5, 8,0 i 8,5) oraz 50 mM glicyna-NaOH, 150 mM NaCl, 5% (w/v) glicerol (pH 9,0 i 10,0), zgodnie z zaleceniami producenta. Tak przygotowane białko posłużyło do oznaczenia optimum pH (**Rozdział 3.4.2**).

3.1.5. Dynamiczne rozpraszanie światła

Z zastosowaniem techniki DLS określono średnią średnicę hydrodynamiczną Acmb. Białko o stężeniu $20,8 \text{ mg mL}^{-1}$ potraktowano 0,5% (w/v) laurylosiarczanem sodu (SDS). Następnie enzym rozcieńczono odpowiednio w buforze $100 \text{ mM K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 6,5. Finalne stężenie SDS każdorazowo wynosiło 0,02% (w/v). Pomiaru średnicy hydrodynamicznej enzymu dokonano w funkcji stężenia białka, w zakresie $30\text{--}250 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ z zastosowaniem aparatu Zetasizer ZS Malvern ZEN 3600. W osobnym eksperymencie wykonano pomiar DLS 0,02% roztworu SDS w $100 \text{ mM K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 6,5 celem upewnienia się, że w zadanych warunkach SDS nie tworzy miceli, które mogłyby zafałszować pomiar średnicy hydrodynamicznej białka. Średnica hydrodynamiczna białka została wyznaczona z równania Stokesa-Einsteina (XXVII).

3.2. Krystalizacja i udokładnianie struktury Acmb

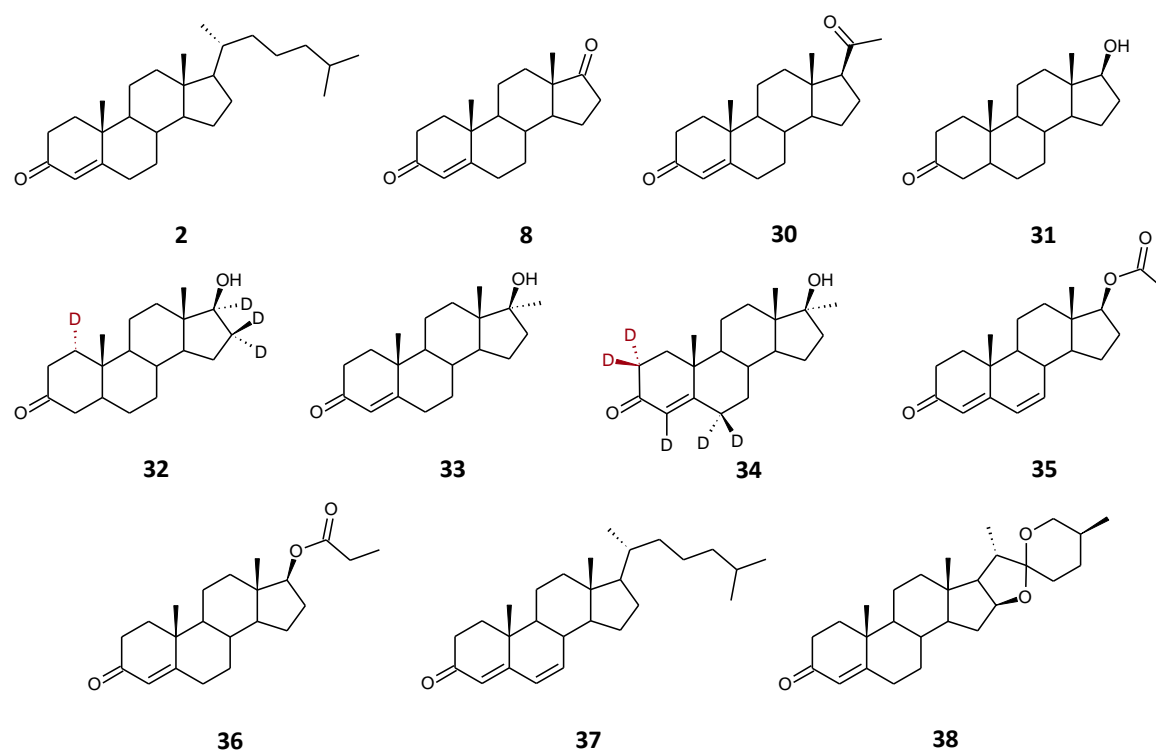
Po drugim etapie oczyszczania, tj. filtracji żelowej, Acmb zostało zatężone do 20 mg mL^{-1} i było inkubowane na lodzie z nadmiarem molowym ADD (9; Rys. 2) przez około 3 h. Następnie roztwór zwirowano przy 14000 g i 4°C przez 5 min. Optymalnych warunków krystalizacyjnych poszukiwano z użyciem dostępnych komercyjnie zestawów: MCSG1, MCSG2, MCSG3, Top96, SuperCOMBI, PurePEGs (Anatrace), Index, Silver Bullets i PEG/Ion HT (Hampton Research). Krystalizację przeprowadzono w temperaturze 4°C wykorzystując metodę dyfuzji par, techniką kropli siedzącej, mieszając roztwór krystalizacyjny 1:1 (v/v) z roztworem białka (o stężeniu 20 mg mL^{-1} w buforze 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 150 mM NaCl , $0,5 \text{ mM TCEP}$, $0,2\%$ (v/v) Tween 20). Kryształ o jakości pozwalającej na rejestrację danych dyfrakcyjnych otrzymano w następujących warunkach: $100 \text{ mM HEPES NaOH}$ pH 7,5, 25% (w/v) PEG 3350 (warunek nr 94, MCSG1). Kryształ został umieszczony nad 1 M roztworem NaCl w celu usunięcia rozpuszczalnika i szybko schłodzony w ciekłym azocie w celu bezpiecznego przetransportowania do ośrodka synchrotronowego.

Pomiary strukturalne wykonano na synchrotronie BESSY (Berlin Electron Storage Ring Society) na wiązce BL 14.1 z użyciem detektora PILATUS3 S 6M (Dectris). Pomiary prowadzono w -173°C (100 K), przy długości fali $0,9184 \text{ \AA}$. Redukcję danych, a następnie skalowanie wykonano programami CrysAlis^{Pro} [111] i XDS [112]. Struktura Acmb została rozwiązana z wykorzystaniem metody podstawienia molekularnego (MR), z użyciem jako

modelu początkowego struktury KSTD1 (PDB ID: 4C3Y) [24]. Rozwiązanie struktury i budowę modelu wykonano przy pomocy programów pakietu Phenix (AutoBuild) [113] i CCP4 (ARP/wARP, BUCCANEER) [114]. Otrzymany model został udokładniony z pomocą oprogramowania REFMAC 5.8 [115] i przebudowany w programie WinCOOT 0.8.9.2 [116]. Jakość modelu oceniono z wykorzystaniem serwisu MolProbity [117] oraz wwPDB Validation Service [118]. Struktura została zdeponowana w bazie PDB – ID: 7P18. Analizy struktury dokonano przy użyciu programów: PyMOL [119], Chimera 1.15 [120], Discovery Studio [121] oraz serwera PPM 3.0 [122].

3.3. Spektrofotometryczny pomiar aktywności Δ^1 -KSTD

W niniejszym rozdziale opisano spektrofotometryczne testy aktywności w stanie stacjonarnym i przedstacjonarnym, które posłużyły do określenia aktywności właściwej oraz parametrów kinetycznych Δ^1 -KSTD. Na **Rys. 14** przedstawiono struktury wszystkich substratów testowanych w pracy.



Rys. 14. Substraty testowane w pracy: cholest-4-en-3-on (**2**), androst-4-en-3,17-dion (**8**), progesteron (**30**), dihydrotestosteron (**31**), 17β-hydroksy-5α-androstan-3-on-1α,16,16,17-d₄ (**32**), 17-metylotestosteron (**33**), 4-androsten-17α-metylo-17β-ol-3-on-2,2,4,6,6-d₅ (**34**), octan 6-dehydrotestosteronu (**35**), propionian testosteronu (**36**) cholest-4,6-dien-3-on (**37**) oraz diosgenon (**38**).

3.3.1. W stanie stacjonarym

Aktywność Δ^1 -KSTD (rozumianą jako początkową szybkość reakcji) standardowo określano w teście spektrofotometrycznym. Posłużył on do wyznaczenia: optimum temperaturowego oraz stabilności termicznej Acmb (**Rozdział 3.4.1**), optimum pH Acmb zależnego od akceptora elektronowego oraz stabilności białka zależnej od pH (**Rozdział 3.4.2**), parametrów kinetycznych dla Acmb i wybranych akceptorów elektronowych (**Rozdział 3.5.1**), parametrów kinetycznych dla Δ^1 -KSTD i wybranych steroidów (**Rozdział 3.5.3**) oraz aktywności mutantów Acmb (**Rozdział 3.7.1**).

Do pomiarów użyto kuwet kwarcowych o objętości 0,5 mL i drodze optycznej równej 10 mm. Mieszanina reakcyjna składała się z 100 mM buforu K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6,5, 100 μ M progesteronu (PG; **30**; **Rys. 14**) w izopropanolu (IPA; stężenie końcowe 2% (v/v)), 200 μ M DCPIP oraz 0,15–15,2 μ M Acmb. Reakcja była inicjowana poprzez dodatek enzymu. Pomiar prowadzono w temperaturze 30°C, a każdy pomiar był powtórzony trzykrotnie. Szybkość reakcji określono na podstawie obserwacji redukcji DCPIP i związanego z nią spadku absorbancji przy długości fali 700 nm ($\Delta\varepsilon_{700}^{DCPIP} = 4576 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Do pierwszych 5–10 s przebiegu krzywych dopasowano prostą metodą regresji liniowej (OriginPro 2019) i na podstawie otrzymanej wartości bezwzględnej współczynnika kierunkowego prostej wyznaczono szybkość początkową reakcji zgodnie z wzorem **XXXIII**.

$$v = \frac{\Delta C_S}{\Delta t} = \frac{\Delta C_{AE}}{\Delta t} = \frac{|a| \cdot 60}{\Delta \varepsilon_{AE} \cdot l} \quad \text{XXXIII}$$

v – szybkość reakcji [M min^{-1}]
 C_S – stężenie substratu [M]
 C_{AE} – stężenie akceptora elektronowego [M]
 t – czas [min]
 $|a|$ – współczynnik kierunkowy prostej [s^{-1}]
 ε_{AE} – współczynnik ekstynkcji akceptora elektronowego [$\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
 l – długość drogi optycznej [cm]

3.3.2. W stanie przedstacjonarym

Parametry kinetyczne dla eksperymentów opisanych w **Rozdziałach 3.4.2, 3.7.2** oraz **3.7.3** uzyskano z zastosowaniem techniki zatrzymanego przepływu. Przebieg redukcji FAD był monitorowany przy fali o długości 450 nm z wykorzystaniem spektrofotometru SX20 (Applied Photophysics) z detektorem DAD lub fotopowielaczem. Dane zostały zebrane z wykorzystaniem oprogramowania Pro-Data SX. Pomiarów dokonano

w temperaturze 30°C, kontrolowanej przy użyciu termostatu Labo Plus (PolyScience). Wszystkie użyte roztwory zostały przedmuchane argonem w celu zapewnienia warunków beztlenowych. Przy każdym z pomiarów jedną szklaną strzykawkę aparatu napełniano roztworem steroidu, a drugą roztworem enzymu. Opisane w **Rozdziałach 3.4.2, 3.7.2 oraz 3.7.3** stężenia odpowiadają stężeniom końcowym – po zmieszaniu reagentów. Każdy eksperyment powtórzono 8–15 razy. Do uzyskanych przebiegów reakcji dopasowano funkcję mono-eksponencjalną **XXXIV** (OriginPro 2019), gdzie λ jest obserwowaną szybkością zaniku utlenionej formy flawiny (tzw. wartością własną).

$$A = A_0 e^{-\lambda t} + y_0 \quad \text{XXXIV}$$

3.4. Charakterystyka biochemiczna Acmb

Charakterystyka biochemiczna Acmb obejmowała określenie optimum temperaturowego, stabilności termicznej w warunkach tlenowych i beztlenowych oraz optimum pH reakcji dehydrogenacji w obecności wybranych sztucznych akceptorów elektronowych i bez ich dodatku. Oznaczono także stabilność enzymu zależną od pH roztworu, w którym białko było przechowywane.

3.4.1. Optimum temperaturowe Acmb

Aby określić optimum temperaturowe reakcji dehydrogenacji katalizowanej przez Acmb przeprowadzono spektrofotometryczne testy aktywności (**Rozdział 3.3.1**) w temperaturze odpowiednio 20°C, 30°C, 35°C, 40°C oraz 50°C.

Celem oznaczenia stabilności termicznej Acmb białko inkubowano na lodzie (4°C), bądź w łaźni wodnej w temperaturze 30°C i 50°C przez 4 h. Co 30 min wykonywano test aktywności w opisanych wcześniej warunkach (**Rozdział 3.3.1**). Analogicznie sprawdzono stabilność enzymu przechowywanego w warunkach beztlenowych (98:2 (v/v) N₂:H₂).

3.4.2. Optimum pH Acmb

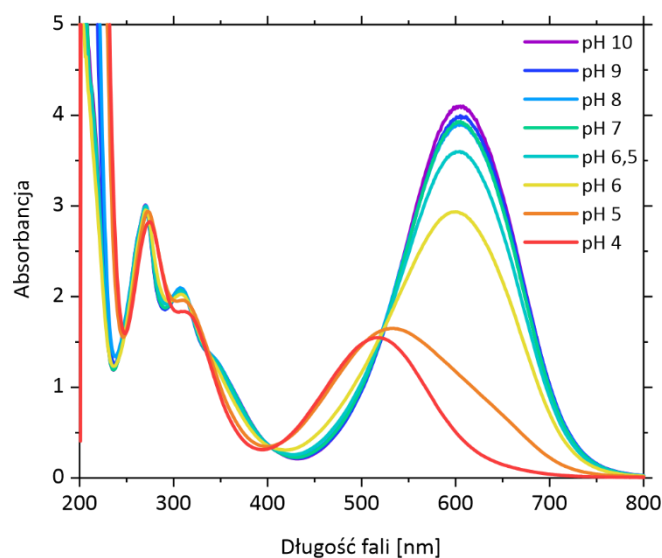
Optimum pH Acmb zależne od akceptora elektronowego

Optimum pH reakcji dehydrogenacji określono w spektrofotometrycznym teście aktywności (**Rozdział 3.3.1**) wobec różnych akceptorów elektronowych – DCPIP (**25; Rys. 7**), PMS (**24**), układu PMS/DCPIP oraz heksacyjanożelazianu (III) potasu (**29**). W eksperymentach wykorzystano następujące bufony: 100 mM bufor cytrynianowy (pH 4,0–5,0), 100 mM bufor K₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH 6,0–8,0) oraz 100 mM bufor glicyna-NaOH

(pH 9,0–10,0). Z kolei stężenie akceptorów elektronowych wynosiło: 200 μM DCPIP, 200 μM PMS/200 μM DCPIP ($\Delta\varepsilon^{DCPIP}$ zależny od pH), 200 μM PMS ($\Delta\varepsilon_{400}^{PMS} = 4805 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) lub 2,5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($\Delta\varepsilon_{440}^{K_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]} = 583 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Ze względu na wrażliwość PMS na tlen i światło, pomiarów z tym akceptorem elektronowym dokonano z zastosowaniem techniki zatrzymanego przepływu w warunkach beztlenowych.

Molowy współczynnik ekstynkcji DCPIP

Ze względu na zmiany zachodzące w widmie UV-Vis DCPIP wraz ze zmianą pH buforu (**Rys. 15**) wyznaczono molowy współczynnik ekstynkcji związku w zakresie pH 4,0–10,0 i długości fali 200–800 nm. Maksima absorbancji DCPIP przypadły przy 700 nm (pH 6,0–10,0), 530 nm (pH 5,0) oraz 520 nm (pH 4,0) (**Tab. 2**). Pomiary przeprowadzono w 200 μM roztworze DCPIP w opisanych wyżej buforach.



Rys. 15. Widmo UV-Vis DCPIP w zakresie pH 4–10.

Tab. 2. Wartość molowego współczynnika ekstynkcji DCPIP zależna od pH dla pasma w zakresie 400–750 nm.

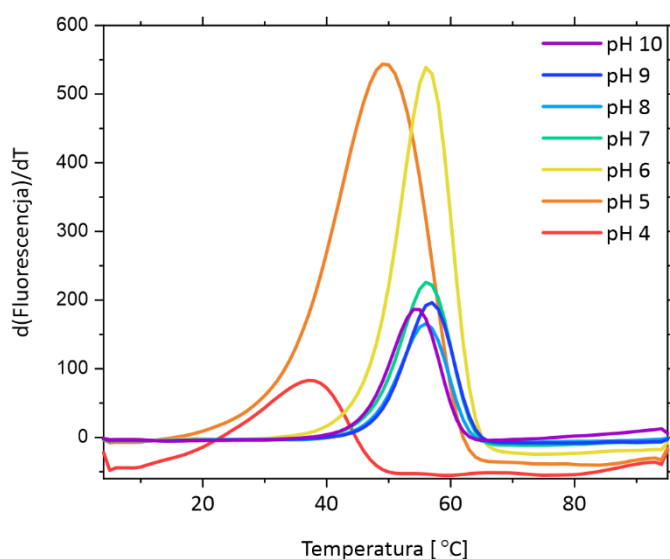
pH	Długość fali [nm]	Molowy współczynnik ekstynkcji DCPIP $\Delta\varepsilon^{DCPIP} [\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$
4,0	520	7935
5,0	530	8464
6,0		3652
6,5		4576
7,0	700	5023
8,0		5100
9,0		5280
10,0		5274

Optimum pH Acmb niezależne od akceptora elektronowego

Pomiaru niezależnego od akceptora elektronowego optimum pH dehydrogenacji dokonano z wykorzystaniem techniki zatrzymanego przepływu (**Rozdział 3.3.2**). Mieszanina reakcyjna zawierała bufor 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5% (w/v) glicerol (pH 7,5, 8,0 i 8,5) lub 50 mM glicyna-NaOH, 150 mM NaCl, 5% (w/v) glicerol (pH 9,0 i 10,0), 9,3 μ M Acmb w buforach o odpowiednim pH (**Rozdział 3.1.4 – Odsalanie Acmb**) oraz 100 μ M PG (**30**) w 2-metoksyetanolu (EGME; stężenie końcowe 8% (v/v)). Pomiaru wykonano w temperaturze 20°C. Przebieg reakcji obserwowano przez 0,5 s. Do otrzymanych przebiegów dopasowano funkcję dwu-eksponencjalną (OriginPro 2019).

Stabilność Acmb zależna od pH

Podobnie jak w przypadku badania stabilności termicznej (**Rozdział 3.4.1**), stabilność Acmb zależną od pH określono inkubując białko w buforze o pH 6,5, 8,0 lub 9,0, w temperaturze 4°C przez 2 h. Standardowy pomiar aktywności enzymu (**Rozdział 3.3.1**) wykonywano co 30 min.



Rys. 16. Krzywe denaturacji termicznej Acmb zależnej od pH.

Określono również termostabilność Acmb zależną od pH z wykorzystaniem techniki *ThermoFAD* [123], umożliwiającej oznaczenie temperatury topnienia (rozfałdowania) białka poprzez monitorowanie sygnału fluorescencyjnego emitowanego przez uwalniany z centrum aktywnego kofaktor FAD. Oczyszczone i zatężone do 10 mg mL^{-1} Acmb rozcieńczono w proporcji 1:4 (v/v) w buforach opisanych w podpunkcie **Optimum pH Acmb zależne od akceptora elektronowego** (całkowita objętość 25 μ L). Krzywe denaturacji termicznej wyznaczono poprzez pomiar intensywności fluorescencji

FAD przy 470 nm (**Rys. 16**). Sygnał monitorowano w zakresie temperatur od 4°C do 95°C, a tempo wzrostu temperatury wynosiło 1°C na 15 s. Termostabilność oznaczono z użyciem termocyklera CFX96 RT PCR (BioRad).

3.5. Charakterystyka katalityczna Δ^1 -KSTD

W ramach charakterystyki katalitycznej Acmb określono parametry kinetyczne w stanie stacjonarnym wybranych, sztucznych akceptorów elektronowych. Sprawdzone także wydajność działania potencjalnych naturalnych akceptorów elektronowych w warunkach reaktorowych. Celem porównania spektrum substratowego Δ^1 -KSTD wyznaczono parametry kinetyczne w stanie stacjonarnym dla Acmb i KSTD1 oraz wybranych steroidów.

3.5.1. Kinetyka w stanie stacjonarnym dla Acmb i akceptorów elektronowych

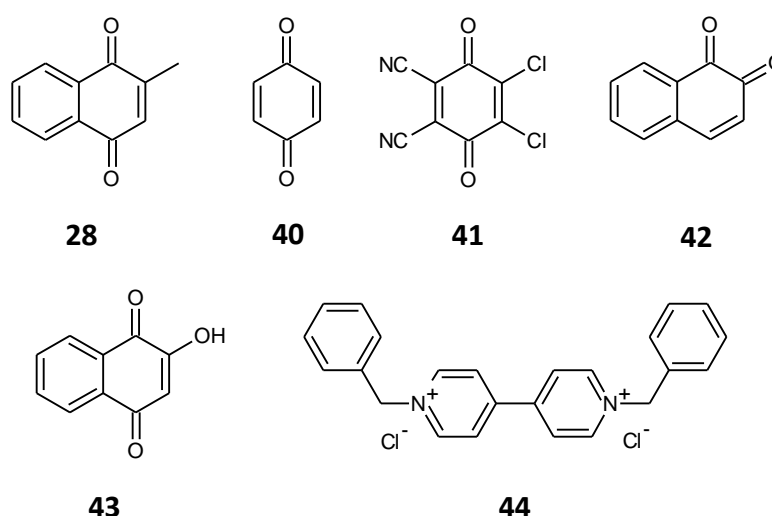
Parametry kinetyczne w stanie stacjonarnym dla sztucznych akceptorów elektronowych i Acmb zostały wyznaczone w teście spektrofotometrycznym (**Rozdział 3.3.1**), w zakresie stężeń: 20–500 μ M DCPIP, 0,1–2 mM PMS (w układzie PMS-DCPIP przy 200 μ M stężeniu DCPIP) oraz 0,25–4 mM $K_3[Fe(CN)_6]$. Do otrzymanych danych dopasowano metodą regresji nieliniowej model Michaelisa-Menten (OriginPro 2019).

3.5.2. Naturalny akceptor elektronowy

Aby sprawdzić, czy któryś ze związków pełniących rolę naturalnych akceptorów elektronowych dehydrogenaz [124] może być reutleniaczem Acmb, przetestowano szereg chinonów (**28, 40–43; Rys. 17**) oraz wiologen benzyłowy (**44**) w warunkach reaktorowych.

Roztwory wyjściowe 1,4-benzochinonu (**40**) oraz wiologenu benzyłowego (**44**) przygotowano w wodzie, 2-metylo-1,4-naftochinonu (**28**), 2,3-dichloro-5,6-dicyjano-1,4-benzochinonu (**41**) i 2-hydrokso-1,2-naftochinonu (**43**) w IPA, a 1,2-naftochinonu (**42**) w dioksanie. Mieszanina reakcyjna składała się z 100 mM buforu K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6,5 lub 8,0, 200 μ M każdego z wymienionych powyżej związków, 100 μ M PG w IPA (stężenie końcowe 2% lub 3% (v/v)), oraz 0,70 μ M Acmb. Reakcje przesiewowe prowadzono w jednym powtórzeniu w termobloku, w temperaturze 30°C, przy 800 rpm przez 20 h. Stężenie steroidów, a tym samym stopień konwersji substratu, zostało oznaczone z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z zastosowaniem

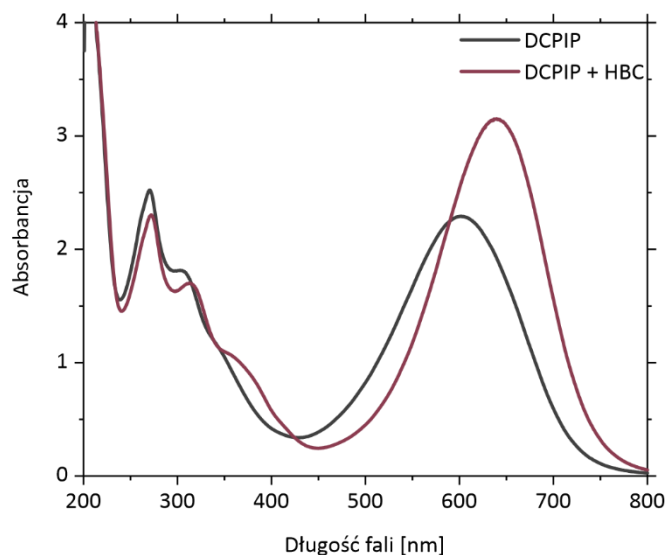
kalibracji na wzorcach zewnętrznych. Warunki analizy HPLC opisano w dalszej części pracy (**Rozdział 3.8.1**).



Rys. 17. Struktury potencjalnych naturalnych akceptorów elektronowych: menadion – 2-metylo-1,4-naftochinon (**28**), 1,4-benzochinon (**40**), 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (**41**), 1,2-naftochinon (**42**), 2-hydroksy-1,4-naftochinon (**43**), wiologen benzylowy (**44**).

3.5.3. Kinetyka w stanie stacjonarnym dla Δ^1 -KSTD i wybranych steroidów

Parametry kinetyczne w stanie stacjonarnym dla AD (**8**) i cholest-4-en-3-onu (**2**) oraz Acmb i KSTD1 również określono w teście spektrofotometrycznym (**Rozdział 3.3.1**). Eksperymenty prowadzono w 100 mM buforze K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6,5 (Acmb) lub 100 mM buforze K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 8,0 (KSTD1) z dodatkiem 0,029–0,174 mM DCPIP, 2% (w/v) HBC (14,54 mM), steroidów w zakresie stężeń 5–500 μ M rozpuszczonych w EGME (stężenie końcowe 2% (v/v)) oraz odpowiednio 0,3 μ M Acmb bądź 0,23 μ M KSTD1. Wszystkie pomiary wykonano w temperaturze 30°C. Ze względu na tworzenie kompleksu typu gość–gospodarz pomiędzy DCPIP i HBC, następowała zmiana polarności otoczenia DCPIP, co skutkowało przesunięciem batochromowym maksimum oraz efektem hiperchromowym (**Rys. 18**). Wyznaczono molowe współczynniki ekstynkcji związku w zadanych warunkach, które wyniosły: $\Delta\varepsilon_{700[pH\ 6,5]}^{DCPIP+2\% HBC} = 10691\ M^{-1}\ cm^{-1}$ i $\Delta\varepsilon_{700[pH\ 8,0]}^{DCPIP+2\% HBC} = 11627\ M^{-1}\ cm^{-1}$. Do danych otrzymanych dla Acmb dopasowano model mechanizmu Ping Pong *bi bi* (OriginPro 2019). Do danych otrzymanych dla KSTD1 dopasowano funkcję liniową, gdyż nie udało się zmierzyć aktywności enzymu w zakresie nieliniowym, z powodu ograniczeń w rozpuszczalności steroidowych substratów i wysokich wartości obserwowanego K_m dla KSTD1.



Rys. 18. Widmo UV-Vis DCPIP bez i w obecności HBC.

3.6. Stałe trwałości kompleksu HBC–steroid

Celem poprawnej interpretacji parametrów kinetycznych wyznaczonych dla AD (8) i cholest-4-en-3-onu (2) w obecności 2% (w/v) HBC (Rozdział 3.5.3), bazując na protokole uprzednio opisanym w literaturze [125], oznaczono stałe trwałości kompleksu inkluzyjnego HBC:steroid. Mieszaninę HBC (w zakresie stężeń 0–98 mM) w roztworze EGME/woda (2% (v/v)) oraz dwukrotnego nadmiaru molowego AD bądź cholest-4-en-3-onu inkubowano w termobloku w temperaturze 30°C, przy 1000 rpm przez 48 h. Następnie zawiesina została przefiltrowana przy użyciu filtrów strzykawkowych o średnicy porów 0,45 μm, rozcieńczona 0–200 razy w acetonitrylu (ACN) i odwirowana przy 15000 g przez 15 min. Stężenie rozpuszczonych steroidów zostało przanalizowane z wykorzystaniem HPLC. Szczegółowo ilościową analizę HPLC poszczególnych steroidów opisano w dalszej części pracy (Rozdział 3.8.1).

Do danych uzyskanych dla AD dopasowano metodą regresji funkcję liniową ($[S] = a[HBC] + S_0$). Stałą trwałości dla kompleksów AD:HBC 1:1 ($K_{1:1}$) obliczono z równania XXXV [126,127].

$$K_{1:1} = \frac{a}{S_0(1 - a)} \quad \text{XXXV}$$

Do danych uzyskanych dla cholest-4-en-3-onu została dopasowana funkcja kwadratowa ($[S] = a[HBC]^2 + b[HBC] + S_0$). Stałe trwałości dla kompleksów cholest-4-en-3-on:HBC 1:1 ($K_{1:1}$) i 1:2 ($K_{1:2}$) obliczono z równań odpowiednio XXXVI i XXXVII [127].

$$K_{1:1} = \frac{b}{S_0} \quad \text{XXXVI}$$

$$K_{1:2} = \frac{a}{S_0 K_{1:1}} \quad \text{XXXVII}$$

S_0 oznacza rozpuszczalność steroidów w 2% (v/v) roztworze EGME/woda, która wynosi odpowiednio $144,2 \pm 7,1 \mu\text{M}$ dla AD i $4,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$ dla cholest-4-en-3-onu.

3.7. Badanie mechanizmu Δ^1 -dehydrogenacji katalizowanej przez Δ^1 -KSTD

Oprócz opisanych w **Rozdziale 3.5** pomiarów kinetycznych, badanie mechanizmu reakcji Δ^1 -dehydrogenacji katalizowanej przez Δ^1 -KSTD obejmowało ukierunkowaną mutagenezę w centrum aktywnym Acmb (**Rozdział 3.7.1**), badanie kinetycznego efektu izotopowego dla Acmb i KSTD1 (**Rozdział 3.7.2**) oraz kinetycznego efektu lepkości rozpuszczalnika dla KSTD1 (**Rozdział 3.7.3**).

3.7.1. Ukierunkowana mutagenеза Acmb

Plazmid pMCSG7-acmb posłużył jako matryca do wprowadzenia punktowych mutacji (Y115F, Y118F, Y363F, Y467F, Y536F, G540P) do sekwencji Acmb. Przednie startery niezbędne do wprowadzenia mutacji zostały zaprojektowane z wykorzystaniem programu QuikChange (Agilent Technologies). W **Tab. 3** przedstawiono sekwencje przednich starterów zastosowane w przypadku każdego z mutantów, a zmutowane nukleotydy zostały zapisane wielką literą. Sekwencje wstecznych starterów były komplementarne do sekwencji przednich starterów i miały taką samą długość.

Tab. 3. Sekwencje DNA przednich starterów zastosowanych do przygotowania punktowych mutantów Acmb.

Mutant	Kodon wyjściowy	Sekwencja DNA przedniego startera
Y115F	tAc	5'-ag tac ttc ccc tgc cat cgc tTc ccg gat tat t-3'
Y118F	tAt	5'-c cat cgc tac ccg gat tTt tac cag cat ctg cc-3'
Y363F	tAt	5'-aat gag gct tgc ccc tTt ctc gaa ttc ggc g-3'
Y467F	tAc	5'-gc aac gtc ttc gat cgc tat tTc ggc gac tac a-3'
Y536F	tAt	5'-g gtg atg ggc aag gcc tTt ccg ggc gc-3'
G540P	GGc	5'-at ccg ggc gcc CCc ggc acg ctc g-3'

Mutagenezę przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) zgodnie z instrukcjami producenta. Plazmidy matrycowe zostały pocięte z użyciem enzymu restrykcyjnego *DpnI*, a plazmidy

zawierające każdą z mutacji zostały transformowane do ultrakompetentnych komórek *E. coli* XL 10-Gold (Agilent Technologies). Transformowane komórki wysiano na płytki z podłożem stałym (2% (w/v) LB, 1,5% (w/v) agarozą, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicylina) i inkubowano przez 24 h w temperaturze 37°C. Następnie z pojedynczego klonu każdego z wariantów *E. coli* założono hodowle płynne o objętości 50 mL i składzie 2% (w/v) LB i 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicyliny, które inkubowano w temperaturze 37°C, przy 180 rpm przez noc. Kolejno z komórek wyizolowano plazmidy przy użyciu zestawu Plasmid Miniprep DNA Purification Kit (EURx) zgodnie z instrukcjami producenta i poddano sekwencjonowaniu, które zostało przeprowadzone przez zewnętrzną firmę Genomed. Po upewnieniu się, że mutacje zostały poprawnie wprowadzone do sekwencji kodującej AcmB, plazmidy transformowano do komórek kompetentnych *E. coli* BL21 (DE3) Magic. Opisany powyżej protokół został wykonany przez mgr Olgę Zastawny w ramach realizacji projektu OPUS 2016/21/B/ST4/03798.

Wszystkie mutanty zostały wekspresjonowane zgodnie z procedurą opisaną dla AcmB dzikiego typu (WT) w **Rozdziale 3.1.1**. W celu późniejszego określenia wpływu mutacji na stopień obsadzenia białek kofaktorem FAD, rozbite komórki bakteryjne inkubowano z Triton X-100 bez dodatku FAD. Proces oczyszczania również był analogiczny do opisanego w **Rozdziale 3.1.2** dla AcmB WT. Ekspresję i oczyszczanie powtórzono trzykrotnie dla każdego mutantu.

Stopień obsadzenia kofaktorem FAD określono poprzez porównanie stężenia całkowitego białka i stężenia białka zawierającego FAD. Procedurę opisano w **Rozdziale 3.1.3**.

Aktywność mutantów została oznaczona w standardowym teście spektrofotometrycznym (**Rozdział 3.3.1**), wobec 100 μM AD (**8**). W przypadku mutantów, które nie wykazały aktywności lub wykazały znikomą aktywność w teście z zastosowaniem spektrofotometrii UV-Vis, aktywność oznaczono poprzez analizę konwersji substratu, metodą HPLC. Mieszanina reakcyjna składała się z 100 mM buforu $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 6,5, 200 μM AD w IPA (stężenie końcowe 2% (v/v)), 400 μM DCPIP oraz 24,6–38,9 μM zmutowanego AcmB. Reakcje prowadzono w trzech powtórzeniach w termobloku w temperaturze 30°C, przy 800 rpm przez 30 min. Warunki analizy HPLC opisano w **Rozdziale 3.8.1**.

3.7.2. Kinetyczny efekt izotopowy

Kinetyczny efekt izotopowy na atomach C1 i C2 steroidu dla Acmb i KSTD1 określono wykonując pomiary kinetyczne w stanie stacjonarnym w teście spektrofotometrycznym (**Rozdział 3.3.1**), pomiary kinetyczne w stanie przedstacjonarnym z wykorzystaniem techniki zatrzymanego przepływu (**Rozdział 3.3.2**) oraz przez pomiar konkurencyjnego KIE z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS; **Rozdział 3.8.2**).

Do określenia KIE dla substratu podstawionego deuterem przy atomie C1 wykorzystano dihydrotestosteron (DHT; **31**) oraz jego C1-deuterowany izotopolog – 17 β -hydroksy-5 α -androstan-3-on-1 α ,16,16,17-d₄ (1 α ,16,16,17-d₄-DHT; **32**; Alsachim). Do określenia KIE dla substratu podstawionego deuterem przy atomie C2 wykorzystano 17-metylotestosteron (17MT; **33**) oraz jego C2-deuterowany izotopolog – 4-androsten-17 α -metylo-17 β -ol-3-on-2,2,4,6,6-d₅ (2,2,4,6,6-d₅-17MT; **34**; CDN Isotopes).

Acmb

Kinetyka w stanie stacjonarnym: Pomiary szybkości reakcji przeprowadzono w teście spektrofotometrycznym opisanym w **Rozdziale 3.3.1**, w 50 mM buforze K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 6,5 lub Tris-HCl pH 8,5 z dodatkiem 200 μ M DCPIP, 100 μ M (pH 6,5) lub 200 μ M (pH 8,5) steroidu (DHT, 1,16,16,17-d₄-DHT, 17MT oraz 2,2,4,6,6-d₅-17MT) rozpuszczonego w dioksanie (stężenie końcowe odpowiednio 1% lub 2% (v/v)) i 0,17 μ M Acmb. KIE wyznaczono jako stosunek średnich V_{maxH}/V_{maxD} .

Konkurencyjny KIE: Kinetyczny efekt izotopowy $^D(V/K_m)$ zmierzono zgodnie z protokołem opisanym w literaturze [128]. Wartość konkurencyjnego KIE określono bazując na śledzeniu zmian w stosunku masowym substratu/produktu lekkiego (x_1) i ciężkiego (x_2) izotopu, w miarę postępu reakcji enzymatycznej, zgodnie ze wzorem **XXXVIII**.

$$\left(\frac{V}{K_m}\right)^D = \frac{k_1}{k_2} = \frac{\log(1 - x_1)}{\log(1 - x_2)} \quad \text{XXXVIII}$$

$^D(V/K_m)$ wyznaczono przez nieliniowe dopasowanie przekształconej funkcji **XXXVIII** w programie OriginPro 2019 (**XXXIX**).

$$x_1 = 1 - (1 - x_2)^{\frac{k_1}{k_2}} \quad \text{XXXIX}$$

Reakcję przeprowadzono w trzech powtórzeniach, a mieszaniny reakcyjne składały się z 50 mM buforu K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6,5 lub 50 mM buforu Tris-HCl pH 8,5, 100 μ M DCPIP, równych ilości substratów i ich deuterowanych homologów (DHT i 1,16,16,17-d₄-DHT lub 17MT i 2,2,4,6,6-d₅-17MT) – po 100 μ M każdego ze steroidów w EGME (stężenie końcowe 2% (v/v)) oraz AcMB (1,9 nM przy pH 6,5 lub 4,7 nM przy pH 8,5). Reakcje prowadzono w warunkach beztlenowych (98:2 (v/v) N₂:H₂), w 30°C, przez 18 min. Konwersję każdego z substratów analizowano za pomocą LC-MS/MS (**Rozdział 3.8.2**).

KSTD1

Kinetyka w stanie stacjonarym: Pomiarzy szybkości reakcji przeprowadzono w teście spektrofotometrycznym opisanym w **Rozdziale 3.3.1**, w 50 mM buforze Tris-HCl pH 8,0 z dodatkiem 200 μ M DCPIP, 200 μ M steroidu (DHT, 1,16,16,17-d₄-DHT, 17MT oraz 2,2,4,6,6-d₅-17MT) rozpuszczonego w dioksanie (stężenie końcowe 2% (v/v)) i 84,4 nM KSTD1. KIE wyznaczono jako stosunek średnich V_{maxH}/V_{maxD} .

Kinetyka w stanie przedstacjonarym: Pomiarzy λ przeprowadzono z zastosowaniem techniki zatrzymanego przepływu (**Rozdział 3.3.2**). KIE na atomie C1 określono w reakcji 8,9 μ M KSTD1 z 100 μ M DHT lub 1,16,16,17-d₄-DHT w roztworze EGME/bufor 50 mM Tris-HCl pH 8,0 (10% (v/v)). KIE dla substratu podstawionego przy atomie C2 zmierzono w reakcji 7,1 μ M KSTD1 z 250 μ M 17MT lub 2,2,4,6,6-d₅-17MT rozpuszczonego w roztworze dioksan/bufor 50 mM Tris-HCl pH 8,0 (6% (v/v)). Przebieg reakcji obserwowano przez 31,25 ms. Do uzyskanych przebiegów reakcji dopasowano funkcję mono-eksponencjalną (**XXXIV**). KIE wyznaczono jako stosunek średnich wartości własnych szybkości redukcji flawiny λ_H/λ_D .

Konkurencyjny KIE: Kinetyczny efekt izotopowy $^D(V/K_m)$ wyznaczono analogicznie jak dla AcMB. Reakcję przeprowadzono w trzech powtórzeniach, a mieszaniny reakcyjne składały się z 50 mM buforu Tris-HCl pH 8,0, 100 μ M DCPIP, równych ilości substratów i ich deuterowanych izotopologów (DHT i 1,16,16,17-d₄-DHT lub 17MT i 2,2,4,6,6-d₅-17MT) – po 100 μ M każdego ze steroidów w EGME (stężenie końcowe 2% (v/v)) oraz KSTD1 (0,4 nM dla 17MT lub 0,9 nM dla DHT). Reakcje prowadzono w warunkach beztlenowych (98:2 (v/v) N₂:H₂) w 30°C, przez 18 min. Konwersję każdego z substratów analizowano za pomocą LC-MS/MS (**Rozdział 3.8.2**).

3.7.3. Kinetyczny efekt lepkości rozpuszczalnika

KSVE określono poprzez pomiar kinetyki dla KSTD1 i AD (8) w stanie przedstacjonarnym (**Rozdział 3.3.2**) z użyciem glicerolu i PEG 20000, jako czynników zwiększających lepkości środowiska reakcji. Mieszanina reakcyjna zawierała 50 mM bufor Tris-HCl pH 8,0, 8,9 μM KSTD1, 50–200 μM AD w EGME (stężenie końcowe 5% (v/v)) oraz glicerol (w stężeniu 0,27 M, 1,27 M i 2,27 M) lub PEG 20000 (w stężeniu 0%, 4,2% i 10% (w/v)). Przebieg reakcji obserwowano przez 35 do 125 ms. Do otrzymanych danych dopasowano model Michaelisa-Menten. Lepkość dynamiczna mieszanin reakcyjnych została wyznaczona za pomocą wiskozymetru Lovis 2000 M/ME z toczącą się kulą (Anton Paar) w 30°C przez dr inż. Dawida Lupę. Dalsza analiza została przeprowadzona zgodnie z opisem przedstawionym w **Rozdziale 1.3.4**.

3.8. Analiza ilościowa steroidów

Ilościowej analizie steroidów dla eksperymentów opisanych w **Rozdziałach 3.5.2, 3.6, 3.7.1** oraz **3.9** dokonano z wykorzystaniem systemu HPLC-DAD. Natomiast ilościowa analiza steroidów dla eksperymentu KIE (**Rozdział 3.7.2**) oraz dla DHT (31; **Rozdział 3.9.4**) została wykonana z użyciem systemu LC-MS/MS.

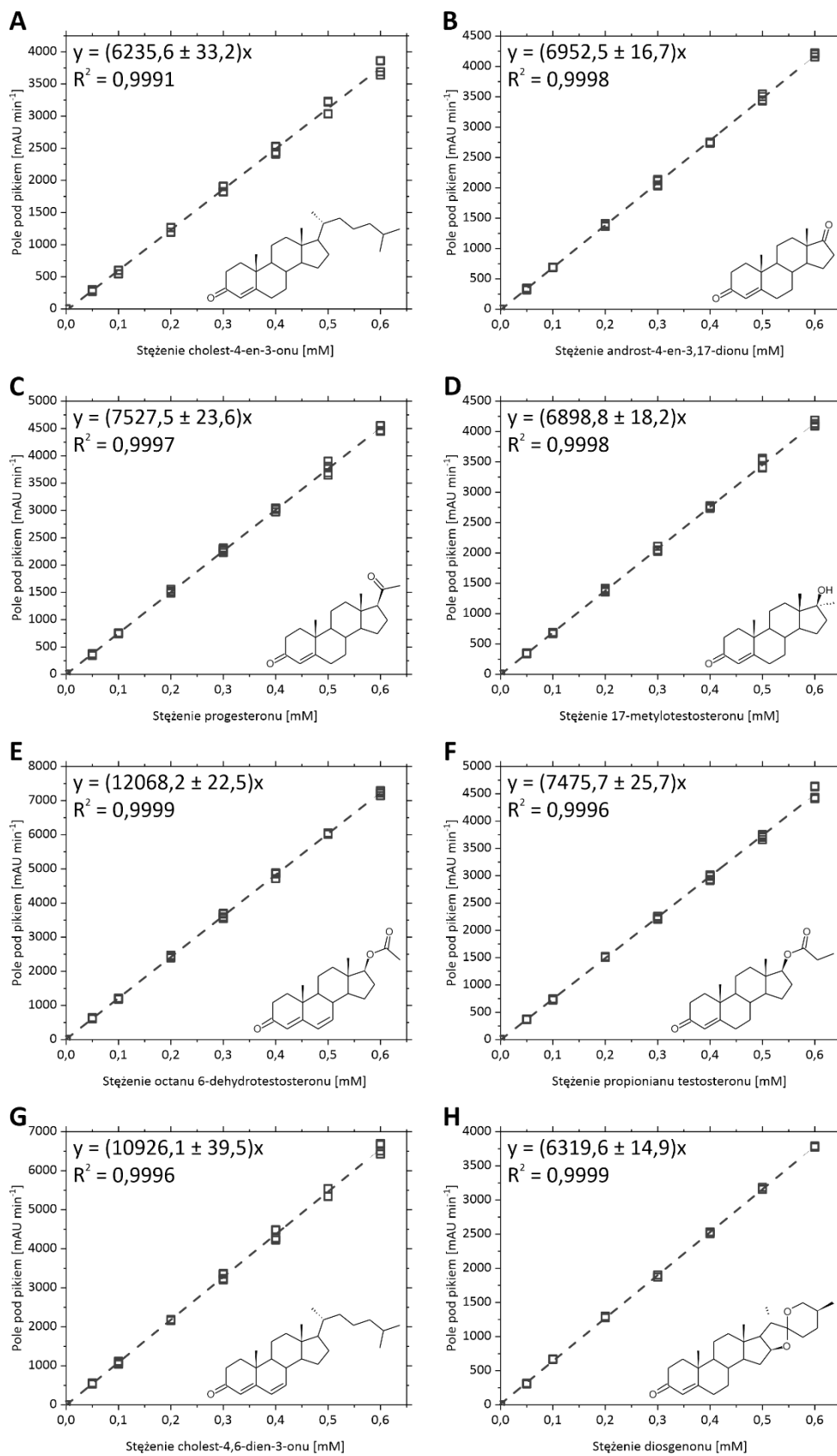
3.8.1. W oparciu o HPLC-DAD

Analizy wykonano przy użyciu chromatografu ciekowego Agilent 1100 VL z detektorem DAD i kolumny HALO RP-Amide 90 Å 2,7 μm , 2,1 × 75 mm (Advanced Materials Technology) w gradiencie ACN/H₂O (**Tab. 4**) w temperaturze 30°C. Oznaczenie ilościowe przeprowadzono przy użyciu zewnętrznej kalibracji opartej na komercyjnych standardach. W analizie stosowano nstrzyki o objętości 5 μL , a każdą próbkę analizowano co najmniej dwa razy.

Tab. 4. Metody HPLC użyte do analizy następujących substratów: cholest-4-en-3-onu (**2**), androst-4-en-3,17-dionu (**8**), progesteronu (**30**), 17-metylotestosteronu (**33**), octanu 6-dehydrotestosteronu (**35**), propionianu testosteronu (**36**), cholest-4,6-dien-3-onu (**37**) oraz diosgenonu (**38**).

Substrat	8, 30, 33, 35, 36			2, 37, 38		
Przepływ [mL min ⁻¹]	0,35			0,4		
Długość fali [nm]	243: 8, 30, 33, 36 285: 35			240: 2, 37, 38		
	Czas [min]	H ₂ O [%]	ACN [%]	Czas [min]	H ₂ O [%]	ACN [%]
Metoda rozdziatu	0,43	85	15	1,00	45	55
	0,60	35	65	1,50	35	65
	0,61	35	65	5,50	35	65
	6,40	85	15	5,60	35	65
	9,00	85	15	9,00	75	25

Na **Rys. 19** przedstawiono krzywe wzorcowe dla cholest-4-en-3-onu (**Rys. 19A**), androst-4-en-3,17-dionu (**Rys. 19B**), progesteronu (**Rys. 19C**), 17-metylotestosteronu (**Rys. 19D**), octanu 6-dehydrotestosteronu (**Rys. 19E**), propionianu testosteronu (**Rys. 19F**), cholest-4,6-dien-3-onu (**Rys. 19G**) oraz diosgenonu (**Rys. 19H**).



Rys. 19. Krzywe wzorcowe dla substratów: cholest-4-en-3-onu (A), androst-4-en-3,17-dionu (B), progesteronu (C), 17-metylotestosteronu (D), octanu 6-dehydrotestosteronu (E), propionianu testosteronu, (F) cholest-4,6-dien-3-onu (G) oraz diosgenonu (H).

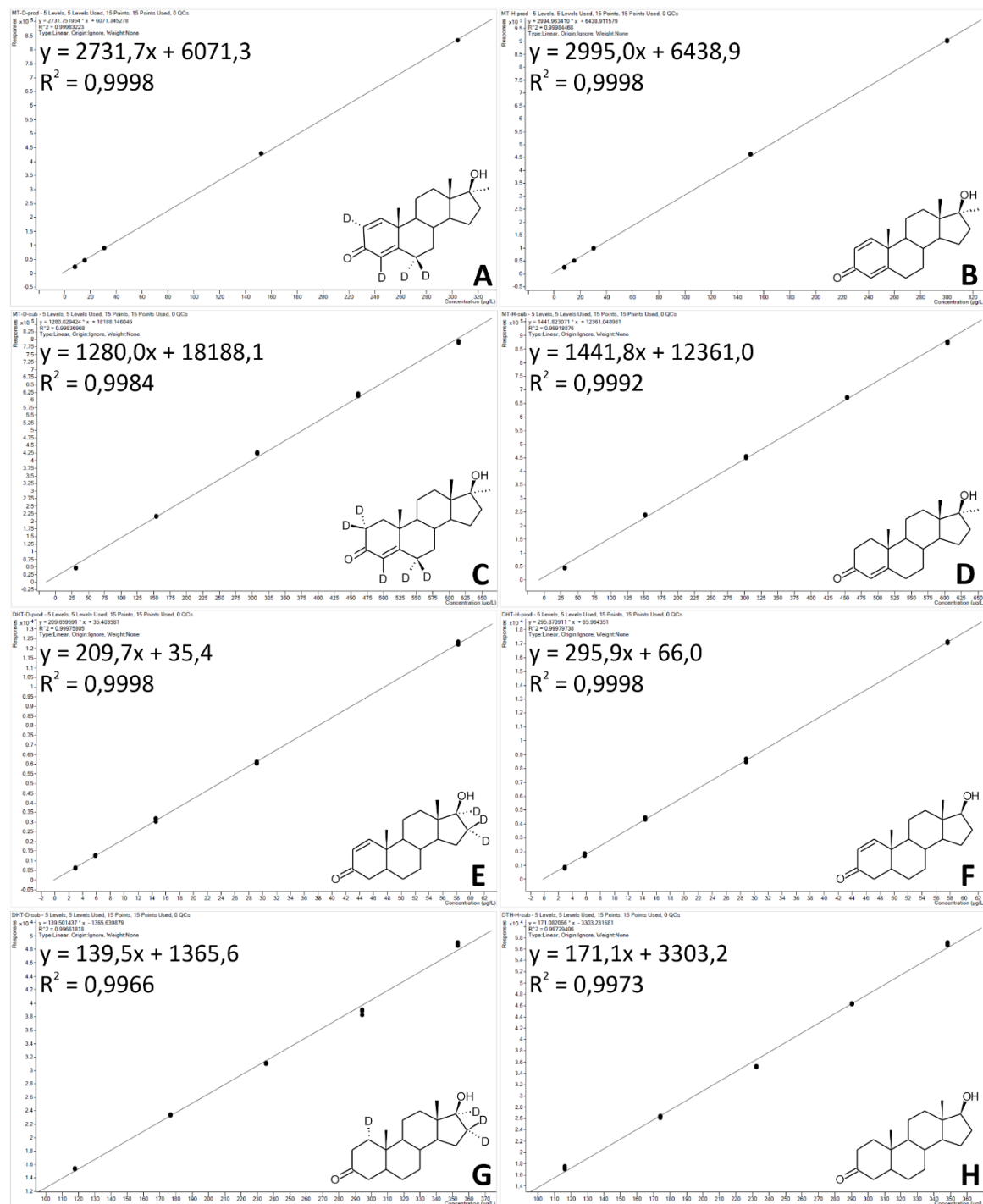
3.8.2. W oparciu o LC-MS/MS

Analizy LC-MS/MS wykonano przy użyciu Agilent 1290 Infinity z detektorem MS Agilent 6460 Triple Quad przy użyciu trybu monitorowania wybranych jonów (SIM) i jonizacji przez rozpylanie w polu elektrycznym (ESI) w polaryzacji dodatniej. Separację przeprowadzono na kolumnie Zorbax Eclipse Plus C18 1,8 μm , 2,1 \times 50 mm (Agilent Technologies) z użyciem fazy ACN/H₂O/HCOOH (60:40:0.1 (v/v/v)) w trybie izokratycznym (Tab. 5). Oznaczenie ilościowe przeprowadzono przy użyciu zewnętrznej kalibracji opartej na komercyjnych standardach lub produktach zsyntetyzowanych przez 100% enzymatyczną konwersję standardów.

Tab. 5. Metody LC-MS/MS użyte do oznaczenia konkurencyjnego KIE.

Parametry MS	
Tryb jonizacji	ESI
Temperatura gazu [°C]	350
Przepływ gazu [L min ⁻¹]	10
Ciśnienie nebulizatora [psi]	40
Temperatura gazu osłonowego [°C]	350
Przepływ gazu osłonowego [L min ⁻¹]	10
Napięcie na kapliarzu [V]	4500
Napięcie na dyszy [V]	1000
Napięcie na fragmentorze [V]	100
Czas przebywania [ms]	100
Metoda rozdzielania związków 31 i 32 oraz ich Δ^1-pochodnych	
H ₂ O:ACN:HCOOH (v:v:v)	60:40:0.1
Przepływ [mL min ⁻¹]	0,4
Czas analizy [min]	4
SIM1 [M+H] ⁺	0–2,9 min, 292,2 m/z, 289,3 m/z
SIM2 [M+H] ⁺	2,9–4 min, 295,3 m/z, 291,3 m/z
Czas retencji 16,16,17-d ₃ -1-TE [min] (m/z)	2,452 (292,2)
Czas retencji 1-TE [min] (m/z)	2,492 (289,3)
Czas retencji 1,16,16,17-d ₄ -DHT [min] (m/z)	3,185 (295,3)
Czas retencji DHT [min] (m/z)	3,253 (291,3)
Metoda rozdzielania związków 33 i 34 oraz ich Δ^1-pochodnych	
H ₂ O:ACN:HCOOH (v:v:v)	60:40:0.1
Przepływ [mL min ⁻¹]	0,4
Czas analizy [min]	3
SIM1 [M+H] ⁺	0–2 min, 305,3 m/z, 301,3 m/z
SIM2 [M+H] ⁺	2–3 min, 308,3 m/z, 303,3 m/z
Czas retencji 2,4,6,6-d ₄ -MTD [min] (m/z)	2,237 (305,3)
Czas retencji MTD [min] (m/z)	2,287 (301,3)
Czas retencji 2,2,4,6,6-d ₅ -17MT [min] (m/z)	1,513 (308,3)
Czas retencji 17MT [min] (m/z)	1,542 (303,3)

Na Rys. 20 przedstawiono krzywe wzorcowe dla 2,4,6,6-d₄-MTD (Rys. 20A), MTD (Rys. 20B), 2,2,4,6,6-d₅-17MT (Rys. 20C), 17MT (Rys. 20D), 16,16,17-d₃-1-TE (Rys. 20E), 1-TE, (Rys. 20F) 1,16,16,17-d₄-DHT (Rys. 20G) oraz DHT (Rys. 20H).



Rys. 20. Krzywe wzorcowe dla: 2,4,6,6-d₄-MTD (A), MTD (B), 2,2,4,6,6-d₅-17MT (C), 17MT (D), 16,16,17- (E), 1-TE, (F) 1,16,16,17-d₄-DHT (G) oraz DHT (H). Wartości na osi x: A i B –20–320 µg L⁻¹, C i D –25–650 µg L⁻¹, E i F –2–62 µg L⁻¹, G i H 90–370 µg L⁻¹. Wartość odpowiedzi detektora na osi y: A, B, C i D –0,5–9 10⁵, E i F –0,1–1,8 10⁴, G i H 1,2–5,8 10⁴.

3.9. Optymalizacja warunków reakcji Δ^1 -dehydrogenacji

Optymalizacja warunków reakcji Δ^1 -dehydrogenacji katalizowanej przez Δ^1 -KSTD polegała na przetestowaniu w warunkach reaktorowych działania różnych frakcji enzymu (**Rozdział 3.9.1**), różnych akceptorów elektronowych (**Rozdział 3.9.2**) oraz wpływu atmosfery zawierającej O_2 na przebieg reakcji (**Rozdział 3.9.3**). Wszystkie testy przeprowadzono w dwóch lub trzech powtórzeniach. Końcowe warunki syntezy wybranych steroidów w zwiększonej skali zostały przedstawione w **Rozdziale 3.9.4**. Stopień konwersji substratów, dla wszystkich przedstawionych poniżej eksperymentów, został określony z wykorzystaniem HPLC-DAD, jak opisano w **Rozdziale 3.8.1**. Stopień konwersji DHT (**31**) w eksperymencie opisanym w **Rozdziale 3.9.4** określono z użyciem LC-MS/MS (**Rozdział 3.8.2**), jako że substrat ten nie absorbuje promieniowania z zakresu UV-Vis.

3.9.1. Wpływ zastosowanej frakcji enzymu na przebieg reakcji

Poza sprawdzeniem aktywności frakcji uzyskanych podczas oczyszczania AcmbB, tj. całych komórek, surowego ekstraktu komórkowego, surowego ekstraktu komórkowego po inkubacji z Triton X-100 i FAD, ekstraktu pozbawionego komórek oraz oczyszczonego enzymu (**Rozdział 3.1.1**) w standardowym teście spektrofotometrycznym (**Rozdział 3.3.1**), sprawdzono też efektywność ich działania w warunkach reaktorowych.

Mieszanki reakcyjne składały się z 100 mM buforu K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 8,0, 15 mM PMS, 5% (w/v) HBC, 5 mM PG w EGME (stężenie końcowe 2% (v/v)) oraz 0,76 μ M AcmbB (lub proporcjonalnej ilości pozostałych frakcji). Reakcja prowadzona była w temperaturze 30°C w termobloku przy 800 rpm, przez 2 h.

3.9.2. Wpływ zastosowanego akceptora elektronowego na przebieg reakcji

Wyboru optymalnego reutleniacza dokonano w warunkach reaktorowych. Mieszanki reakcyjne składały się z 100 mM buforu K_2HPO_4/KH_2PO_4 lub 100 mM buforu glicyna-NaOH o pH optymalnym dla danego akceptora elektronowego, 0,2 mM PG w EGME (stężenie końcowe 4% (v/v)), 0,8 mM sztucznego akceptora elektronowego (DCPIP, PMS, PMS-DCPIP lub $K_3[Fe(CN)_6]$) oraz 2,8 nM AcmbB. Mieszanki reakcyjne inkubowano w temperaturze 30°C w termobloku przy 800 rpm, przez 1 h. Testy przeprowadzono w atmosferze tlenowej i beztlenowej (98:2 (v/v) $N_2:H_2$).

3.9.3. Wpływ atmosfery na przebieg reakcji

Wpływ tlenu cząsteczkowego na reakcję również oceniono w warunkach reaktorowych. Mieszaniny reakcyjne składały się z 100 mM buforu K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6,5, 0,56 mM DCPIP, 4% (w/v) HBC, 2 mM PG w EGME (stężenie końcowe 2% (v/v)) oraz 0,12 μ M AcnB. Reaktory pracowały w warunkach tlenowych, w warunkach beztlenowych (98:2 (v/v) $N_2:H_2$) oraz przy ciągłym przedmuchiwaniu sprzężonym powietrzem lub N_2 (szybkość przepływu gazu wynosiła 24 mL min^{-1}). Reakcja prowadzona była w 30°C przez 24 h.

Reutlenie DCPIP

278 μ M roztwór DCPIP w 100 mM buforze K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6,5 odtlenowano i poddano elektrochemicznej redukcji w trybie galwanostaticznym przy stałym prądzie ~ 200 V w układzie złożonym z platynowej elektrody pracującej i przeciwelektrody oraz elektrody odniesienia Ag/AgCl. Redukcja przebiegała w atmosferze argonu, aż do zniknięcia charakterystycznego niebieskiego koloru DCPIP. Następnie poddano go działaniu warunków tlenowych, a zmianę na kolor niebieski (stan utlenienia) monitorowano za pomocą UV-Vis (Shimadzu UV-1280) w zakresie długości fali 400–800 nm. Elektrochemiczna redukcja DCPIP została przeprowadzona przez dr inż. Grzegorza Mordarskiego oraz dr Dmitra Kharitonova.

95 μ M roztwór DCPIP w 100 mM buforze K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6,5 odtlenowano i przeniesiono do beztlenowej komory rękawicowej (Coy Laboratory Products) (95:5 (v/v) $N_2:H_2$). Następnie do roztworu dodano ditionianu (III) sodu (stężenie końcowe 85 μ M), co spowodowało redukcję 90% DCPIP do DCPIPH₂. Kolejno dodano H₂O₂ (stężenie końcowe 98 mM) jako utleniacz. Zarówno redukcję, jak i utlenianie kontrolowano spektrofotometrycznie.

3.9.4. Warunki syntezy Δ^1 -dehydro-3-ketosteroidów

Syntezę w skali 1,5–2,1 g L^{-1} przeprowadzono dla cholest-4-en-3-onu (**2**), androst-4-en-3,17-dionu (**8**), progesteronu (**30**), dihydrotestosteronu (**31**), 17-metylotestosteronu (**33**), octanu 6-dehydrotestosteronu (**35**), propionianu testosteronu (**36**) oraz cholest-4,6-dien-3-onu (**37**). Syntezę w skali 3,5–3,8 g L^{-1} przeprowadzono dla androst-4-en-3,17-dionu (**8**), progesteronu (**30**) oraz dihydrotestosteronu (**31**). Ze względu na ograniczenia

w rozpuszczalności diosgenonu (**38**), Δ^1 -dehydrogenację tego związku przeprowadzono w skali $0,5 \text{ g L}^{-1}$. Katalizator wyżej wymienionych reakcji stanowiła Acmb.

Celem weryfikacji zdolności KSTD1 do odwodornienia diosgenonu (**38**) przeprowadzono syntezę w skali $41,3 \text{ mg L}^{-1}$.

Synteza w skali $1,5\text{--}2,1 \text{ g L}^{-1}$

Syntezę przeprowadzono w reaktorach o objętości 10 mL, zawierających 100 mM bufor $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 8,0, 5% (w/v) HBC, 4,6–6,6 mM steroidu (**2, 8, 30, 31, 33, 35–37**) w EGME (stężenie końcowe 2% (v/v)), 15 mM PMS oraz $0,81 \mu\text{M}$ Acmb. Reakcja prowadzona była w 30°C , przy 250 rpm, przez 2 h.

Synteza w skali $3,5\text{--}3,8 \text{ g L}^{-1}$

Syntezę androst-1,4-dien-3,17-dionu (**9**) i Δ^1 -progesteronu przeprowadzono w reaktorach o objętości 100 mL, zawierających 100 mM bufor $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 8,0, 8% (w/v) HBC, 11,1–12,2 mM steroidu (**8, 30**) w EGME (stężenie końcowe 4% (v/v)), 15 mM PMS oraz $1,4 \mu\text{M}$ Acmb. Reakcja prowadzona była w 30°C , przy 220 rpm, przez 5,5 h.

Syntezę Δ^1 -dihydrotestosteronu przeprowadzono w reaktorach o objętości 100 mL, zawierających 100 mM bufor $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 8,0, 10% (w/v) HBC, 13,1 mM steroidu (**31**) w EGME (stężenie końcowe 5% (v/v)), 20 mM PMS oraz $1,7 \mu\text{M}$ Acmb. Reakcja prowadzona była w 30°C , przy 220 rpm, przez 2 h.

Synteza w skali $0,5 \text{ g L}^{-1}$

Syntezę (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu z diosgenonu (**38**) przeprowadzono w reaktorze okresowym z zasilaniem. Reaktor o objętości 80 mL zawierał 100 mM bufor $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 8,0, 3,2% (w/v) HBC, 0,6 mM steroidu (**38**) w EGME (stężenie 2% (v/v)), 4 mM PMS oraz $0,81 \mu\text{M}$ Acmb. Reakcja prowadzona była w 30°C , przy 250 rpm, przez 15 min, po czym do mieszaniny reakcyjnej dodano 1,6 mL 30 mM diosgenonu w EGME (stężenia końcowe: 1,18 mM diosgenonu, 3,9% (v/v) EGME). Reakcję prowadzono w niezmiennych warunkach przez kolejne 4 h 15 min.

Synteza w skali $41,3 \text{ mg L}^{-1}$

Syntezę (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu z diosgenonu (**38**) przeprowadzono w reaktorze o objętości 1 mL, zawierającym 50 mM bufor Tris–HCl pH 8,0, 2% (w/v) HBC, $100 \mu\text{M}$ steroidu (**38**) w dioksanie (stężenie 2% (v/v)), $150 \mu\text{M}$ DCPIP oraz $87,7 \text{ nM}$ KSTD1. Reakcja prowadzona była w 30°C w termobloku, przy 800 rpm, przez 20 min.

3.9.5. Oczyszczanie Δ^1 -diosgenonu

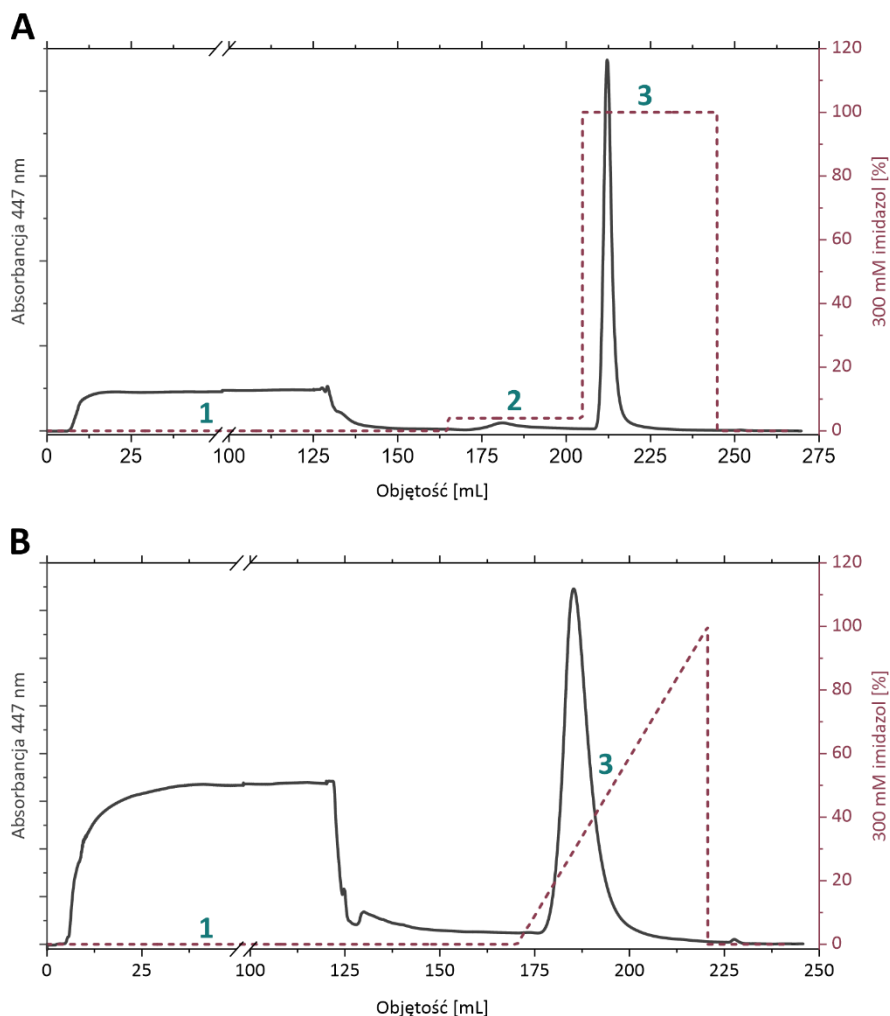
(25*R*)-Spirosta-1,4-dien-3-on oczyszczono przez ekstrakcję do fazy stałej, przy użyciu kolumny C18 PolarPlus (J. T. Baker), o objętości 1 mL. Po aktywacji kolumny (1 CV IPA, 1 CV wody destylowanej) mieszaninę reakcyjną naniesiono na kolumnę, a następnie przemyto 3 CV 40% IPA, aby pozbyć się częściowo zaadsorbowanego na złożu PMS. Produkt eluowano 4 CV czystego IPA.

4. Wyniki i dyskusja

4.1. Produkcja i oczyszczanie Δ^1 -KSTD

Gen kodujący Acmb z *S. denitrificans* został wklonowany do wektora pMCSG7 zgodnie z procedurą opisaną w publikacji Sofińska *et al.* [108]. Plazmid pMCSG7-acmb, poza sekwencją kodującą białko będące przedmiotem zainteresowania niniejszej pracy, zawierał m.in. gen nadający bakteriom oporność na ampicylinę, operon *lacI*, gen kodujący metkę histydynową (polipeptyd złożony z 6 histydyn) oraz miejsce cięcia proteazy TEV. Plazmid transformowano do komórek *E. coli* BL21 (DE3) Magic. Bakterie hodowano w kolbach stożkowych z wgłębieniami, w 1 L pożywki LB z dodatkiem 100 mg mL⁻¹ ampicyliny oraz 50 mg mL⁻¹ kanamycyny, w temperaturze 37°C, przy 180 rpm. Szczep bakteryjny *E. coli* BL21 (DE3) Magic zawiera dodatkowo plazmid z genem nadającym oporność na kanamycynę, stąd podwójna selekcja antybiotykami. Gdy OD₆₀₀ bakterii osiągnęło wartość co najmniej 0,6, temperatura hodowli została obniżona do 16°C, a ekspresja białka zaindukowana 250 μM IPTG. IPTG jest analogiem metabolitu laktozy (allolaktozy), który przez związanie się z represorem operonu *LacI* aktywuje jego transkrypcję. Jednocześnie związek ten nie jest metabolizowany przez komórki, w związku z tym jego stężenie w trakcie hodowli pozostaje stałe. Po zaindukowaniu bakterie hodowano przez kolejne 24 h w temperaturze 16°C, a następnie zwirowano i rozpuszczono w buforze, uzyskując preparat zwany w dalszej części pracy **całymi komórkami bakteryjnymi**. Kolejno bakterie poddano lizie z zastosowaniem ultrasonifikacji, uzyskując **surowy ekstrakt komórkowy**. Ze względu na to, że Acmb jest w natywnych warunkach zasocjowana z wewnętrzną błoną komórkowa *S. denitrificans* [8], po rozbiciu komórek znacząca część wyekspresjonowanego białka pozostawała w nierozpuszczonej formie (związanej z błonami komórkowym *E. coli*). Dlatego też zdecydowano się na całonocną inkubację surowego ekstraktu komórkowego z niejonowym detergentem – Triton X-100 w stężeniu 0,5% (v/v) oraz 100 μM FAD, celem rekonstytucji kofaktora (**surowy ekstrakt komórkowy po inkubacji z Triton X-100 i FAD**). Następnie, aby pozbyć się resztek komórek bakteryjnych, ekstrakt odwirowano, uzyskując **ekstrakt pozbawiony komórek**, który w kolejnym kroku poddawany był oczyszczaniu z zastosowaniem chromatografii powinowactwa. Wykorzystano powinowactwo metki histydynowej dołączonej do białka, do immobilizowanych jonów niklu stanowiących

wypełnienie kolumny chromatograficznej. Białko wmywano z kolumny z zastosowaniem buforu o wysokim stężeniu imidazolu, którego powinowactwo do jonów Ni²⁺ jest wyższe niż wspomnianej metki. Etap ten poprzedzało płukanie kolumny buforem o niskim stężeniu imidazolu, które miało na celu wymycie z kolumny białek niespecyficznie związanych ze złożem. Przykładowy chromatogram zaprezentowano na **Rys. 21A**.



Rys. 21. Przykładowe chromatogramy z oczyszczania Acmb (A) oraz KSTD1 (B), z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa. **1** – Aplikacja na kolumnę ekstraktu pozbawionego komórek, **2** – wmywanie białek niespecyficznie związanych ze złożem, **3** – wmywanie docelowego białka.

Aby pozbyć się imidazolu oczyszczone białko poddano dializie do buforu, który go nie zawierał, uzyskując frakcję zwaną dalej **oczyszczonym enzymem**. Obecność metki histydynowej nie ma wpływu na aktywność enzymu, jednak może utrudniać krystalizację białka. W związku z tym, do frakcji białka przeznaczonej do krystalizacji, na etapie dializy, dodano proteazę TEV odcinającą ową metkę od reszty białka. Polipeptyd został oddzielony od Acmb podczas filtracji żelowej.

Hodowla i oczyszczanie KSTD1 bazowała na zoptymalizowanych, opisanych w literaturze protokołach [23,24]. Na **Rys. 21B** przedstawiono chromatogram z oczyszczania KSTD1 z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa, w gradiencie imidazolu.

W przypadku każdej z frakcji uzyskanych podczas oczyszczania Acmb, poza całymi komórkami bakteryjnymi, określono całkowite stężenie białka metodą Bradforda, całkowitą aktywność frakcji w standardowym teście spektrofotometrycznym oraz aktywność właściwą (**Tab. 6**). Dwa ostatnie parametry zostały wyrażone w U, definiowanych jako ilość enzymu katalizująca przemianę 1 μ mola substratu w czasie 1 min. Bazując na powyższych parametrach obliczono uzysk (**XL**) oraz plon z oczyszczania (**XLI**).

$$\text{Uzysk} = \frac{\text{aktywność właściwa frakcji}}{\text{aktywność właściwa surowego ekstraktu komórkowego}} \quad \text{XL}$$

$$\text{Plon} = \frac{\text{całkowita aktywność frakcji}}{\text{całkowita aktywność surowego ekstraktu komórkowego}} \times 100\% \quad \text{XLI}$$

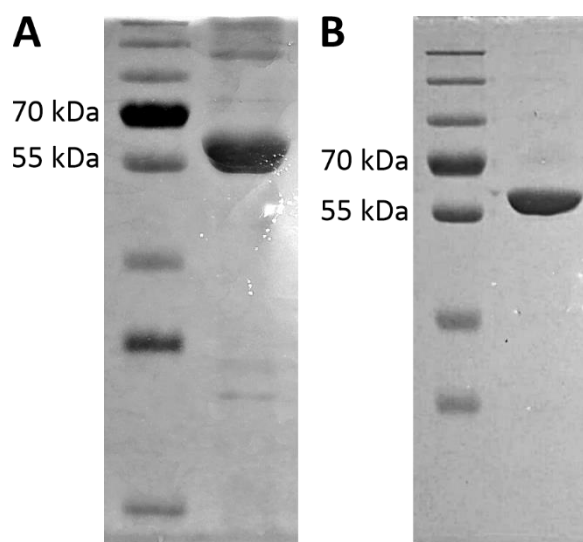
Tab. 6. Wydajność oczyszczania rekombinowanego Acmb.

Etap oczyszczania	Całkowita zawartość białka [mg]	Całkowita aktywność [U]	Aktywność właściwa [U mg ⁻¹]	Uzysk	Plon [%]
Surowy ekstrakt komórkowy	6214,7 ± 23,3	3359,3 ± 39,2	0,54 ± 0,01	1	100
Surowy ekstrakt komórkowy po inkubacji z Triton X-100 i FAD	6425,4 ± 139,6	7561,3 ± 14,9	1,18 ± 0,01	2,2	225
Ekstrakt pozbawiony komórek	4752,9 ± 59,6	5779,8 ± 238,9	1,22 ± 0,05	2,3	172
Oczyszczony enzym	109,9 ± 0,2	974,6 ± 87,1	8,88 ± 0,79	16,4	29

Opisana procedura hodowli, izolacji i oczyszczania Acmb pozwoliła uzyskać białko o aktywności właściwej równej 8,88 ± 0,79 U mg⁻¹. Uzysk aktywności był 16,4-krotny, natomiast plon wyniósł 29%. Warto zauważyć, że znaczący wzrost całkowitej aktywności zaobserwowano po potraktowaniu surowego ekstraktu komórkowego detergentem Triton X-100 i FAD, co było najprawdopodobniej wynikiem deagregacji enzymu (więcej w **Rozdziale 4.2.1**) i rekonstrukcji FAD. Utratę aktywności enzymu podczas chromatografii

powinowactwa można najprawdopodobniej przypisać utracie kofaktora, ponieważ końcowa zawartość FAD wynosiła ok. 30%.

Masę białek potwierdzono z wykorzystaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) [129] (**Rys. 22**).



Rys. 22. Analiza SDS-PAGE masy AcmB (**A**) oraz KSTD1 (**B**).

Białka zostały też zidentyfikowane przez analizę proteomiczną wykonaną w Środowiskowym Laboratorium Proteomiki i Spektrometrii Mas Instytutu Farmakologii PAN, przez dr Przemysława Mielczarka, zgodnie z protokołem opisanym w publikacji Glanowski *et al.* [121] (**Tab. 7**).

Tab. 7. Wyniki analizy proteomicznej białek.

Białko	Masa molekularna [kDa]	Wynik Mascot	Liczba istotnych peptydów	Pokrycie sekwencji [%]
AcmB	61,4	353	8	19,3
KSTD1	55,2	2024	23	53,2

4.2. Charakterystyka strukturalna AcmB

Charakterystyka strukturalna AcmB obejmowała określenie struktury czwartorzędowej oraz krystalicznej białka.

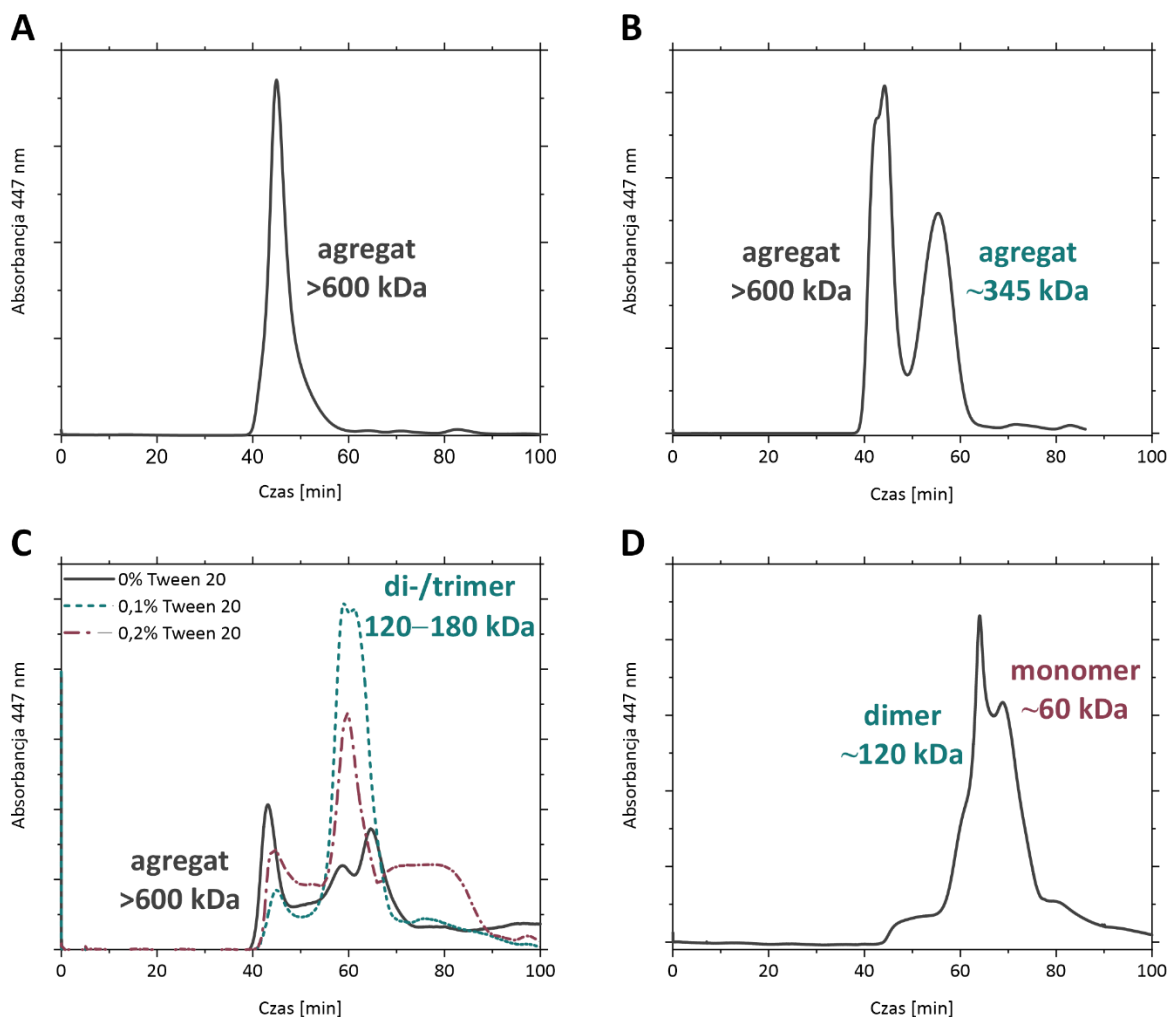
4.2.1. Struktura czwartorzędowa

Struktura czwartorzędowa AcmB została zbadana z użyciem dwóch technik – filtracji żelowej oraz DLS. Badania miały też na celu weryfikację hipotezy, iż jednostką funkcjonalną białka jest monomer.

Filtrację żelową przeprowadzono jako kolejny etap oczyszczania po chromatografii powinowactwa, z wykorzystaniem kolumny umożliwiającej przybliżone określenie masy białek w zakresie od 10 kDa do 600 kDa (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg). Oba etapy oczyszczania zostały przeprowadzone bez i z dodatkiem detergentów. Jak wspomniano, chromatografię powinowactwa prowadzono z dodatkiem Triton X-100, natomiast filtrację żelową z dodatkiem również niejonowego surfaktantu Tween 20. W przypadku, gdy na żadnym etapie oczyszczania nie zastosowano detergentów, białko wyplukiwało się z kolumny stosowanej do filtracji żelowej w czasie martwym, co oznacza tworzenie przez Acmb agregatów o masie przekraczającej 600 kDa (Rys. 23A). Dodatek 0,1% (v/v) Tween 20 do buforu dializacyjnego, a następnie do buforu eluującego stosowanego na etapie filtracji żelowej, spowodował częściową deagregację Acmb do mniejszych agregatów o masie ok. 345 kDa, które stanowiły ok. 44% całej frakcji białka nastrzykniętego na kolumnę (Rys. 23B). W przypadku włączenia Triton X-100, w ilości 0,5% (v/v), do oczyszczania Acmb na etapie chromatografii powinowactwa, podczas filtracji żelowej (bez dodatku detergentu) zaobserwowano spadek procentowej zawartości frakcji agregatów o masie >600 kDa (ok. 34%) i deagregację Acmb do tri- (ok. 26%) i dimerów (ok. 40%) (Rys. 23C, **grafitowa linia**). Z kolei przeprowadzenie analogicznej procedury z dodatkiem Tween 20 do buforu stosowanego podczas filtracji żelowej, doprowadziło do dalszego spadku frakcji zagregowanej i uzyskania jednorodnej frakcji białka zdeagregowanego (Rys. 23C, **zielona linia** – 0,1% (v/v) Tween 20, **czerwona linia** – 0,2% (v/v) Tween 20).

Ze względu na obecność w sekwencji aminokwasowej Acmb czterech cystein, z których jedna znajduje się blisko powierzchni białka, wszystkie opisane do tej pory etapy oczyszczania (chromatografia powinowactwa i filtracja żelowa, z i bez dodatku detergentów) były prowadzone w obecności czynnika redukującego – 5 mM BME. Obecne na powierzchni cysteiny w wyniku utlenienia mogą tworzyć sieć mostków disiarczkowych (pomiędzy podjednostkami białka) promujących agregację [130]. Brak dodatku czynnika redukującego na etapie filtracji żelowej prowadził do niespecyficznego wiązania się Acmb do złoża kolumny chromatograficznej Superdex. BME stanowi tani czynnik redukujący, ale niestety w pH 8,5 i w temperaturze 20°C spełnia swoją funkcję zaledwie przez 4 h [130]. Dlatego też w przypadku oczyszczania frakcji białka przeznaczonej do krystalizacji jako czynnika redukującego użyto TCEP w stężeniu 0,5 mM. Związek ten jest droższy, jednak charakteryzuje go wysoka stabilność [130]. Oczyszczenie Acmb z dodatkiem detergentów

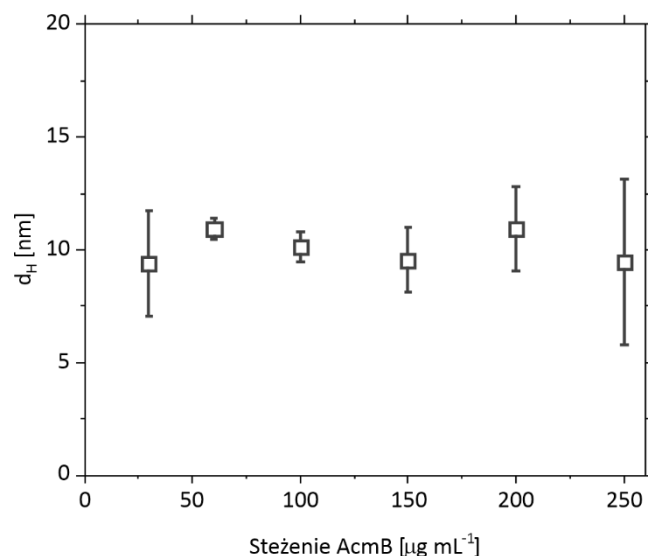
oraz TCEP, dodanego do buforu na etapie filtracji żelowej, pozwoliło otrzymać frakcję Acmb zdeagregowaną do monomeru (**Rys. 23D**).



Rys. 23. Chromatogramy z filtracji żelowej: bez dodatku detergentów (**A**), z dodatkiem 0,1% Tween 20 na etapie filtracji żelowej (**B**), z dodatkiem 0,5% Triton X-100 na etapie chromatografii powinowactwa i 0–0,2% Tween 20 na etapie filtracji żelowej (**C**) oraz z dodatkiem 0,5% Triton X-100 na etapie chromatografii powinowactwa oraz 0,2% Tween 20 i 0,5 mM TCEP na etapie filtracji żelowej (**D**).

Celem oceny wpływu stężenia białka na proces agregacji wykonano badania DLS w zakresie stężeń od 0,03 do 0,25 mg mL⁻¹ [108]. W ramach niniejszej pracy analogiczny eksperyment przeprowadzono po potraktowaniu enzymu 0,5% (w/v) SDS, który każdorazowo był rozcieńczany do 0,02%. Wykazano, że SDS w takim stężeniu nie tworzy miceli, które mogłyby zafałszować pomiar średnicy hydrodynamicznej białka. W warunkach denaturujących możliwe okazało się wyznaczenie współczynnika dyfuzji domniemanego monomeru Acmb, który wyniósł 40,4 um² s⁻¹. Bez względu na wzrost stężenia białka, zmian w wartości współczynnika dyfuzji nie zaobserwowano,

a w konsekwencji także w obliczonej średnicy hydrodynamicznej, która wyniosła $10,6 \pm 0,4$ nm (**Rys. 24**).



Rys. 24. Zależność średnicy hydrodynamicznej AcmB od stężenia w obecności 0,02% SDS.

Już pierwsze badania nad AcmB wykazały, że zarówno rekombinowany enzym wyizolowany z *E. coli*, jak i natywny, uzyskany z *S. denitrificans*, tworzy masywne agregaty (>600 kDa) [21]. Ten fakt nie zaskakuje, biorąc pod uwagę, iż dowiedziono, że białko w natywnych warunkach jest zasocjowane z wewnętrzną błoną komórkową *S. denitrificans* [8]. Połączenie AcmB z błoną jest najprawdopodobniej wynikiem jej oddziaływań z hydrofobowymi aminokwasami zlokalizowanymi licznie na powierzchni białka (**Rys. 33**; **Rozdział 4.2.2**). Te same oddziaływania odpowiadają, w głównej mierze, za agregację białka. Świadczy o tym fakt, iż agregacje udało się w znaczącym stopniu ograniczyć przy użyciu niejonowych detergentów, oddziałujących z hydrofobowymi regionami na powierzchni AcmB. Detergenty niejonowe są ogólnie uważane za łagodne i niedenaturujące. Daje to możliwość rozpuszczenia białek błonowych bez wpływu na strukturę proteiny, a w przypadku enzymów na właściwości katalityczne [131]. Tak też stało się w przypadku AcmB. Dodatek detergentu i będąca jego skutkiem deagregacja spowodowały wzrost aktywności enzymu (**Tab. 6**). Nie bez znaczenia w kontekście agregacji AcmB wydaje się też obecność cysteiny na powierzchni białka. Choć zastosowanie czynnika redukującego w postaci BME do oczyszczania AcmB (bez dodatku detergentów, **Rys. 23A**) nie przyniosło wymiernych korzyści, zastosowanie stabilniejszego TCEP (z dodatkiem detergentów, **Rys. 23D**) pozwoliło uzyskać po raz pierwszy frakcję monomeru AcmB. Ponadto prowadzone w zespole badania dowiodły, że mechanizm

agregacji Acmb, inicjowany przez oddziaływania hydrofobowe, może być wzmacniany przez oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy monomerami białka a agregatami. Wynika to z różnic w wartości punktu izoelektrycznego monomeru enzymu ($pI = 8,6$) i agregatów ($pI = 4,7-5,2$), które w środowisku obojętnym przyciągają się wzajemnie, potęgując efekt agregacji [108].

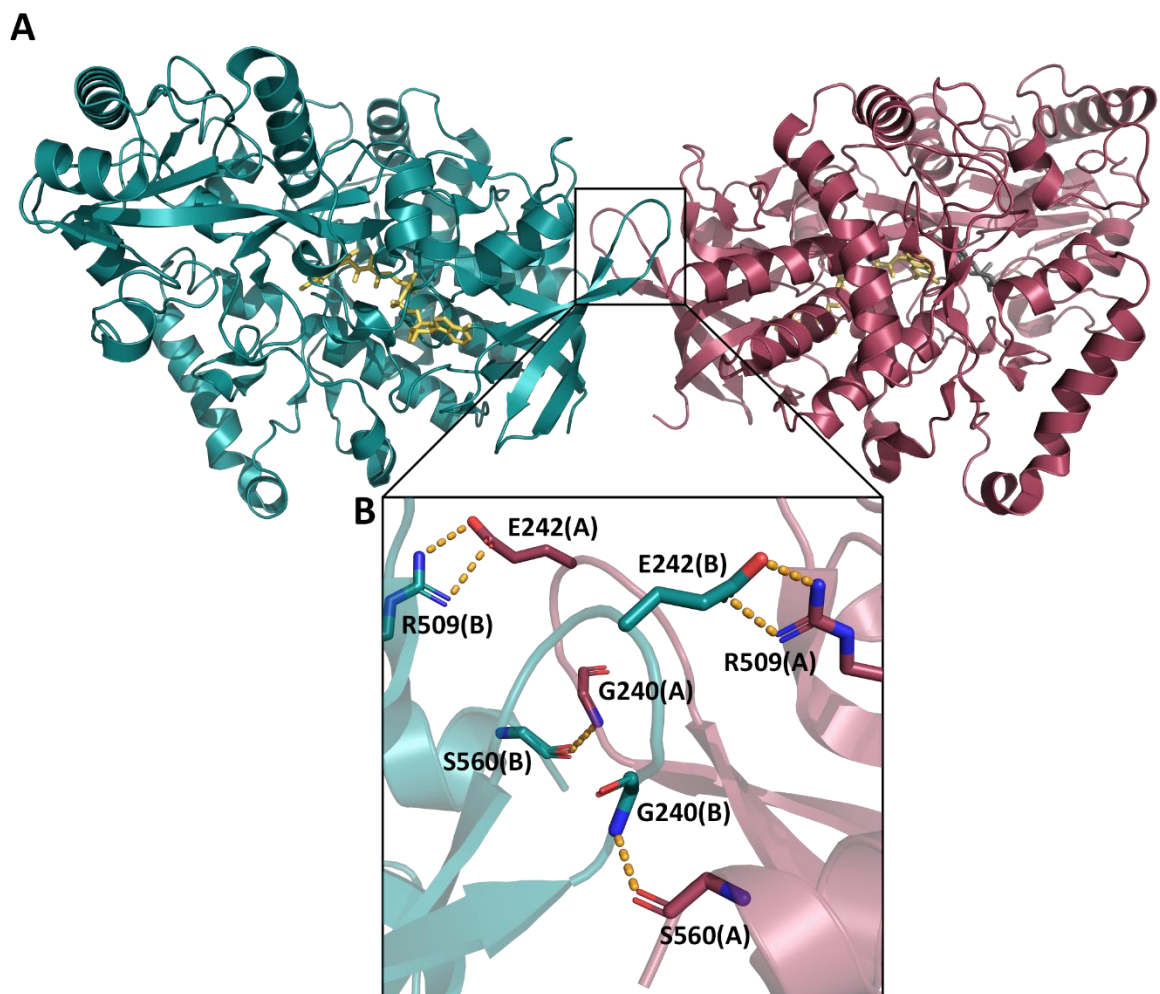
Badania z zastosowaniem DLS wykazały, że białko tworzy agregaty, nawet gdy jego stężenie zostanie obniżone do $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ [108]. Dopiero potraktowanie białka SDS pozwoliło na jego deagregację w zakresie stężeń $0,03-0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ i obliczenie średnicy hydrodynamicznej Acmb. Jednak detergenty jonowe, takie jak SDS, choć niezwykle skuteczne, prawie zawsze w pewnym stopniu białko denaturują [131]. Niemniej poza DLS i filtracją żelową z dodatkiem detergentów, również obrazowane z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych (bez dodatku detergentów) wykazało obecność monomerów Acmb. Było to możliwe przy bardzo wysokim rozcieńczeniu roztworu białka do $2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ [108].

4.2.2. Struktura krystaliczna

Ogólna struktura

W wyniku optymalizacji warunków krystalizacji otrzymano jeden, dobrze wykształcony kryształ o wymiarach $0,5 \times 0,2 \times 0,2 \text{ mm}$ i intensywnie żółtej barwie. Charakterystyczna barwa kryształu, wskazywała na obecność kofaktora FAD przyłączonego do cząsteczki badanego enzymu. Pomiar dyfrakcyjne przeprowadzone z wykorzystaniem promieniowania synchrotronowego i w warunkach niskiej temperatury pozwoliły zarejestrować dane z rozdzielczością maksymalną $1,84 \text{ \AA}$. Metoda podstawienia molekularnego, z użyciem KSTD1 jako modelu początkowego struktury (PDB ID: 4C3Y, identyczność sekwencji aminokwasowej: 35,6% – wynik uzyskany przy użyciu serwera NCBI BLAST) pozwoliła na rozwiązanie struktury. Wstępny model został przebudowany i udokładniony z rozdzielczością $1,84 \text{ \AA}$. Jakość uzyskanych map Fouriera pozwoliła na zlokalizowanie w strukturze cząsteczek FAD i ADD (**9; Rys. 2**). Otrzymana struktura kompleksu badanego enzymu z ligandami została zdeponowana w Protein Data Bank (PDB ID: 7P18).

Acmb w kompleksie z FAD i ADD krystalizuje w układzie trygonalnym w grupie przestrzennej $P3_121$ z dwiema cząsteczkami w jednostce asymetrycznej (**Rys. 25A**).



Rys. 25. Łańcuch **A** oraz **B** Acmb z widocznym **FAD** oraz **ADD** (**A**). Miejsce kontaktu łańcuchów **A** i **B** z zaznaczonymi **wiązaniem wodorowymi** pomiędzy nimi (**B**).

Zawartość wody w kryształach wynosi 55%. Dane statystyczne z pomiaru dyfrakcyjnego i udokładniania struktury AcmbB zostały zebrane w **Tab. 8**. Obliczona mapa Fouriera pozwoliła na zidentyfikowanie pozycji atomów łańcucha głównego i łańcuchów bocznych aminokwasów od 4 (w łańcuchu A) lub 5 (w łańcuchu B) do 561. Natomiast reszty aminokwasów L194 w łańcuchu A oraz M180, L194 i L198 w łańcuchu B nie zostały uwzględnione w ostatecznym modelu, ze względu na brak w tych rejonach mapy 2Fo-Fc wyraźnych obszarów wskazujących na położenie wspomnianych fragmentów struktury. Zarówno w łańcuchu A jak i w łańcuchu B analiza map Fouriera pozwoliła na dodanie do modelu kofaktora FAD, natomiast tylko w łańcuchu A zidentyfikowano w miejscu aktywnym enzymu cząsteczkę ADD.

Pomiędzy łańcuchami zidentyfikowano obecność 6 wiązań wodorowych (**Rys. 25B**) – dwa między łańcuchami bocznymi kwasu glutaminowego E242 jednego łańcucha i argininy R509 z drugiego łańcucha, oraz jedno tworzone pomiędzy grupami funkcyjnymi

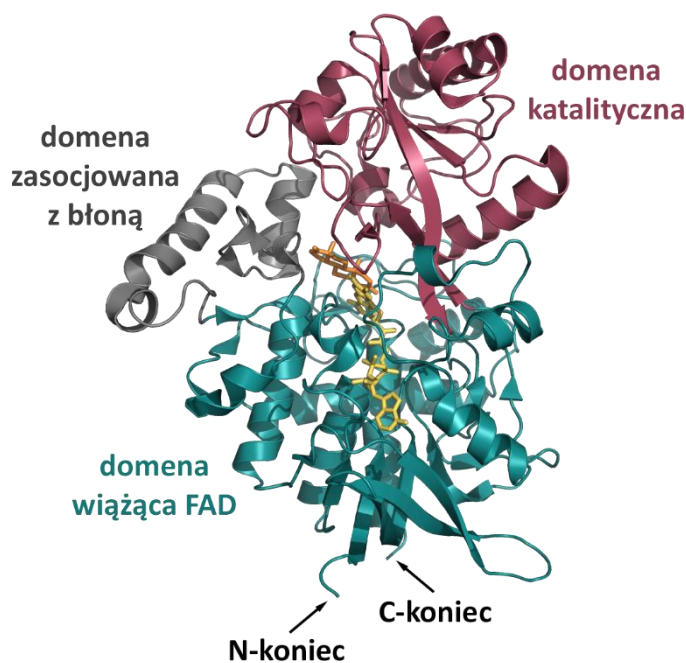
wiązań peptydowych (seryny S560 w jednym łańcuchu i glicyny G240 w drugim). Jednak podobnie jak w przypadku KSTD1 (**Rozdział 1.1.2**), biorąc pod uwagę wyniki przedstawione w powyższym **Rozdziale 4.2.1**, wiązania te wydają się biologicznie nieistotne. W celu sprawdzenia podobieństwa łańcuchów obliczono średnie odchylenia położenia atomów C α dla łańcuchów A i B. Otrzymana wartość 0,174 Å świadczy o wysokim podobieństwie ich sfałdowania.

Tab. 8. Dane statystyczne z pomiaru dyfrakcyjnego i udokładniania struktury AcmB (w nawiasie podano wartości dla zakresu danych o najwyższej rozdzielczości).

Parametr	Wartość
PDB ID	7P18
Dane dyfrakcyjne	
Źródło promieniowania	BESSY BEAMLINE 14.1
Detektor	DECTRIS PILATUS 6M
Długość fali [Å]	0,9184
Rozdzielczość [Å]	47,71–1,84 (1,84–1,89)
Grupa przestrzenna	P3 ₁ 21
α ; β ; γ [°]	90; 90; 120
a; b; c [Å]	130,37; 130,37; 139,74
Liczba molekuł w jednostce asymetrycznej	2
Współczynnik Matthews [Å ³ Da ⁻¹]	2,76
Zawartość rozpuszczalnika [%]	55,48
R _{merge}	0,113 (0,719)
CC _{1/2}	0,979 (0,515)
I/ σ (I)	1,6 (11,4)
Kompletność [%]	99,52 (98,7)
Liczba zmierzonych refleksów	119085
Redundancja	6,9 (6,7)
Czynnik B [Å ²]	29,4
Udokładnianie struktury	
Rozdzielczość [Å]	47,71–1,84
Kompletność [%]	99,52
Liczba refleksów	116410
R _{work} /R _{free}	0,185/0,214
Liczba atomów	9574
Czynnik B [Å ²]	35,8
Jakość struktury	
<i>RMSD</i>	
Długości wiązania [Å]	0,009
Kąty wiązania [°]	1,523
<i>Statystyka Ramachandrana</i>	
Preferowane [%]	97,1
Dozwolone [%]	99,8

Odstające [%]	0,2
<i>MolProbity</i>	
Bliskie oddziaływania (ang. Clashscore)	2,91 (99 percentyl)
Inne rotamery [%]	0,69
Preferowane rotamery [%]	96,22
Jakość struktury w oparciu o MolProbity	1,23 (99 percentyl)

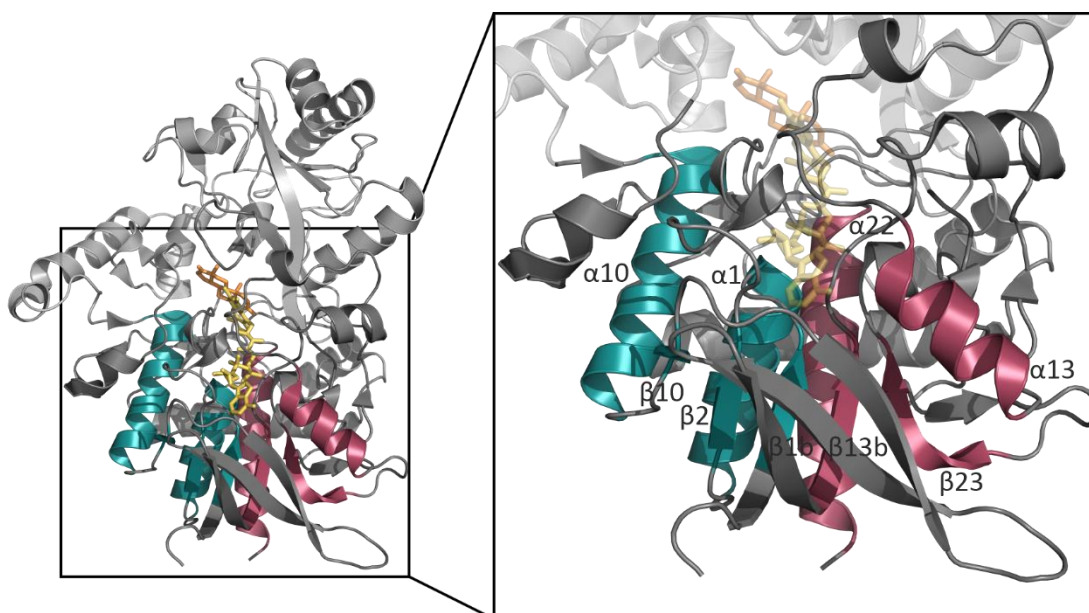
Cząsteczka Acmb posiada wydłużony kształt, a jej wymiary (uśrednione na podstawie wymiarów obu cząsteczek obecnych w jednostce asymetrycznej) wynoszą $\sim 52 \times 55 \times 72 \text{ \AA}^3$, objętość cząsteczki enzymu wynosi 69445 \AA^3 , a jej powierzchnia 21035 \AA^2 . α -Helisy i 3_{10} -helisy formowane są przez 43% aminokwasów Acmb, struktura β -arkuszy obejmuje 19% sekwencji, a pozostałe 38% łańcucha białkowego to pętle łączące poszczególne elementy struktury drugorzędowej. W obu łańcuchach A i B liczba α -helis i 3_{10} -helis jest taka sama i wynosi odpowiednio 15 oraz 7, a 7 β -arkuszy utworzonych jest przez 23 nici β . Badane białko wykazuje budowę domenową. Wyróżniono domenę wiążącą FAD, domenę katalityczną oraz domenę zasocjowaną z błoną (**Rys. 26**). Dwie pierwsze domeny występują w KSTD1, natomiast domena zasocjowana z błoną jest charakterystyczna tylko dla Acmb.



Rys. 26. Struktura Acmb z wyróżnionymi: **domeną wiążącą FAD**, **domeną katalityczną** i **domeną zasocjowaną z błoną**.

Domena wiążąca FAD enzymu Acmb składa się z trzech fragmentów, utworzonych przez aminokwasy E4–A152, K205–W319 i K499–K561. Rdzeń tej domeny stanowi

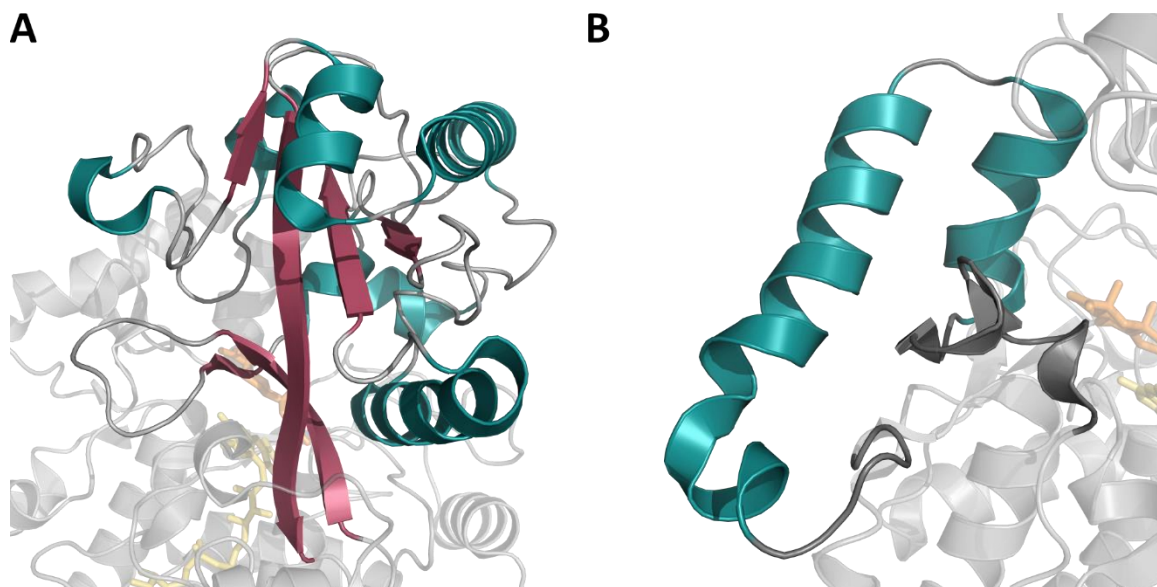
charakterystyczny dla białek wiążących FAD motyw Rossmanna (**Rys. 27**), zbudowany analogicznie jak w przypadku KSTD1 (**Rozdział 1.1.2**).



Rys. 27. Domena wiążąca FAD Acmb z wyróżnionym motywem Rossmanna: **β1-α1-β2-α11-β10** oraz **β13b-α14-β23-α23**.

Na jego pierwszą część składa się β-arkusz utworzony z trzech równoległych nici β oraz leżące naprzeciw dwie α-helisy (β1b-α1-β2-α10-β10). Drugą część stanowi β-arkusz złożony z dwóch równoległych nici β zlokalizowanych pomiędzy dwiema α-helisami (β13b-α13-β23-α22). Analogicznie jak w przypadku KSTD1 odstępstwo od klasycznej wersji motywu Rossmanna stanowi brak trzeciej nici β w drugiej części motywu oraz fakt, że obie części łączy β-meander (β11-β12-β13a), a nie α-helisa. Są to cechy typowe dla FAD-zależnych dehydrogenaz [132]. Pomiedzy nicią β2 i helisą α10 znajdują się liczne elementy struktury drugorzędowej oraz domena zasocjowana z błoną, helisę α13 i nić β23 poza elementami struktury drugorzędowej dzieli też domena katalityczna.

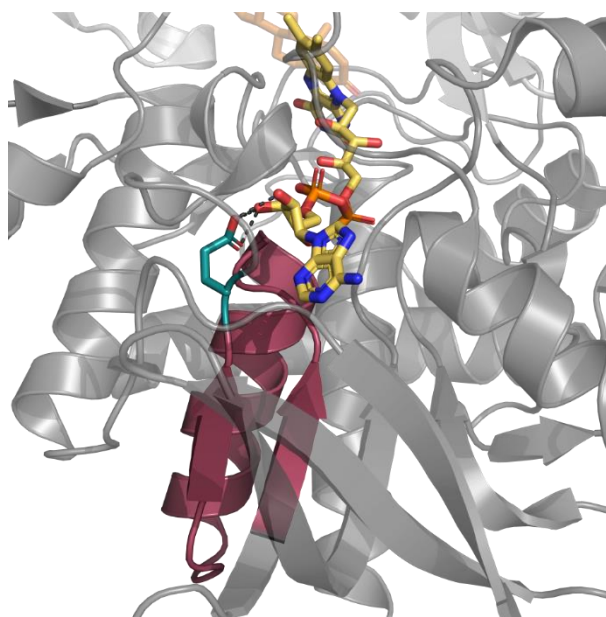
Rusztowanie domeny katalitycznej (A320–T498) stanowi β-arkusz złożony z 6 antyrównoległych nici β (β15–β20) otoczony 7 α-helisami o różnej długości (**Rys. 28A**). Na **Rys. 28B** zaprezentowano domenę zasocjowaną z błoną (Y153–R204), którą tworzą z kolei dwie α-helisy połączone krótką pętlą (więcej w „**Pętla**”).



Rys. 28. Domeny AcMB: katalityczna (A) i zasocjowana z błoną (B).

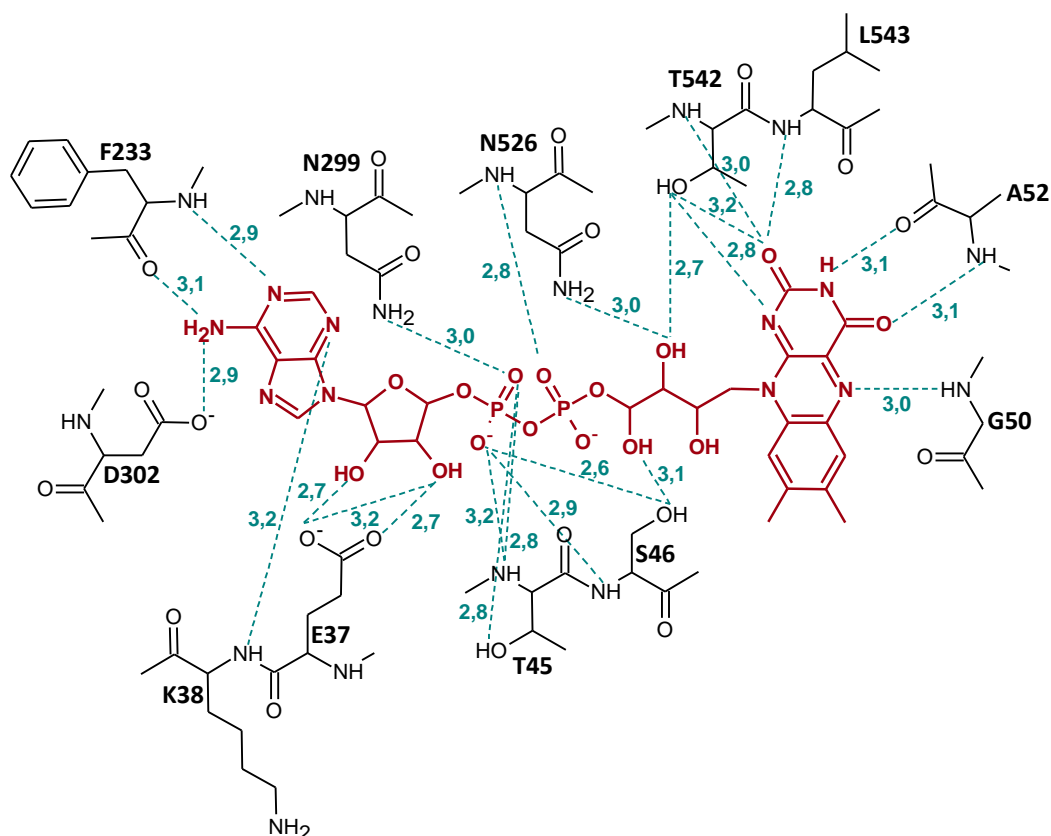
Miejsce wiązania FAD

Ze względu na liczne insercje w obrębie opisanego wcześniej motywu Rossmanna (obecnych szczególnie we fragmencie pomiędzy $\beta 2$ a $\alpha 10$) można stwierdzić, że AcMB należy do podrodziny GR₂ rodziny strukturalnej reduktazy glutationowej (GR). Wspomniane insercje powodują, że dopasowanie sekwencji aminokwasowej białek należących do tej podrodziny jest możliwe tylko w przypadku ~30 pierwszych reszt aminokwasowych z N-końca [132].



Rys. 29. Domeny katalityczna AcMB z widocznym FAD, fragmentem motywu Rossmanna (charakterystycznym dla rodziny GR) oraz resztą aminokwasową E37.

Najbardziej konserwatywnym motywem strukturalnym rodziny GR jest sekwencja **xhxhGxGxxGxxxhxxh(x)₈hxE(D)** (gdzie **x** oznacza dowolny aminokwas, a **h** aminokwas hydrofobowy) stanowiąca część motywu Rossmanna i znajdująca się w N-końcowej części białka [132]. W przypadku Acmb, jak i w strukturze KSTD1, analizowany fragment różni się od wersji podstawowej tym, iż w miejscu trzeciej konserwatywnej glicyny występuje alanina, a liczba dowolnych aminokwasów pomiędzy dwoma hydrofobowymi aminokwasami w końcowej części sekwencji wynosi 7 xhxhGxGxxAxxxhxxh(x)₇hxE(D) (dla Acmb: ¹⁰VIVVGSAGAMLAARAHDLGLSVLVVE³⁷). Fragment ten tworzy początkowy obszar motywu Rossmanna (β 1b- α 1- β 2) (**Rys. 29**). Reszty hydrofobowe obecne w omawianej sekwencji generują liczne oddziaływania hydrofobowe pomiędzy α -helisą i β -arkuszem. Ujemnie naładowana, konserwatywna reszta kwasu glutaminowego (E37) kończąca motyw tworzy wiązania wodorowe z grupami hydroksylowymi rybozy adenylozomonofosforanu.



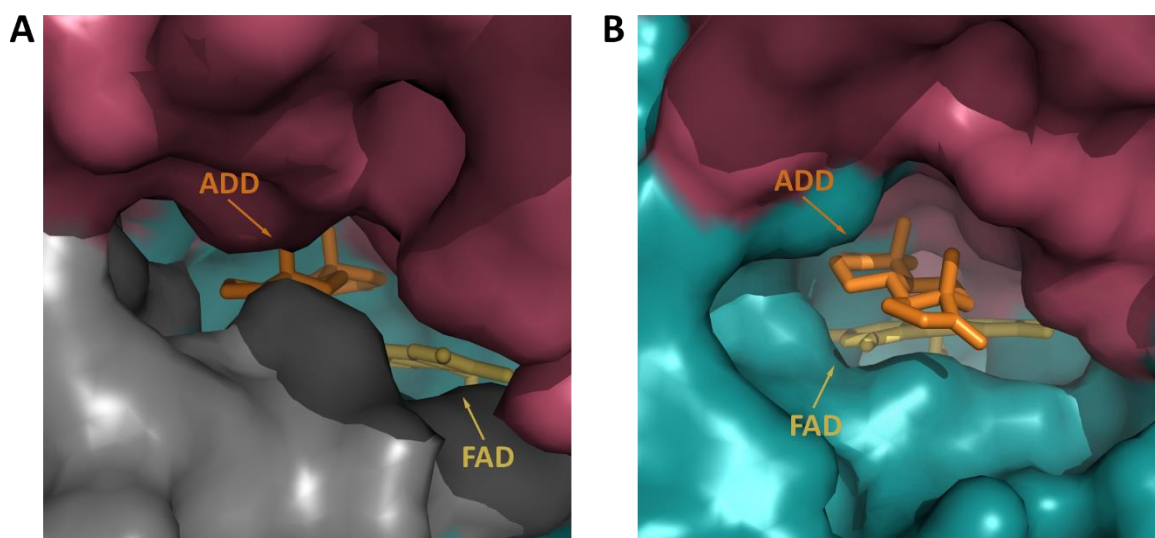
Rys. 30. Schemat przedstawiający **wiązania wodorowe** pomiędzy **FAD** i Acmb, odległości zostały wyrażone w Angstrmach.

Niekowalencyjnie związane z białkiem kofaktor FAD w przypadku Acmb, jak i innych białek należących do rodziny strukturalnej GR, przyjmuje konformację wydłużoną,

w której pierścień adeninowy jest oddalony od pierścienia izoalloksazyny. Równie charakterystyczny dla tej rodziny jest kierunek ułożenia FAD – pierścień adeninowy skierowany jest w stronę domeny wiążącej, a pierścień izoalloksazyny skierowany na zewnątrz [132]. W przypadku Acmb planarny pierścień izoalloksazyny znajduje się na granicy między domeną katalityczną i domeną wiążącą FAD. Kofaktor w formie utlenionej wiązany jest do apoenzymu głównie przez liczne wiązania wodorowe (**Rys. 30**) tworzone z łańcuchami bocznymi lub łańcuchem głównym aminokwasów: E37, K38, T45, S46, G50, A52, F233, N299, D302, N526, T542 oraz L543. Analiza oddziaływań Acmb–FAD wykazała także liczne interakcje typu π -alkil (V13, K38, I496, F338), π -sigma (A270, L543) oraz alkil-alkil (A294, I496).

Centrum aktywne

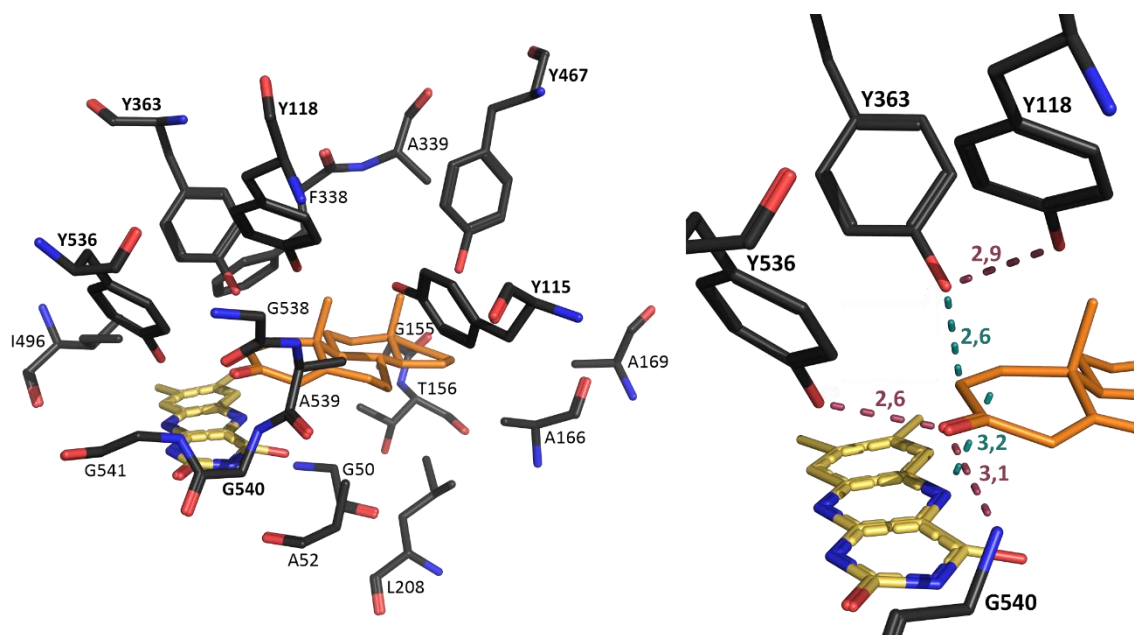
Ze względu na obecność dodatkowej domeny, wejście do centrum aktywnego Acmb jest znacznie bardziej zabudowane niż w przypadku centrum KSTD1 (**Rys. 31**).



Rys. 31. Wejście do centrum aktywnego Acmb (**A**) i KSTD1 (**B**) z widocznym **FAD**, **ADD**, **domeną wiążącą FAD**, **domeną katalityczną** i domeną zasocjowaną z błoną.

Jak już wcześniej wspomniano, tylko w łańcuchu A enzymu Acmb udało się zidentyfikować w centrum aktywnym produkt reakcji ADD (roztwór białka inkubowano z produktem przed krystalizacją). Miejsce wiązania produktu w Acmb jest analogiczne jak w strukturze KSTD1, tj. osiowe grupy metylowe przy węglach C10 i C13 zwrócone są w kierunku domeny katalitycznej, a pierścień A steranu jest niemalże równoległy do izoalloksazyny. Ligand znajduje się w obszarze kontaktu wszystkich trzech domen tworzących cząsteczkę Acmb. Na **Rys. 32** przedstawiono aminokwasy znajdujące się w odległości mniejszej lub

równej 5 Å od cząsteczki ADD. Można zauważyć, że w najbliższym otoczeniu liganda znalazły się reszty aminokwasowe wszystkich domen, a większość z nich ma charakter niepolarny. Tlen grupy karbonylowej przy węglu C3 ADD tworzy wiązania wodorowe z grupą hydroksylową tyrozyny Y536 i azotem wiązania peptydowego G540. Dodatkowo steroidowy rdzeń tworzy oddziaływania typu π -alkil lub alkil-alkil z aminokwasami A52, F338, Y363 oraz A539.



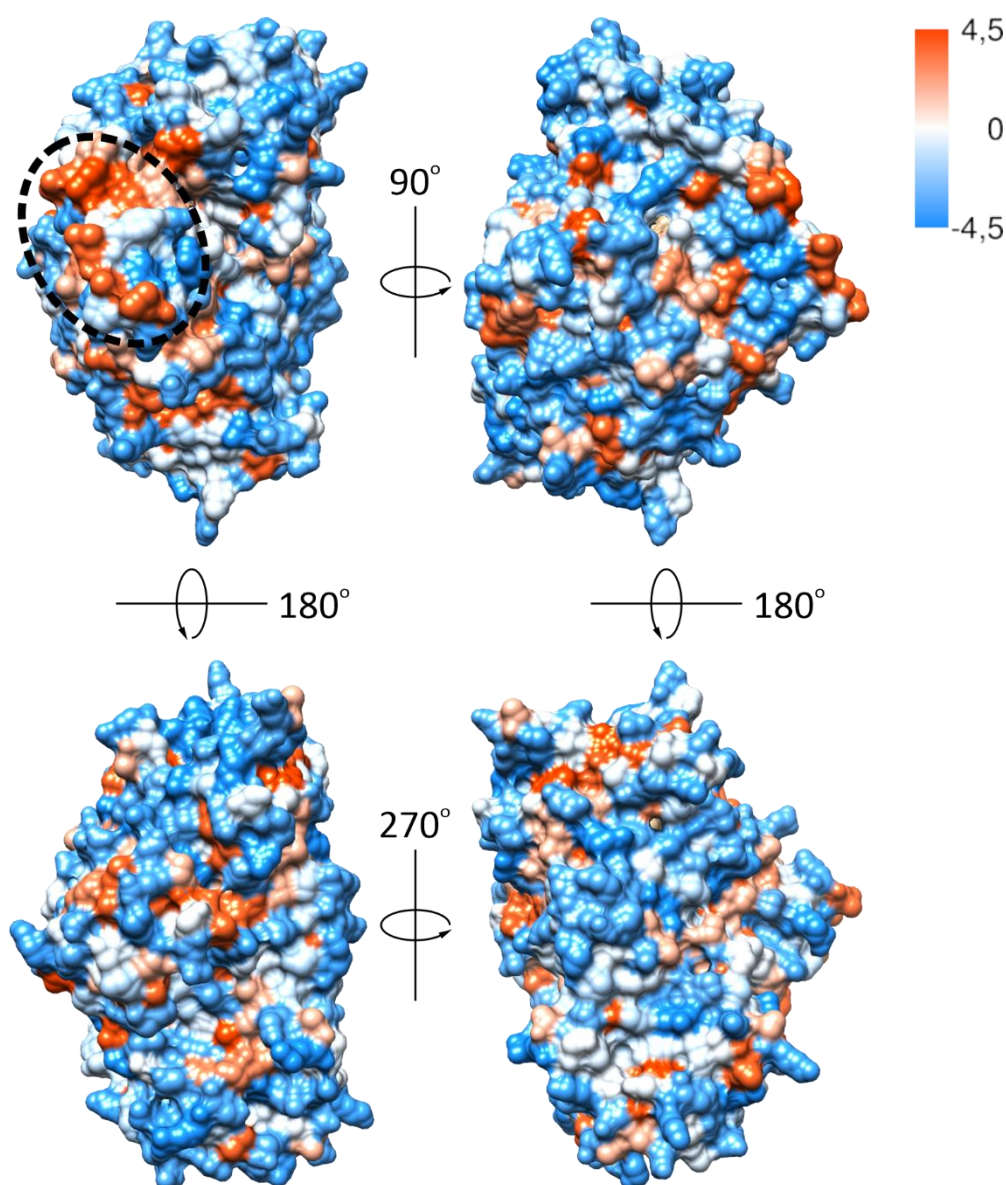
Rys. 32. Centrum aktywne AcMB z przyłączonymi **ADD**, **FAD** oraz **aminokwasami** znajdującymi się w odległości ≤ 5 Å od ADD. Długości widocznych **wiązań wodorowych** i **odległości** zostały wyrażone w Angstrmach.

Jeśli reakcja katalizowana przez AcMB przebiega analogicznie jak przy udziale KSTD1 (**Rozdział 1.1.3**), rolę aminokwasu odpowiedzialnego za oderwanie pierwszego protonu od węgla C2 substratu mogłaby pełnić tyrozyna Y363, której atom tlenu grupy hydroksylowej znajduje się w odległości 2,6 Å od atomu C2 steroidu. Aminokwas ten jest stabilizowany przez wiązanie wodorowe utworzone z Y118. Z kolei odległość pomiędzy atomem N5 izoalloksazyny, który miałby stanowić akceptor drugiego z protonów, a węglem C1 wynosi 3,2 Å (więcej na temat weryfikacji postulowanego mechanizmu reakcji opisano w **Rozdziale 4.5.1**).

Powierzchnia

Celem lepszego zrozumienia wyników uzyskanych z wykorzystaniem filtracji żelowej i DLS (**Rozdział 4.2.1**) przeanalizowana została powierzchnia białka pod kątem jej hydrofobowości oraz potencjału elektrostatycznego.

Hydrofobowość powierzchni została opisana za pomocą skali Kyte-Doolittle [133] (**Rys. 33**), gdzie resztom aminokwasowy zostały przypisane wartości hydrofobowości od $-4,5$ (dla argininy) do $4,5$ (dla izoleucyny). Im wyższa wartość, tym większa hydrofobowość danego aminokwasu. Na **Rys. 33** przedstawiono powierzchnię AcMB, a kolorem pomarańczowym oznaczone zostały reszty powierzchniowych aminokwasów o hydrofobowym charakterze łańcucha bocznego, natomiast niebieskim te o charakterze hydrofilowym.

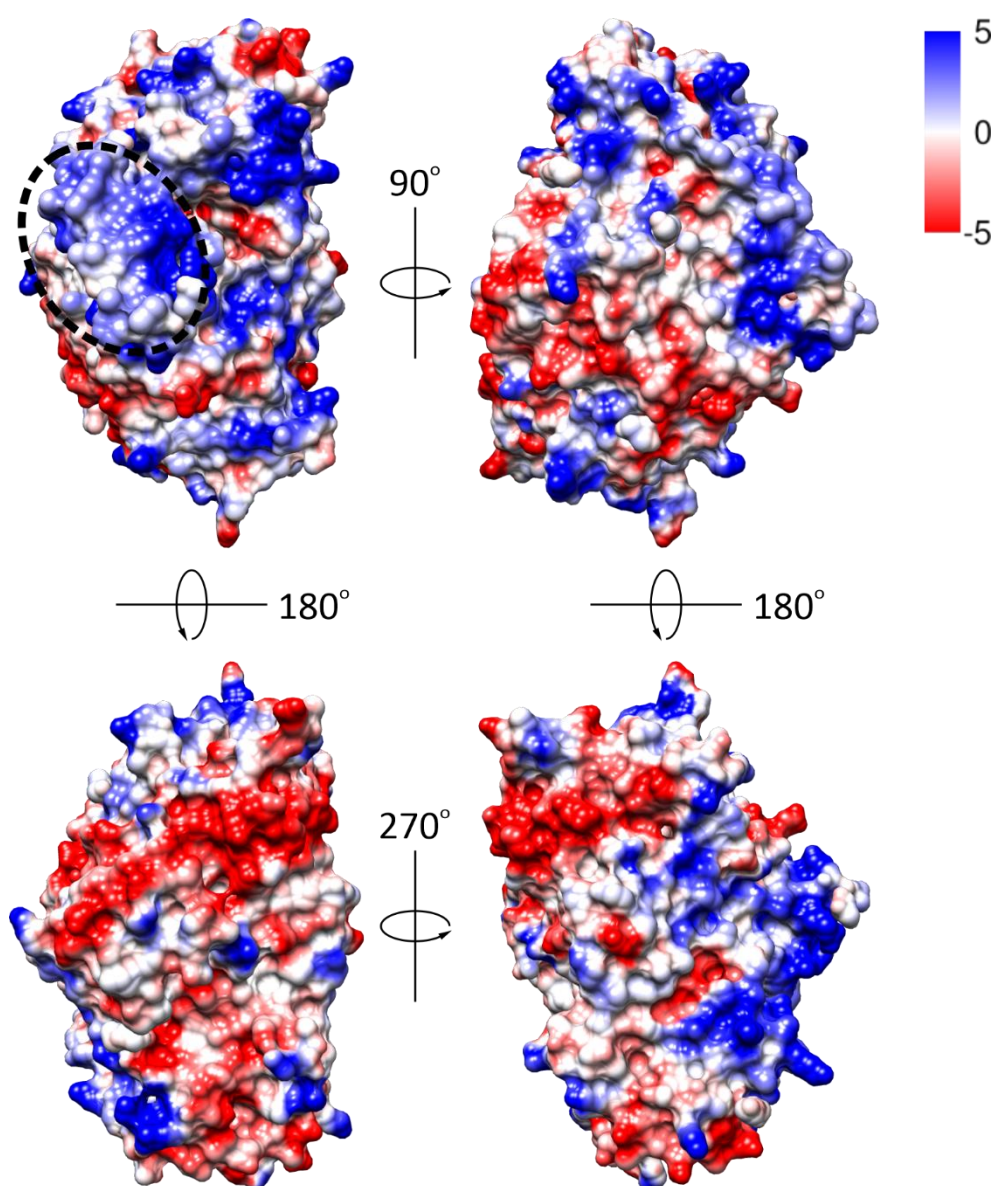


Rys. 33. Hydrofobowość powierzchni AcMB opisana za pomocą skali Kyte-Doolittle.

Na rysunku można zauważyć, że niemalże na całej powierzchni białka znajdują się obszary skupiające hydrofobowe aminokwasy, których wzajemne oddziaływania mogą inicjować opisaną wcześniej agregację AcMB. Największe skupisko silnie hydrofobowych

reszt aminokwasowych znajduje się w obrębie domeny zasocjowanej z błoną (na rysunku zaznaczoną przerywaną linią), co stanowiło podstawę do wysunięcia teorii na temat roli pełnionej przez ten fragment białka w oddziaływaniu z dwuwarstwą lipidową błon.

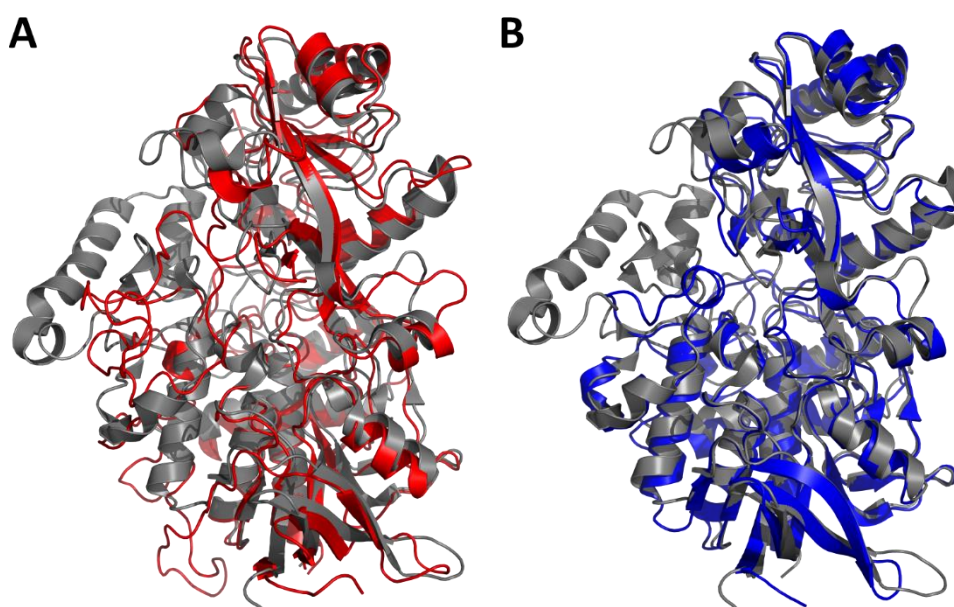
Z kolei na **Rys. 34** zaprezentowana została powierzchnia Acmb z zaznaczonymi na granatowo aminokwasami posiadającymi ładunek dodatni (arginina, lizyna, histydyna), a kolorem czerwonym uwidoczniono reszty aminokwasowe naładowane ujemnie (kwas asparaginowy, kwas glutaminowy). Czarną przerywaną linią zaznaczono obszar dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych budujących domenę zasocjowaną z błoną.



Rys. 34. Potencjał elektrostatyczny powierzchni Acmb opisany zgodnie z prawem Coulomba.

„Pętla”

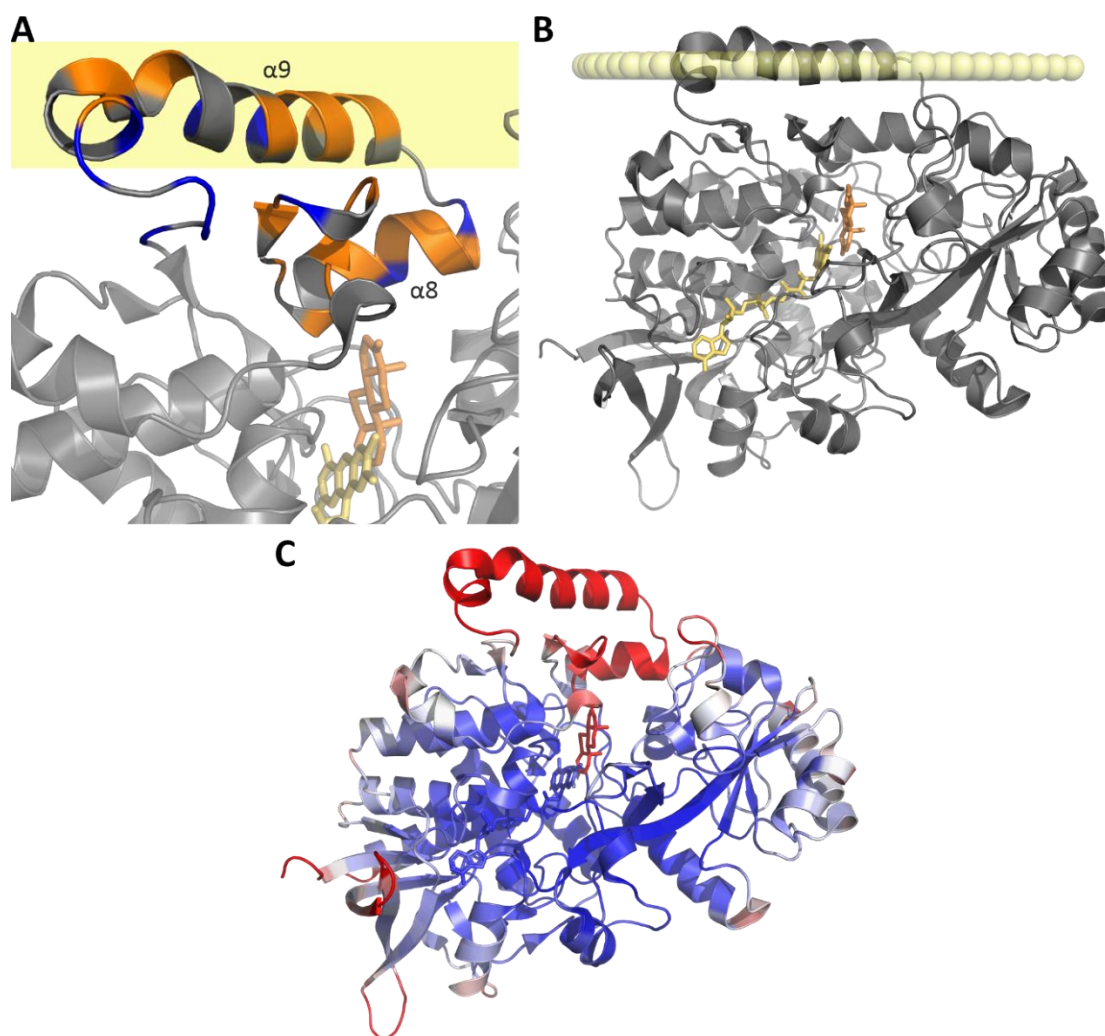
Ze względu na unikatowość w świecie drobnoustrojów sekwencji kodującej domenę Acmb zasocjonowaną z błoną, początkowo spodziewano się, że fragment ten będzie nieuporządkowany. Brak podobnych sekwencji u białek pochodzenia mikrobiologicznego sprawił, że modelowanie homologiczne wskazywało na obecność w strukturze długiej pętli [108] (**Rys. 35A**), a nie α -helisy. Na **Rys. 35B** zaprezentowano strukturę KSTD1 nałożoną na strukturę Acmb, gdzie wyraźnie widać, że jedynym fragmentem białka nieobecnym w pierwszej poznanej strukturze krystalicznej Δ^1 -KSTD jest właśnie dodatkowa domena.



Rys. 35. Model homologiczny przygotowany przez dr Agnieszkę Wojtkiewicz [108] (**A**) oraz struktura **KSTD1** [27] (**B**) nałożone na strukturę **Acmb**.

Acmb jest białkiem o charakterze amfipatycznym, którego większa część zlokalizowana jest w cytoplazmie lub przestrzeni peryplazmatycznej, a stosunkowo niewielki fragment wiąże się z błoną cytoplazmatyczną przez oddziaływania dyspersyjne i elektrostatyczne. Biorąc pod uwagę tendencję Acmb do agregacji, której nie zaobserwowano w przypadku KSTD1, można postawić hipotezę, że to właśnie dodatkowa domena odpowiada za zakotwiczenie białka w bakteryjnej błonie cytoplazmatycznej. Prawdopodobnie do związania białka z błoną dochodzi przez dłuższą, amfipatyczną α -helisę ($\alpha 9$) (**Rys. 36A**) stanowiącą część domeny nazwanej domeną zasocjonowaną z błoną. Oś helisy w takim przypadku leży równoległe do dwuwarstwy lipidowej. Jej hydrofobowa część jest odseparowana od środowiska wodnego i wnika w obszar polarnych grup

dwuwarstwy lub interkaluje w dwuwarstwowy rdzeń. Polarna powierzchnia helisy oddziałuje natomiast z fazą wodną i ujemnie naładowanymi grupami fosforylowymi [134]. Taka orientacja białka lokowałaby też centrum aktywne w bezpośrednim sąsiedztwie błony i rozpuszczonych w niej steroidów. Wspomniany sposób asocjacji z błoną jest dość powszechny wśród enzymów transformujących steroidy, czego najlepszym przykładem jest oksydaza cholesterolu [135].



Rys. 36. Domena zasocjowaną z błoną, z zaznaczonymi **aminokwasami o hydrofobowości >0** [133] i **aminokwasami dodatnio naładowanymi** (A). Orientacja AcmbB w błonie na podstawie symulacji przy użyciu serwera PPM 3.0 (B) [122]. Struktura AcmbB pokolorowana zależnie od wartości czynnika B reszt aminokwasowych, aby pokazać ich względną ruchliwość (**czzerwony** - reszty o wysokiej wartości czynnika B (max 50), **niebieskim** - niskie (min 20) (C).

AcmbB zostało też analogicznie spozycjonowane względem błony przy użyciu serwera PPM 3.0, który uwzględnia oddziaływania hydrofobowe, wiązania wodorowe i elektrostatyczne białek z anizotropowym środowiskiem wodno-lipidowym opisanym przez stałą dielektryczną i profile wiązań wodorowych (**Rys. 36B**) [122].

Jak zaprezentowano na **Rys. 31A**, gdy białko wchodzi w kompleks z ligandem przyjmuje konformację zamkniętą, a centrum aktywne wydaje się niedostępne z zewnątrz. Występowanie w obrębie centrum aktywnego Δ^1 -KSTD pętli mogących mieć wpływ na katalizowaną przez enzymy reakcje zauważył dla kilku modeli homologicznych Luo *et al.* Naukowcy zaobserwowali, że obecność długich pętli (być może tworzących w rzeczywistości inne elementy struktury drugorzędowej) wpływa negatywnie na aktywność posiadających je enzymów przez utrudnienie dostępu substratu do centrum aktywnego [77]. Przysłaniająca centrum aktywne Acmb domena zasocjowana z błoną jednocześnie jest najbardziej elastycznym i ruchomym elementem struktury tego enzymu, czego dowodzi analiza wartości czynnika przemieszczenia reszt aminokwasowych (**Rys. 36C**). Fakty te wskazują, że owa domena lub jej część mogłyby pełnić funkcję wieczka domykającego centrum aktywne po związaniu się substratu do białka. Jednoznaczne potwierdzenie tej teorii wymagałoby krystalizacji białka bez dodatku liganda, co z kolei okazało się być trudne w realizacji. Wydaje się, że bez względu na to czy dodatkowa domena odpowiada za domknięcie centrum aktywnego, czy jedynie oddziałuje z błoną, jej obecność wpływa na zwiększenie powinowactwa enzymu do 3-ketosteroidów podstawionych w pozycji C17 np. długim alifatycznym łańcuchem (więcej w **Rozdziale 4.4.3**). **Tab. 9** zawiera porównanie ogólnych cech jedynych poznanych do tej pory struktur krystalicznych enzymów z klasy Δ^1 -KSTD.

Tab. 9. Porównanie struktury Acmb oraz KSTD1.

Struktura	Acmb	KSTD1
PDB ID	7P18	4C3Y
Liczba aminokwasów	561	510
Identyczność sekwencji [%]		35,65 ^a
Podobieństwo sekwencji [%]		50,98 ^a
C α RMSD [Å]		0,927
Liczba molekuł w jednostce asymetrycznej	2	8
Ligandy	FAD, ADD	FAD, ADD
Kształt,	wydłużony,	wydłużony,
Wymiary [Å ³]	~52 x 55 x 72	~40 x 45 x 70
Objętość [Å ³]	69445	60070 ^b
Powierzchnia [Å ²]	21035	18240 ^b
Struktura drugorzędowa – α - i 3_{10} -helisy; β -arkusze; pętle [%]	43; 19; 38	39; 21; 40

Domeny	wiążąca FAD, katalityczna, zasocjowana z błoną	wiążąca FAD, katalityczna
Motyw strukturalny rodziny GR	¹⁰ VIVVGSAGAMLA ARAHDLGLSVLVE ³⁷	¹⁰ VLVGS GGAL TGA Y TAAAQGLTTIVLE ³⁷
Aminokwasy tworzące wiązania wodorowe z ligandem	Y536, G540	Y487, G491

^awynik uzyskany przy użyciu serwera NCBI BLAST

^bobliczone dla łańcucha A

4.3. Charakterystyka biochemiczna Acmb

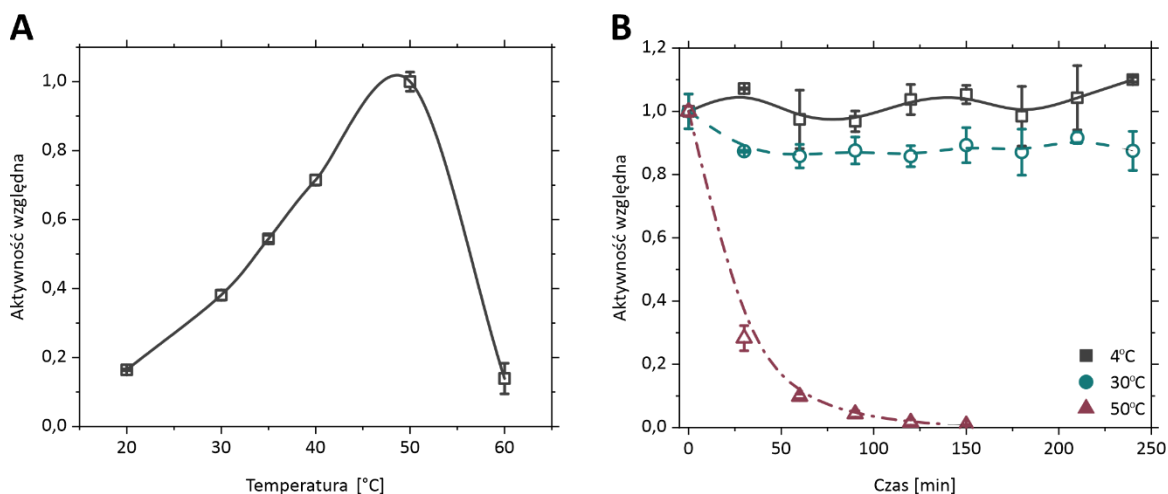
Celem scharakteryzowania Acmb pod względem biochemicznym i wyznaczenia optymalnych warunków reakcji, stosowanych do syntezy Δ^1 -dehydro-3-ketosteroidów (**Rozdział 4.6.1**), określono optimum temperaturowe Acmb, termostabilność, optimum pH oraz stabilność zależną od pH przechowywania.

4.3.1. Optimum temperaturowe i stabilność termiczna

Aby wyznaczyć optimum temperaturowe Acmb, określono aktywność początkową enzymu w zakresie temperatur 20–60°C (**Rys. 37A**). Najwyższą aktywność początkową zaobserwowano w temperaturze 50°C. Wzrost temperatury do 60°C spowodował drastyczny (~90%) spadek aktywności enzymu, co wskazuje na termiczną inaktywację enzymu.

Stabilność termiczną Acmb określono inkubując enzym w 4°C, 30°C oraz 50°C przez 4 h i wykonując pomiar aktywności początkowej co 30 min, każdorazowo w 30°C (**Rys. 37B**). W przypadku inkubacji enzymu na lodzie (4°C) nie zaobserwowano spadku aktywności przez cały okres trwania eksperymentu. Enzym przechowywany w 30°C stracił ok. 10% aktywności po pierwszych 30 min i utrzymał aktywność na poziomie 90% aktywności początkowej przez kolejne 3,5 h. Natomiast w 50°C, po 30 min zaobserwowano utratę 70% aktywności i prawie całkowitą dezaktywację po 2 h doświadczenia. Analogiczne wyniki uzyskano inkubując Acmb w warunkach beztlenowych. Acmb pochodzi z bakterii fakultatywnie anaerobowej, ponadto Δ^1 -KSTD katalizują etap rozkładu cholesterolu niezależny od obecności tlenu, w związku z czym tlen cząsteczkowy nie ma negatywnego wpływu na aktywność i stabilność Acmb. W szczególności na enzym utleniony, który nie jest w stanie katalizować reakcji redukcji

tłenu do H₂O₂. Na podstawie uzyskanych wyników jako optymalne warunki działania Acmb wybrano 30°C.



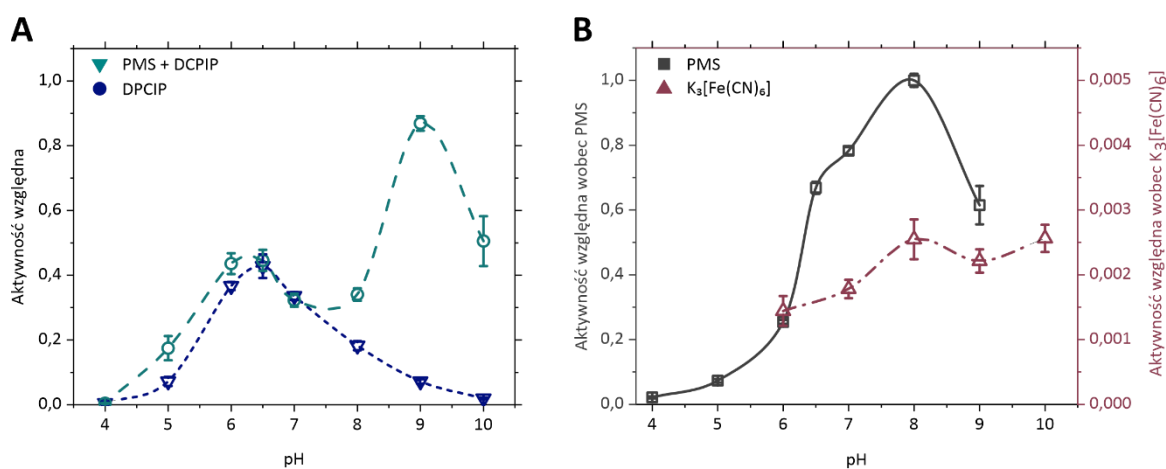
Rys. 37. Zależność aktywności Acmb od temperatury (A) oraz stabilności aktywności Acmb od temperatury inkubacji (B).

4.3.2. Optimum pH i stabilność zależna od pH przechowywania

Z utlenieniem 3-ketosteroidu przez Δ^1 -KSTD związana jest redukcja kofaktora FAD. Zamknięcie cyklu katalitycznego wymaga zastosowania akceptora elektronowego, którego zadaniem jest reutlenienie FAD. Optimum pH reakcji dehydrogenacji katalizowanej przez Acmb w pierwszej kolejności określono w obecności wybranych akceptorów elektronowych, które stanowiły DCPIP (**25**), układ PMS–DCPIP, PMS (**24**) oraz K₃[Fe(CN)₆] (**29**). Sztuczne akceptory elektronowe wyselekcjonowano w oparciu o analizę literatury, jako najczęściej stosowane w reakcjach katalizowanych przez Δ^1 -KSTD [6]. Do eksperymentu zostały wybrane dwa dwuelektronowe akceptory elektronowe: DCPIP ($E^0 = +317$ mV dla redukcji do formy semichinonowej AH₂ lub $E^0 = +230$ mV dla redukcji formy semichinonowej do zredukowanej AH₃, oba wyznaczone w pH 7,0) i PMS ($E^0 = +155$ mV, +126 mV i +100 mV w pH odpowiednio 7,0, 8,0 i 9,0) [136] oraz jeden akceptor jednoelektronowy – K₃[Fe(CN)₆] ($E^0 = +426$ mV w 100 mM buforze fosforanowym o pH 7,8) [137]. Pomiar aktywności przeprowadzono dla 200 μ M DCPIP, 200 μ M PMS oraz układu 200 μ M PMS – 200 μ M DCPIP. Ze względu na niską aktywność Acmb wobec K₃[Fe(CN)₆] stężenie tego związku w eksperymencie wynosiło 2,5 mM. Aktywność początkowa enzymu została wyznaczona w zakresie pH 4,0–10,0. Wszystkie pomiary, poza reakcją z PMS, zostały wykonane w atmosferze tlenowej, z zastosowaniem standardowego testu spektrometrycznego. Ze względu na fotolizę PMS oraz towarzyszące

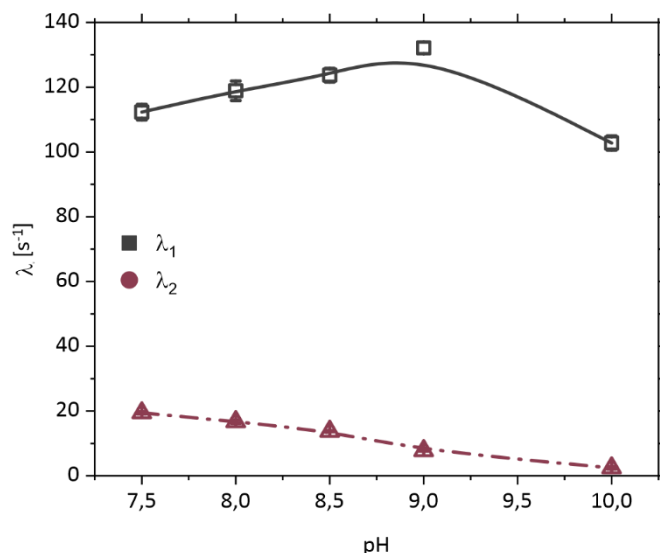
jej reakcje następcze [138], eksperyment z tym związkem wymagał szybkiego pomiaru aktywności w warunkach beztlenowych z zastosowaniem techniki zatrzymanego przepływu.

Wyniki wykazały, że optimum pH Δ^1 -dehydrogenacji katalizowanej przez Acmb silnie zależy od zastosowanego akceptora elektronowego i wynosi 6,5 dla DCPIP, 9,0 dla układu PMS–DCPIP (**Rys. 38A**) lub 8,0 dla PMS oraz $K_3[Fe(CN)_6]$ (**Rys. 38B**). W przypadku zastosowania układu dwóch akceptorów elektronowych PMS–DCPIP, można zauważyć dwa optima pH. Jedno przy pH 6,5, charakterystyczne dla samego DCPIP, a drugie przy pH 9,0, bliższe optimum pH zaobserwowanego dla PMS.



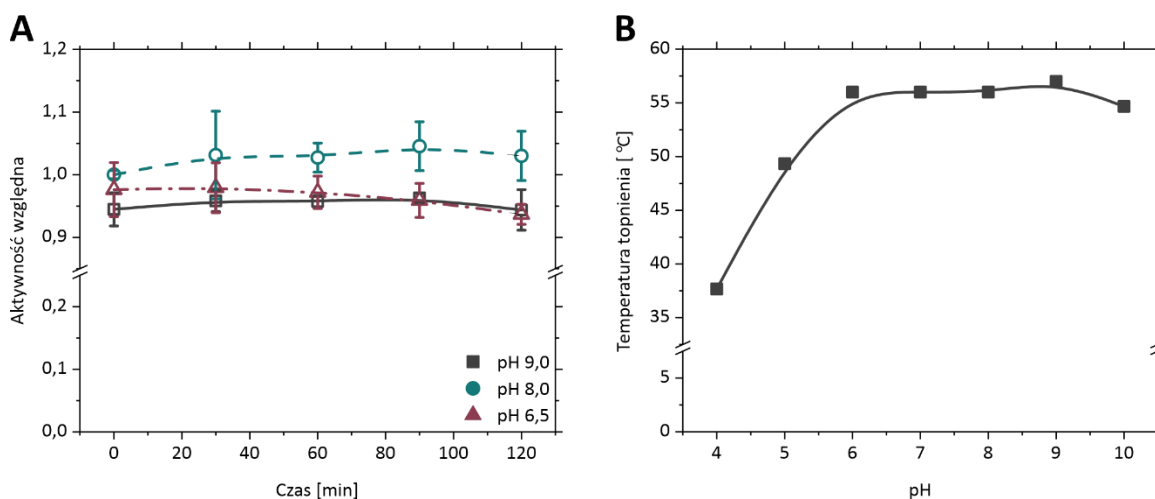
Rys. 38. Optimum pH reakcji katalizowanej przez Acmb, zmierzone w obecności sztucznych akceptorów elektronowych: **DCPIP**, **PMS–DCPIP** (A), **PMS** oraz **$K_3[Fe(CN)_6]$** (B).

Celem wyznaczenia optimum pH reakcji dehydrogenacji, niezależnego od obecności akceptora elektronowego, przeprowadzono pomiar aktywności Acmb w stanie przedstacjonarnym. Enzym uzyskany po oczyszczeniu z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa, przeniesiono do buforów o pH z zakresu 7,5–10,0, z wykorzystaniem odpowiednich kolumn chromatograficznych. Niestety przy wymaganym w eksperymencie wysokim stężeniu białka w niskim pH obserwowano szybką agregację enzymu. W wyniku tego pomiar szybkości redukcji Acmb techniką zatrzymanego przepływu w warunkach przedstacjonarnych nie był możliwy poniżej pH 7,5. Co ciekawe, w wyniku analizy otrzymanych przebiegów uzyskano dwie wartości własne szybkości redukcji FAD (**Rys. 39**).



Rys. 39. Zależność szybkości reakcji katalizowanej przez AcmB od pH.

Najprawdopodobniej jest to wynikiem obecności dwóch form białka – zdeagregowanego i zagregowanego. Dla pierwszego, szybszego z procesów, optimum pH wyniosło 9,0. Z kolei wolniejszy proces postępował najszybciej w pH 7,5. Gdyby zsumować stałe uzyskane dla obu procesów, całkowita szybkość reakcji pozostaje niezmienna w zakresie pH 7,5–9,0. Dopiero wzrost pH do 10,0 powoduje niewielki spadek aktywności AcmB.



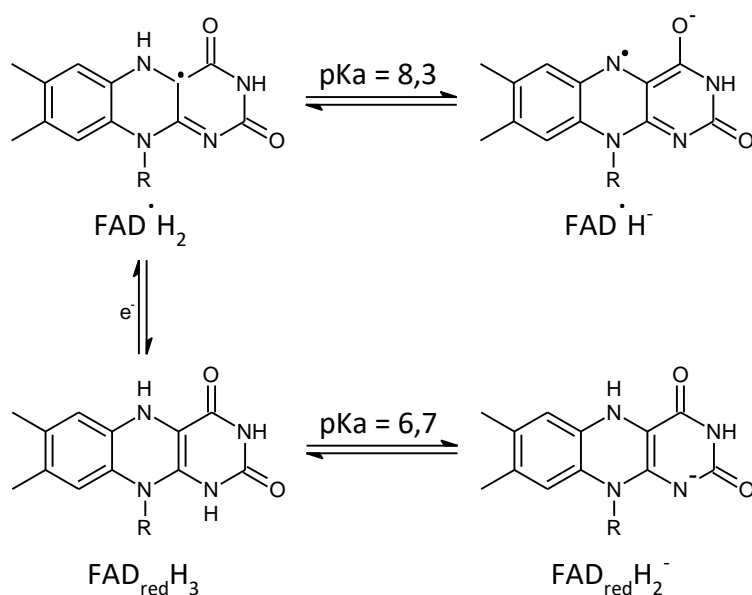
Rys. 40. Zależność stabilności aktywności AcmB od pH inkubacji (A) oraz temperatura topnienia AcmB wyznaczona w funkcji pH (B).

Aby ocenić stabilność białka zależną od pH przechowywania, podobnie jak w przypadku stabilności termicznej, enzym poddano inkubacji w buforach o pH 6,5, 8,0 i 9,0, które w opisanych powyżej eksperymentach wyklarowały się jako optymalne. Tym razem enzym inkubowano przez 2 h w temperaturze 4°C, a test aktywności wykonywano

co 30 min. Pomimo nieznacznych różnic w aktywności właściwej Acmb inkubowanego w różnym pH, nie zaobserwowano istotnego spadku aktywności w przeciągu 2 h eksperymentu (**Rys. 40A**). Wpływ pH oznaczono też stosując technikę *ThermoFAD*, która umożliwia wyznaczenie temperatury topnienia białka poprzez monitorowanie sygnału fluorescencyjnego emitowanego przez uwalniany z centrum aktywnego kofaktor FAD. Uzyskane wyniki wskazały, że temperatura topnienia Acmb, równa 56–57°C, pozostaje niezmienna w zakresie pH 6,0–9,0 (**Rys. 40B**).

W jednej z pierwszych prac dotyczących Acmb, w której podjęto się scharakteryzowania enzymu pod względem biochemicznym i katalitycznym, optimum pH zostało wyznaczone na 6,0 [21]. Jednakże optimum to sprawdzono tylko wobec DCPIP, a wszystkie pozostałe eksperymenty (w tym te z innymi akceptorami elektronowymi) były prowadzone już w ustalonym „optimum” pH. Badania realizowane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wykazały, że optimum pH Acmb mierzone w stanie stacjonarnym jest różne, w zależności od zastosowanego akceptora elektronowego. Waha się ono w zakresie od pH kwaśnego 6,5 po pH zasadowe 9,0, w jakim najlepiej funkcjonuje większość Δ^1 -KSTD. Związki zastosowane jako akceptory elektronowe różnią się od siebie strukturą i właściwościami chemicznymi (m.in. ładunkiem i potencjałem redoks), a w konsekwencji też powinowactwem do centrum aktywnego enzymu (więcej w **Rozdziale 4.4.1**). Ciekawa jest obecność dwóch optimumów pH, które można zaobserwować na **Rys. 38A**, w przypadku użycia mieszaniny dwóch akceptorów elektronowych. Pierwsze maksimum wydaje się być związane z reutlenianiem enzymu przez DCPIP (pH 6,5), a drugie przez PMS (pH 8,0–9,0). Zjawisko to może być związane z oddziaływaniami elektrostatycznymi pomiędzy akceptorem a zredukowanym FAD. Według literatury w pH 6,5 zredukowany flawohydrochinon nie posiada ładunku ($pK_a = 6,7$), natomiast w pH 8,0–9,0 występuje w postaci anionu $FAD_{red}H_2^-$ (**Rys. 41**) [139]. Jednocześnie PMS jest naładowany dodatnio w zakresie pH 0–11, a DCPIP praktycznie nie posiada ładunku w pH 5–8,5 ($pK_{a1} = 3,95$ $pK_{a2} = 9,4$). Dlatego też można podejrzewać, że PMS preferencyjnie wiąże się do centrum aktywnego zredukowanego enzymu i oddziałuje z ujemnie naładowaną formą $FAD_{red}H_2^-$ w pH zasadowym, a DCPIP z formą $FAD_{red}H_3$ pozbawioną ładunku w pH kwaśnym i lekko zasadowym. Natomiast wraz ze zbliżaniem się pH do pK_{a2} DCPIP rośnie ilość ujemnie naładowanej formy, która będzie oddziaływać odpychająco z ujemnie naładowaną formą $FAD_{red}H_2^-$. Warto zaznaczyć, że

niezależnie od odczynu pH ostatecznym akceptorem elektronowym w układzie PMS–DCPIP jest DCPIP, co wynika z wartości potencjału redoks obu związków [140]. Jako że względna aktywność Acmb wobec obu reutleniaczy w pH 6,5 jest zbliżona, można przypuszczać, że w tych warunkach związki konkurują o reutlenienie zredukowanej flawiny. Hipoteza dotycząca istotności oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy reutleniaczem a zredukowaną formą FAD wydaje się być zgodna z wynikami uzyskanymi dla ujemnie naładowanego $K_3[Fe(CN)_6]$, który stanowi bardzo słaby reutleniacz Acmb. Niejasne jest jedynie, dlaczego wyższą aktywność wobec tego związku zaobserwowano przy wyższych wartościach pH. Można jednak postawić hipotezę, że w wyższym pH stabilniejsza jest semichinonowa forma FAD (**Rys. 41**), która stanowi produkt pośredni reutlenia przez jednoelektronowy utleniacz jakim jest $K_3[Fe(CN)_6]$.



Rys. 41. Struktura flawosemichinonu i flawohydrochinonu zależna od pH.

Tak silna zależność optimum pH od zastosowanego akceptora elektronowego, w przypadku reakcji mierzonej w stanie stacjonarnym, może świadczyć o tym, że to etap reutlenia enzymu limituje szybkość reakcji katalizowanej przez Acmb (więcej w **Rozdziale 4.5.3**). Potwierdza to brak wyraźnego optimum pH dla reakcji półwkowej redukcji FAD zmierzonej w stanie przedstacjonarnym. W przypadku tego pomiaru interesujący jest fakt występowania dwóch procesów, różniących się znacząco szybkością oraz optimum pH. Najbardziej prawdopodobna wydaje się teoria, że obecność dwóch procesów związana jest z występowaniem dwóch formy katalizatora – zagregowanej oraz zdeagregowanej (np. monomerycznej). Istnienie tych dwóch form białka w zadanych

warunkach potwierdzają badania struktury czwartorzędowej oparte na filtracji żelowej (**Rozdział 4.2.1**). Ponadto badania punktu izoelektrycznego obu form białka wykazały, że dla formy zdeagregowanej Acmb (monomeru) wynosi on ok. 8,6, podczas gdy pl agregatów Acmb jest znacznie niższy i wynosi ok. 4,7–5,2 [108]. Jeśli wziąć pod uwagę, że 3-ketosteroidowe substraty są związkami pozbawionymi ładunku, można przypuszczać, że wzmocnienie oddziaływań pomiędzy białkiem i substratem następuje w okolicy punktu izoelektrycznego białka, w którym jego sumaryczny ładunek jest również obojętny. Tłumaczyłoby to występowanie optimum pH równego 9,0 dla reakcji dehydrogenacji katalizowanej przez zdeagregowaną, monomeryczną formę Acmb (pl = 8,6) oraz wzrost szybkości reakcji w niższym pH dla Δ^1 -dehydrogenacji katalizowanej przez agregaty (pl = 4,7–5,2). Różnice w szybkości reakcji katalizowanej przez dwie formy katalizatora mogą z kolei wynikać z dysproporcji w zawartości obu form oraz faktu, że zdeagregowane białko jest znacznie bardziej aktywne (zwiększony dostęp do centrum aktywnego). Analiza otrzymanych wyników nie wykazała, żeby pula dwóch wersji katalizatora zmieniała się zależnie od pH, w badanych warunkach (pH 7,5–10,0).

4.4. Charakterystyka katalityczna Δ^1 -KSTD

W ramach charakterystyki katalitycznej Acmb określono obserwowane parametry kinetyczne dla Acmb i sztucznych akceptorów elektronowych, wobec których badano optimum pH (**Rozdział 4.3.2**). Ponadto przeprowadzono testy reaktorowe z wybranymi chinonami i wiologinem benzylovym, celem zidentyfikowania potencjalnego naturalnego akceptora elektronowego.

Aby zweryfikować hipotezę zakładającą, iż zdolność do odwodornienia C17-rozgałęzionych 3-ketosteroidów posiadają tylko nieliczne Δ^1 -KSTD i wyznaczyć natywny substrat Acmb, wykonano pomiary kinetyczne dla Acmb i KSTD1 wobec AD (**8**) i cholest-4-en-3-onu (**2**), w obecności 2% (v/v) HBC.

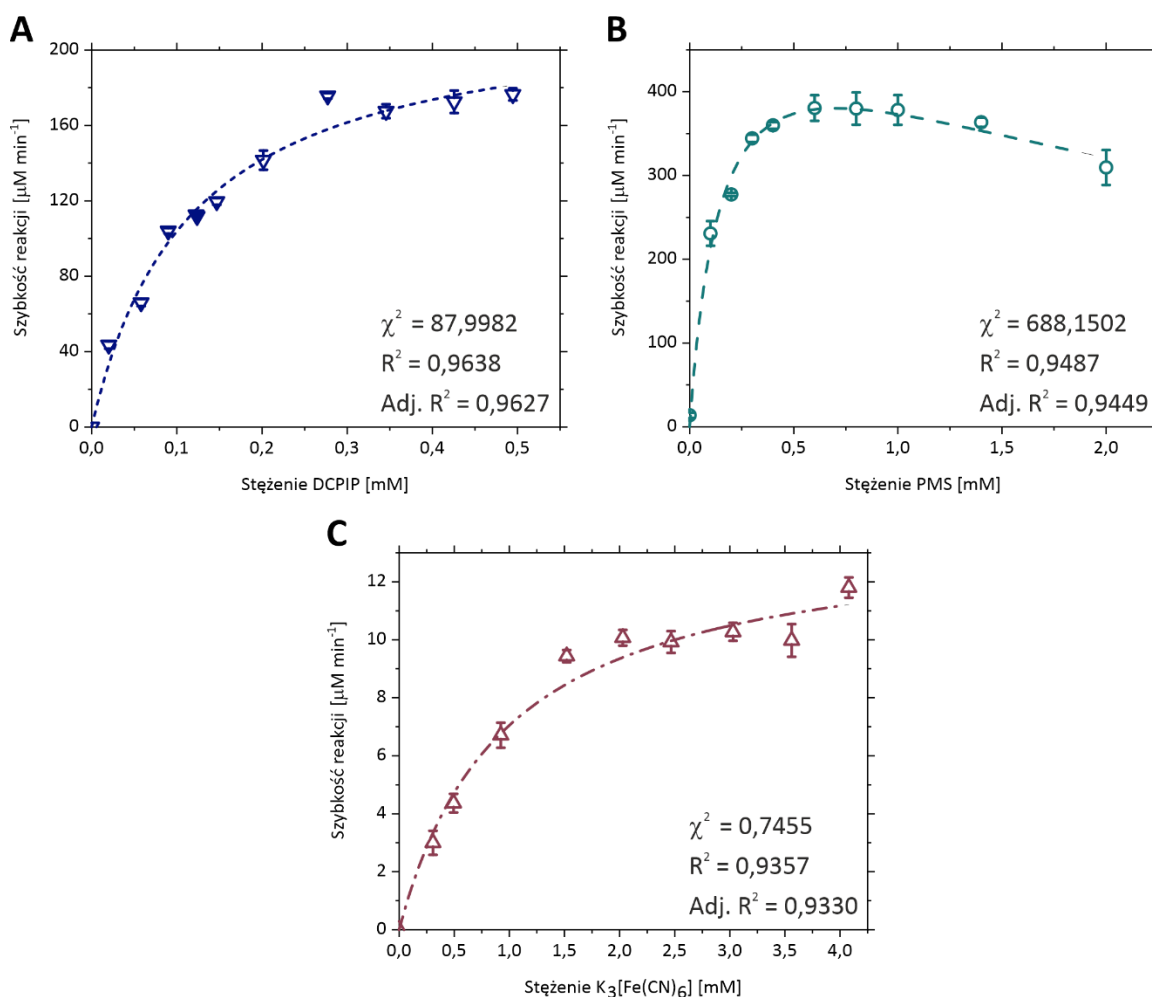
4.4.1. Sztuczne akceptory elektronowe Acmb

Ze względu na wspomnianą fotolabilność PMS [138] i związane z nią trudności w pomiarze kinetyki z wykorzystaniem spektrofotometrii UV-Vis, parametry kinetyczne określono jedynie dla DCPIP, układu PMS–DCPIP i $K_3[Fe(CN)_6]$. Pomiary dla każdego z katalizatorów wykonano w optymalnym pH. Do wyników uzyskanych dla DCPIP (**Rys. 42A**) oraz $K_3[Fe(CN)_6]$ (**Rys. 42C**) dopasowano standardowy model Michaelisa-Menten

(XIX). Co ciekawe, w przypadku mieszaniny PMS–DCPIP (**Rys. 42B**), gdzie zmienną stanowiło stężenie PMS, zaobserwowano spowolnienie działania enzymu przy wysokim stężeniu PMS. Uzyskane dla układu PMS–DCPIP dane dopasowano do wzoru **XLII**, uwzględniającego inhibicję substratową.

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[S]}{K_i}\right)} \quad \text{XLII}$$

Najwyższą liczbę obrotów Acmb, równą $29,8 \pm 2,7 \text{ s}^{-1}$, zaobserwowano dla mieszaniny PMS–DCPIP w pH 9,0, gdzie wartość K_m dla PMS wyniosła $0,15 \pm 0,03 \text{ mM}$. Następnym w kolejności akceptorem był DCPIP, dla którego w pH 6,5 wartość k_{cat} wyniosła $12,2 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$, a K_m $0,12 \pm 0,01 \text{ mM}$. Natomiast dla $K_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ uzyskano najwyższą wartość K_m ($0,96 \pm 0,15 \text{ mM}$) i najniższą k_{cat} ($0,053 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$) (**Tab. 10**). Stała inhibicji (K_i) dla PMS, w układzie PMS–DCPIP, wyniosła $3,2 \pm 0,9 \text{ mM}$.



Rys. 42. Kinetyka zmierzona w stanie stacjonarnym dla reakcji odwodornienia katalizowanej przez Acmb wobec **DCPIP** (A), **PMS–DCPIP** (B) oraz **$K_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$** (C).

Aby sprawdzić czy efektywność katalityczna akceptorów elektronowych wyznaczona przez pomiar kinetyki w stanie stacjonarny przełoży się na warunki reaktorowe, oraz by ocenić możliwości katalityczne PMS, przeprowadzono Δ^1 -dehydrogenację katalizowaną przez Acmb w reaktorach okresowych, mierząc stopień konwersji progesteronu przy użyciu HPLC. Wyniki zostały opisane w **Rozdziale 4.6.1**.

Tab. 10. Parametry kinetyczne sztucznych akceptorów elektronowych.

Parametr	DCPIP (25)	PMS (24) – DCPIP	$K_3[Fe(CN)_6]$ (29)
pH	6,5	9,0	8,0
K_m [mM]	$0,12 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,03$	$0,96 \pm 0,15$
V_{max} [$\mu M \text{ min}^{-1}$]	$223,9 \pm 7,2$	$546,1 \pm 48,8$	$13,9 \pm 0,7$
k_{cat} [s^{-1}]	$12,2 \pm 0,4$	$29,8 \pm 2,7$	$0,053 \pm 0,002$
K_i [mM]	–	$3,2 \pm 0,9$	–
k_{cat}/K_m [$s^{-1} M^{-1}$]	$(1,02 \pm 0,08) \cdot 10^5$	$(1,99 \pm 0,40) \cdot 10^5$	$(0,55 \pm 0,09) \cdot 10^2$

4.4.2. Naturalny akceptor elektronowy Acmb

Wstępne testy mające na celu selekcję akceptorów elektronowych, które mogłyby pełnić rolę naturalnego akceptora elektronowego Acmb, przeprowadzono w warunkach reaktorowych. Dehydrogenację prowadzono w obecności: 2-metylo-1,4-naftochinonu (**28**), 1,4-benzochinonu (**40**), 2,3-dichloro-5,6-dicyjano-1,4-benzochinonu (**41**), 1,2-naftochinonu (**42**), 2-hydroksy-1,4-naftochinonu (**43**) oraz wiologenu benzyłowego (**44**) (**Rys. 17**). Reakcje przeprowadzono w pH 6,5 i 8,0, a jako układ odniesienia zastosowano mieszaninę PMS–DCPIP. Stopień konwersji progesteronu określono przy użyciu HPLC, a wyniki uzyskane po 30 min i 20 h przedstawiono w **Tab. 11**.

Tab. 11. Stopień konwersji progesteronu przez Acmb zależny od zastosowanego akceptora elektronowego i pH. Szacowany maksymalny błąd oznaczenia wynosi 10%.

Akceptor elektronowy	Stopień konwersji [%]			
	30 min		20 h	
	pH 6,5	pH 8,0	pH 6,5	pH 8,0
PMS–DCPIP (24–25)	80,2	93,8	100	100
2-Metylo-1,4-naftochinon (28)	86,6	76,9	100	100
1,4-Benzochinon (40)	92,6	2,2	100	100
2,3-Dichloro-5,6-dicyjano-1,4-benzochinon (41)	13,2	0	95,4	15,0
1,2-Naftochinon (42)	89,4	10,5	100	100
2-Hydroksy-1,4-naftochinon (43)	1,4	0	28,3	4
Wiologen benzyłowy (44)	2,2	1,5	8,6	12,8

Po 30 min trwania reakcji najwyższy stopień konwersji (>86%), uzyskano dla 1,4-benzochinonu, 1,2-naftochinonu oraz 2-metylo-1,4-naftochinonu. Wszystkie wymienione wyżej związki pozwoliły osiągnąć 100% stopień konwersji po 20 h trwania eksperymentu, zarówno w pH kwaśnym, jaki i zasadowym. Znacznie wolniej reakcja postępowała w obecności 2,3-dichloro-5,6-dicyjano-1,4-benzochinonu, 2-hydroksy-1,4-naftochinonu oraz wiologenu benzyłowego. Na podstawie uzyskanych wyników trudno wnioskować jednoznacznie, który ze związków pełni rolę naturalnego akceptora elektronowego Acmb. Jednak fakt, że związki **28**, **40** i **42** wykazały efektywność zbliżoną do układu złożonego z dwóch sztucznych akceptorów elektronowych, wskazuje, że mogłyby spełniać taką funkcję w komórkach *S. denitrificans*. Aby zweryfikować tę tezę należałoby wyznaczyć optimum pH dla wyselekcjonowanych chinonów, a następnie ich parametry kinetyczne w stanie stacjonarnym oraz przedstacjonarnym dla OHR.

Co ciekawe, wyższy stopień konwersji w przypadku wszystkich zastosowanych chinonów zaobserwowano w pH 6,5 a nie 8,0. Potwierdzałyby to teorię wysuniętą w **Rozdziale 4.3.2**, iż związki pozbawione ładunku wiążą się efektywniej w niższym pH z centrum aktywnym zawierającym obojętną formę kofaktora $FAD_{red}H_3$ (**Rys. 41**). Analogicznie jak w przypadku PMS, dla dodatnio naładowanego wiologenu benzyłowego, po 20 h trwania reakcji uzyskano nieco wyższy stopień przereagowania w pH 8,0 niż 6,5, co sugerowałoby jego preferencyjne oddziaływanie z centrum aktywnym zawierającym formę $FAD_{red}H_2^-$.

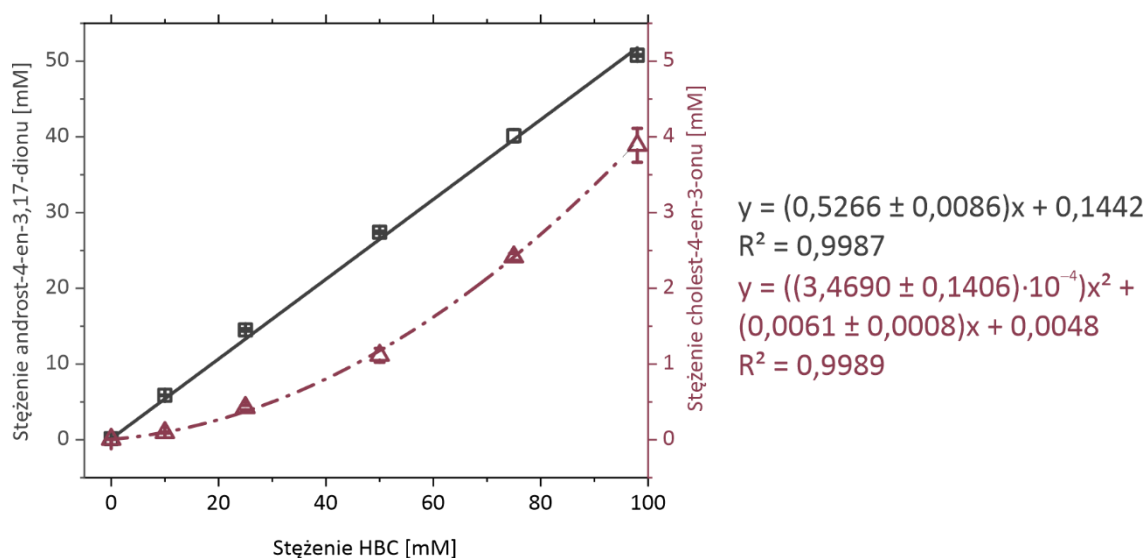
4.4.3. Spektrum substratowe Δ^1 -KSTD

Kompleks inkluzyjny HBC–steroid

Aby poprawnie zinterpretować parametry kinetyczne uzyskane dla Acmb i KSTD1 wobec AD (**8**) i cholest-4-en-3-onu (**2**) należało wyznaczyć stałe tworzenia kompleksów HBC–steroid. Obecność HBC w roztworze powoduje powstanie kompleksów typu gość–gospodarz pomiędzy steroidem a cyklodekstryną, co wpływa na zmianę entalpii swobodnej (ΔG) wiązania substratu z enzymem. Wykresy rozpuszczalności fazowej AD i cholest-4-en-3-onu w roztworze HBC wyznaczono w zakresie stężeń HBC od 0 do 98 mM, w temperaturze 30°C, tj. temperaturze pomiarów katalitycznych (**Rys. 43**). Zgodnie z oczekiwaniami rozpuszczalność obu steroidów rośnie wraz ze wzrostem stężenia HBC,

jednakże rozpuszczalność bardziej hydrofobowego cholest-4-en-3-onu w 98 mM roztworze HBC okazała się być ponad 10-krotnie niższa niż rozpuszczalność AD.

Do wykresu zależności stężenia rozpuszczonego AD od stężenia HBC dopasowano funkcję liniową, odpowiadającą diagramowi fazowemu typu A_L [125]. Liniowy przebieg wykresu rozpuszczalności fazowej o nachyleniu mniejszym niż 1 ($0,527 \pm 0,009$) wskazuje, że HBC z AD tworzy kompleks inkluzyjny w stosunku 1:1. Tymczasem diagram rozpuszczalności cholest-4-en-3-on okazał się być diagramem typu A_P , a do danych dopasowano funkcję kwadratową. Krzywa rozpuszczalności typu A_P może wskazywać na tworzenie kompleksów wyższego rzędu w odniesieniu do cyklodekstryny, przy jej wyższych stężeniach [125,126].



Rys. 43. Diagramy fazowe rozpuszczalności AD oraz **cholest-4-en-3-onu**.

Wartości $K_{1:1}$ i $K_{1:2}$ dla kompleksów odpowiednio $S:(HBC)$ i $S:(HBC)_2$ przedstawiono w **Tab. 12**.

Tab. 12. Parametry rozpuszczalności steroidów w roztworze HBC i 2% (v/v) EGME w 30°C.

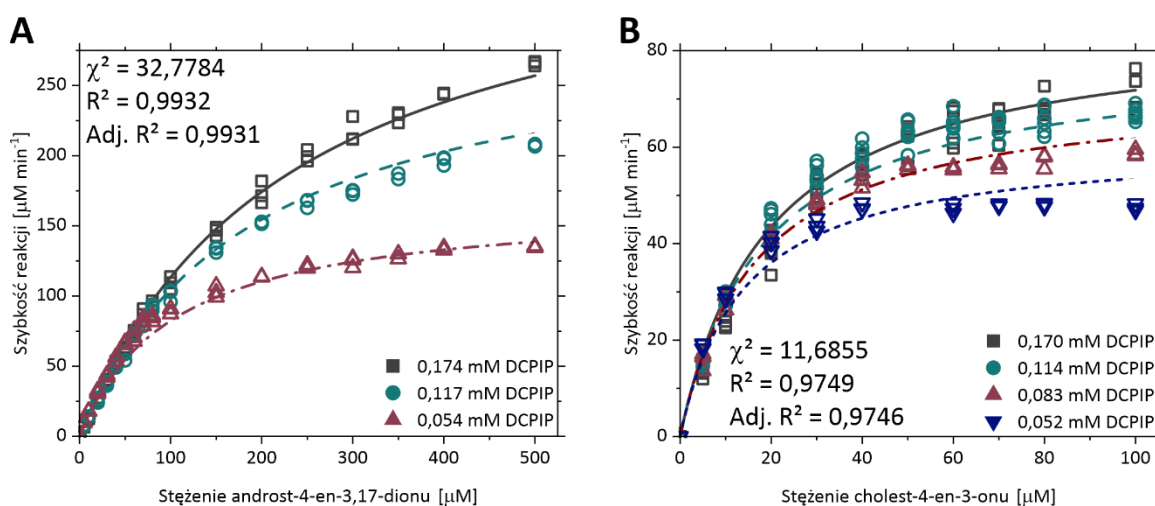
Substrat	Typ krzywej rozpuszczalności	$K_{1:1}$ [M^{-1}]	$K_{1:2}$ [M^{-1}]
AD (8)	A_L	$7714,4 \pm 125,8$	–
Cholest-4-en-3-on (2)	A_P	$1277,1 \pm 170,1$	$56,8 \pm 2,3$

Otrzymane stałe posłużyły do obliczenia procentowych zawartości steroidów w formie wolnej i skompleksowanej, obecnych w medium reakcyjnym. W przypadku androst-4-en-3,17-dionu 99% substratu zostało skompleksowane przez HBC, tworząc kompleks AD:(HBC). Z kolei stosunek wolnego i skompleksowanego (1:1 i 1:2) cholest-4-en-3-onu

zmienia się nieznacznie w zależności od początkowego stężenia steroidu i wynosi średnio: 2,9% formy wolnej, 53,5% steroidu w kompleksie 1:1 i 43,6% steroidu w kompleksie 1:2.

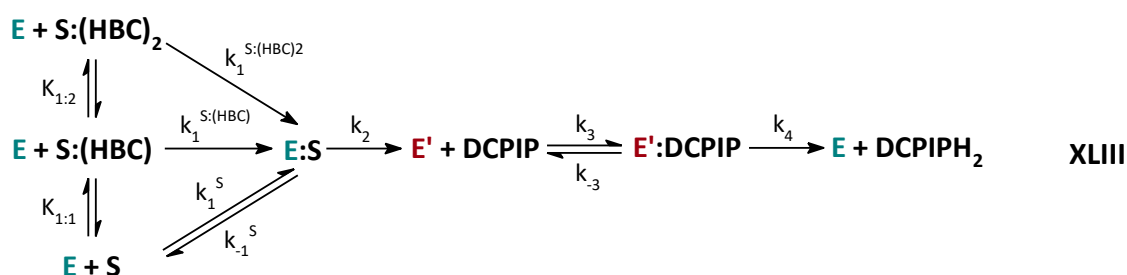
Natywny substrat Acmb

Aby określić specyficzność substratową Acmb, przeprowadzono badania kinetyczne w stanie stacjonarnym dla AD i cholest-4-en-3-onu. Jako sztuczny akceptor elektronowy posłużył DCPIP. Ponieważ rozpuszczalność cholest-4-en-3-onu w roztworach wodnych jest bliska zeru, pomiary przeprowadzono z dodatkiem 2% (w/v) HBC oraz 2% (v/v) EGME. Wykresy zależności szybkości reakcji od stężenia steroidów i DCPIP przedstawiono na **Rys. 44**. Do uzyskanych danych dopasowano mechanizm reakcji dwusubstratowej Ping Pong *bi bi* (XXI) [32].



Rys. 44. Kinetyka zmierzona w stanie stacjonarnym dla reakcji odwodornienia katalizowanej przez Acmb wobec androst-4-en-3,17-dionu (A) oraz cholest-4-en-3-onu (B).

Ze względu na obecność HBC w układzie, substrat jest dostępny dla enzymu głównie w postaci kompleksów 1:1 i/lub 1:2 (AD: 99% S:(HBC), cholest-4-en-3on: 53,5% S:(HBC) i 43,6% S:(HBC)₂). Dlatego też tylko w przypadku AD można założyć, że obserwowana kinetyka jest wynikiem reakcji enzymu z substratem w formie S:(HBC), natomiast w przypadku cholest-4-en-3-one kinetyka tworzenia kompleksu E:S jest znacznie bardziej złożona i przebiega zgodnie ze schematem XLIII.



Chociaż wyprowadzenie równania kinetycznego uwzględniającego wszystkie formy substratu obecne w roztworze jest możliwe, prawidłowe dopasowanie wszystkich stałych wymaga zebrania danych kinetycznych dla różnych stężeń HBC, steroidu i DCPIP. Uzyskane dane eksperymentalne okazały się być niewystarczające aby wyznaczyć parametry tak złożonego równania nieliniowego. Jednakże głównym celem tej części pracy było porównanie wyników uzyskanych dla dwóch różnych Δ^1 -KSTD (**Spektrum substratowe Δ^1 -KSTD**), zmierzonych w tych samych warunkach (a to stężenie HBC determinuje rozkład kompleksów S:(HBC)). W związku z tym krzywe kinetyczne zostały dopasowane do sumarycznego stężenia substratu.

W zadanych warunkach maksymalna prędkość reakcji katalizowanej przez Acmb (V_{max}) była ponad 8-krotnie wyższa w przypadku AD niż cholest-4-en-3-onu. Jednak powinowactwo Acmb (K_{ms}) do cholest-4-en-3-one okazało się być ponad 20-krotnie wyższe niż powinowactwo do AD. W rezultacie wydajność katalityczna enzymu (k_{cat}/K_{ms}) wobec cholest-4-en-3-onu była ponad dwukrotnie wyższa niż wyznaczona wobec AD (**Tab. 13**).

Tab. 13. Parametry kinetyczne Acmb.

Substrat	K_{ms} [μM]	K_{mDCPIP} [μM]	V_{max} [$\mu\text{M min}^{-1}$]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_{ms} [$M^{-1} s^{-1}$]
AD (8)	$529,2 \pm 32,5$	$223,5 \pm 16,9$	$859,2 \pm 45,5$	$46,1 \pm 2,3$	$(0,87 \pm 0,05) \cdot 10^5$
Cholest-4-en-3-on (2)	$23,7 \pm 1,16$	$37,3 \pm 3,3$	$104,6 \pm 2,7$	$5,8 \pm 0,2$	$(2,45 \pm 0,01) \cdot 10^5$

Należy zaznaczyć, że DCPIP również jest kompleksowany przez HBC. Fakt ten nie ma jednak wpływu na porównywane wartości K_{ms} , ponieważ eksperymenty dla obu substratów przeprowadzono przy niemalże identycznym stężeniu akceptora elektronowego. Chociaż wartość K_{mDCPIP} jest zależna od stężenia HBC to wpływa tak samo na obserwowaną szybkość reakcji dla obu enzymów (**Spektrum substratowe Δ^1 -KSTD**) czy substratów (**XXI**). Z kolei stężenie HBC było od 30 do 84 razy wyższe niż stężenie DCPIP i wpływ kompleksowania DCPIP (m.in. przez obniżenie stężenia HBC) na uzyskane parametry kinetyczne względem substratów steroidowych był znikomy.

Choć dodatek substancji solubilizującej znacząco komplikuje kinetykę tworzenia kompleksu E:S, wydaje się on być niezbędny do prawidłowego oznaczenia specyficzności

substratowej Δ^1 -KSTD, zwłaszcza gdy powinowactwo enzymu do związków podstawionych łańcuchem alifatycznym w pozycji C17 jest wysokie, jak w przypadku Acmb. Ustalone w niniejszej pracy powinowactwo Acmb do AD ($K_{ms} = 529,2 \pm 32,5 \mu\text{M}$) jest tak naprawdę powinowactwem do kompleksu S:(HBC), gdyż wcześniejsze badania kinetyczne wykazały, że wartość K_m dla AD bez dodatku HBC jest o rząd mniejsza ($K_m = 59,6 \pm 3,0 \mu\text{M}$ przy $200 \mu\text{M}$ DCPIP i 30°C) [141]. Jednakże stała Michaelisa określona dla cholest-4-en-3-onu ($K_{ms} = 23,7 \pm 1,16 \mu\text{M}$) jest niższa nawet od tej obserwowanej dla AD bez dodatku solubilizatora. Ponadto, ponieważ 97% cholest-4-en-3-onu zostało skompleksowane przez HBC, można założyć, że rzeczywista wartość K_m dla cholest-4-en-3-one (niemierzalna bez dodatku HBC) byłaby jeszcze mniejsza.

Parametry kinetyczne wyznaczone dla AD i cholest-4-en-3-onu są istotne dla zrozumienia fizjologicznej roli Acmb. Jak wspomniano w **Rozdziale 1.1.1** początkowe badania beztlenowego szlaku rozkładu cholesterolu przez *S. denitrificans* wykazały obecność nowych, Δ^1 -odwodornionych bakteryjnych metabolitów (cholest-1,4-dien-3-onu oraz 25-hydroksycholest-1,4-dien-3-onu) i tym samym zasugerowały, że podwójne wiązanie między atomami C1 i C2 może być wprowadzane na wczesnym etapie mineralizacji cholesterolu. W rezultacie cholest-4-en-3-on uznano za natywny substrat Acmb [9,10]. Późniejsze badania kinetyczne wykazały wyższe powinowactwo Acmb do steroidów zbudowanych z 19–21 atomów węgla niż do większych, rozgałęzionych, jak cholest-4-en-3-on [21]. Co więcej, wykazano, że enzym ten zlokalizowany jest po cytoplazmatycznej stronie wewnętrznej błony bakteryjnej *S. denitrificans* (gdzie cholest-4-en-3-on nie występuje) [8]. Stąd też naukowcy wywnioskowali, że natywnym substratem Acmb jest raczej AD [8]. Jednak badanie mające na celu określenie lokalizacji Acmb przeprowadzono badając aktywność enzymatyczną poszczególnych frakcjach błonowych, a nie np. techniką przeciwciał, a aktywność właściwą Acmb obliczono dla całkowitego stężenia białka wyekstrahowanego z błony. Co ważne, aktywność Acmb we frakcji obwodowo-peryplazmatycznej nadal była znacząca [8].

W niniejszej pracy wykazano, że badanie specyficzności substratowej i powinowactwa enzym–substrat w przypadku hydrofobowych steroidów bez dodatku środka solubilizującego może prowadzić do błędnej interpretacji uzyskanych wyników (więcej w **Spektrum substratowe Δ^1 -KSTD**). W obecności HBC powinowactwo Acmb do cholest-4-en-3-one okazało się istotnie wyższe niż do AD (nawet biorąc pod uwagę

wszystkie komplikacje związane z kompleksowaniem substratów przez cyklodekstrynę), tym samym cholest-4-en-3-on mógłby stanowić substrat natywny Acmb. Jednoznaczne potwierdzenie tej hipotezy zdecydowanie wymaga jednak dalszych badań, w szczególności przeprowadzenia testów kinetycznych enzymu również w funkcji HBC, co pozwoliłoby wyznaczyć stężenia wszystkich stałych wiązania poszczególnych form kompleksów HBC:steroid metodą numeryczną.

Spektrum substratowe Δ^1 -KSTD

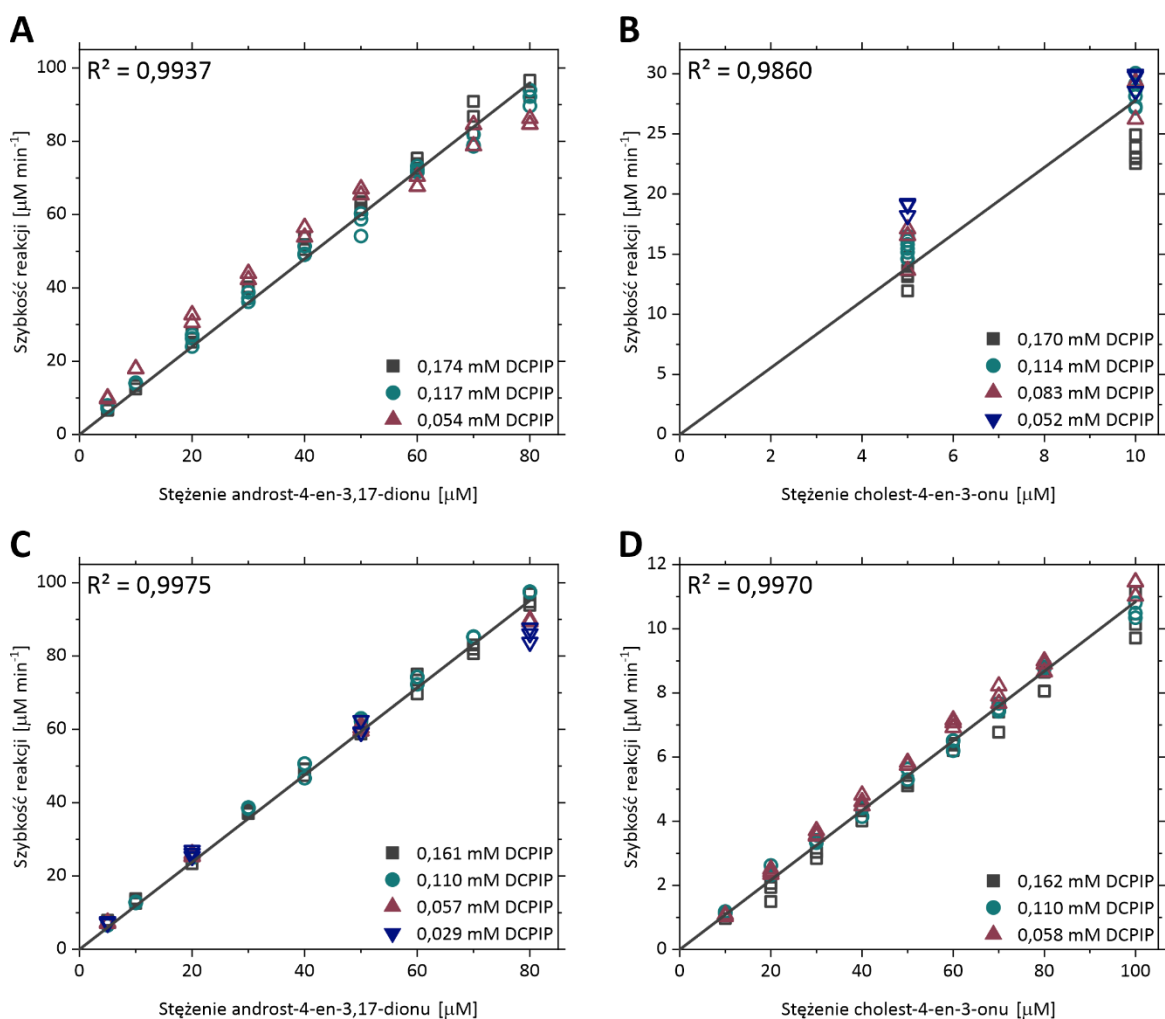
Weryfikacji hipotezy zakładającej, iż zdolność do odwodornienia C17-rozgałęzionych 3-ketosteroidów posiadają tylko nieliczne Δ^1 -KSTD dokonano wyznaczając parametry kinetyczne w stanie stacjonarnym dla KSTD1 i dwóch wspomnianych powyżej steroidów. Pomiar kinetyczny dla KSTD1 przeprowadzono w takich samych warunkach jak dla Acmb, z wyjątkiem pH roztworu buforowego, gdyż optimum pH KSTD1 w obecności DCPIP wynosi 8,0 [24]. Co zaskakujące powinowactwo KSTD1 do AD i cholest-4-en-3-onu okazało się znacznie niższe niż wykazane przez Acmb, a osiągnięcie warunków wysycenia enzymu substratem w obecności HBC nie było możliwe. Rozpuszczalność steroidów jest ograniczona nawet w przypadku dodatku czynników solubilizujących. Z drugiej strony zwiększenie stężenia HBC powoduje przesunięcie obserwowanego K_m w kierunku wyższych wartości w wyniku sekwestracji substratu (tj. zmniejszenia stężenia wolnego substratu i stabilizacji substratu w postaci kompleksów S:(HBC)_n). Niemniej jednak, jako że dla niskich stężeń pierwszego substratu ($S \ll K_m$) równanie szybkości reakcji staje się niezależne od stężenia drugiego substratu (DCPIP) i upraszcza się do równania liniowego pierwszego rzędu (XLIV), dla KSTD1 i Acmb zdecydowano się oszacować stosunek V_{max}/K_m . Funkcję liniową dopasowano do prędkości reakcji wyznaczonych dla stężeń substratu z zakresu 5–100 μM (Rys. 45).

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m} \quad \text{XLIV}$$

Tab. 14. Parametry kinetyczne Acmb i KSTD1.

Substrat	Acmb	KSTD1
	k_{cat}/K_m [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]	k_{cat}/K_m [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]
AD (8)	$(4,00 \pm 0,04) \cdot 10^6$	$(5,17 \pm 0,03) \cdot 10^6$
Cholest-4-en-3-on (2)	$(9,25 \pm 0,17) \cdot 10^6$	$(4,71 \pm 0,03) \cdot 10^5$

Wydajność katalityczna k_{cat}/K_m Acmb i KSTD1 określona wobec AD była tego samego rzędu, jednak KSTD1 okazała się nieco (o 22%) lepszym katalizatorem Δ^1 -odwodornienia AD niż Acmb. W przypadku reakcji z cholest-4-en-3-onem wartość k_{cat}/K_m zmierzona dla Acmb była prawie 20-krotnie wyższa niż wyznaczona dla KSTD1. KSTD1 była natomiast 10-krotnie lepszym katalizatorem Δ^1 -dehydrogenacji AD niż cholest-4-en-3-onu (Tab. 14).

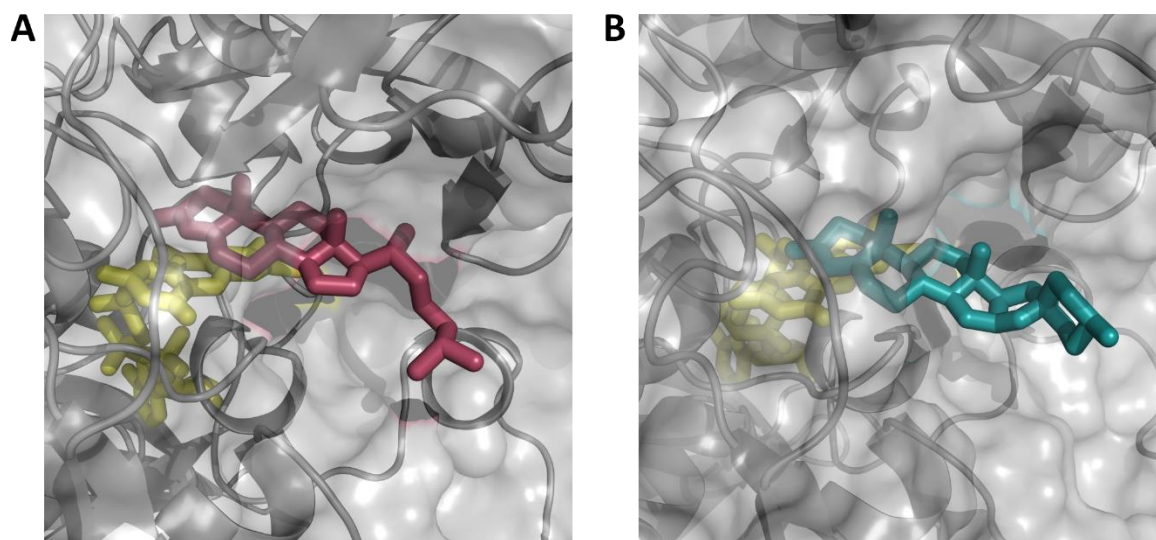


Rys. 45. Kinetyka zmierzona w stanie stacjonarnym dla reakcji odwodornienia katalizowanej przez Acmb wobec androst-4-en-3,17-dionu (A) i cholest-4-en-3-onu (B) oraz katalizowanej przez KSTD1 wobec androst-4-en-3,17-dionu (C) i cholest-4-en-3-onu (D).

Uzyskane wyniki potwierdziły niezaprzeczalnie zdolność KSTD1 do katalizowania Δ^1 -odwodornienia steroidów z łańcuchem alifatycznym w pozycji C17. Ze względu na niską biodostępność cholest-4-en-3-onu i mniejsze powinowactwo KSTD1 do tego steroidu (w porównaniu np. do Acmb), określenie rzeczywistego spektrum substratowego tego enzymu nie było możliwe bez dodatku solubilizatora [45]. Wykazano także, że KSTD1 jest

w stanie katalizować reakcję z 6-pięścieniowymi steroidami. Testy w minireaktorze w obecności 2% HBC dowiodły, że 100 μ M diosgenonu (**38**) może zostać przekształcone przez KSTD1 z doskonałą konwersją $97,3 \pm 0,8\%$ w czasie 20 min.

Opisane powyżej badania katalityczne stanowiły potwierdzenie teoretycznych symulacji przeprowadzonych metodą dynamiki molekularnej (MD) przez mgr inż. Michała Glanowskiego, które wykazały, że ani izooktylowy łańcuch boczny cholest-4-en-3-onu, ani policykliczny podstawnik diosgenonu nie stanowią zawady sterycznej dla wiązania substratów w centrum aktywnym KSTD1 (**Rys. 46**). Jedynie pierścień steranu jest rozpoznawany przez miejsce aktywne Δ^1 -KSTD, a dodatkowe podstawniki lub pierścienie wystają poza enzym, do rozpuszczalnika [142].



Rys. 46. Ramka z symulacji metodą MD dla KSTD1 z **cholest-4-en-3-onem** (A) i **diosgenonem** (B) w miejscu aktywnym. Analiza została przeprowadzona przez mgr inż. Michała Glanowskiego.

Ponadto wyniki te są zgodne z doniesieniami Wang *et al.*, którzy wykazali, że Δ^1 -KSTD wyizolowana ze szczepu *R. erythropolis* WY 1406 również może konwertować substraty z większymi podstawnikami w pozycji C17, takie jak 21-acetoksypregna-4,9(11),16-trien-3,20-dion (**19**) [43]. Jak wspomniano w **Rozdziale 1.1.4**, poza Acmb pojawiły się doniesienia literaturowe dotyczące aktywności kilku innych Δ^1 -KSTD wobec steroidów z bardziej złożonym łańcuchem bocznym w pozycji C17 [21,35,43,44,50,51]. Na przykład Zhang *et al.* opisali pięć izoenzymów Δ^1 -KSTD z *Gordonia neofelifaecis*, z których cztery wykazywały aktywność wobec cholest-4-en-3-onu. Co ważne, autorzy przeprowadzili eksperymenty z zastosowaniem 0,05% Tween 80 jako środka solubilizującego [51].

Słaba rozpuszczalność steroidów z alifatycznymi lub policyklicznymi podstawnikami przy atomie C17 powoduje ich niską biodostępność, co w połączeniu z niskim powinowactwem większości Δ^1 -KSTD do bardziej złożonych steroidów, może prowadzić do błędnych wniosków dotyczących specyficzności substratowej tych enzymów (tj. do nieprawidłowego stwierdzenia braku aktywności enzymatycznej). Wyniki uzyskane dla Acmb, KSTD1, a także Δ^1 -KSTD z *G. neofelifaecis* [51] wskazują, że zastosowanie cyklodekstryn lub detergentów może wpływać na analizę specyficzności substratowej enzymów. W przypadku cyklodekstryn taka analiza wymaga jednak wyznaczenia stałych stabilności CD–steroid, co pomaga w określeniu rzeczywistego stężenia substratu, ale z kolei komplikuje obserwowaną kinetykę ze względu na różnice w ΔG tworzenia kompleksu E:S przez enzym z różnymi formami substratu – S, S:(HBC) lub S:(HBC)₂. Ponadto należy podkreślić, że istnieje kilka różnych metod wyznaczania tych stałych (HPLC, NMR, spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera, dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego, kalorymetria itp.) i zazwyczaj generują one odmienne wyniki [143,144].

Niemniej jednak powinowactwo i efektywność katalityczna KSTD1 wobec cholest-4-en-3-onu okazały się znacząco niższe niż wyznaczone dla Acmb. Różnica w powinowactwie Δ^1 -KSTD do C17-podstawionych steroidów może być wynikiem różnic strukturalnych białek. Model homologiczny Δ^1 -KSTD z *Arthrobacter simplex* (aktywnej wobec cholest-4-en-3-onu) wykazał obecność „dodatkowej pętli” w pobliżu centrum aktywnego enzymu, nieobecnej w strukturze krystalicznej KSTD1 [24,77]. Co ciekawe tę samą cechę zauważono w modelu homologicznym Acmb (**Rys. 35A**) [108]. W przypadku Acmb „pętla” okazała się być domeną odpowiedzialną najprawdopodobniej za zakotwiczenie białka w błonie (**Rys. 36A**) oraz potencjalnie oddziaływującą z izooktylowym podstawnikiem C17-rozbudowanych steroidów, przez to zwiększającą powinowactwo enzymu do takich substratów. Być może podobną funkcję pełni u Δ^1 -KSTD z *A. simplex*. Dodatkowo bardziej hydrofobowy charakter powierzchni Acmb w porównaniu z KSTD1 również może powodować zwiększenie powinowactwa do bardziej hydrofobowych substratów (**Rozdział 4.2.2**).

4.5. Mechanizm reakcji katalizowanej przez Δ^1 -KSTD

Celem zweryfikowania postulowanej w literaturze hipotezy dotyczącej mechanizmu reakcji katalizowanej przez Δ^1 -KSTD, bazując na wynikach opisanych w **Rozdziale 4.2.2**, przeprowadzono ukierunkowaną mutagenezę aminokwasów znajdujących się w centrum aktywnym Acmb, w bliskim otoczeniu pierścienia A substratu. Ponadto przeprowadzono kompleksowe badania kinetyczne, które pozwoliły wyjaśnić zależność aktywności enzymu od typu wprowadzonej mutacji, struktury substratów, wpływ podstawienia izotopowego, pH czy lepkości medium reakcyjnego.

4.5.1. Rola aminokwasów w centrum aktywnym Acmb

Jak opisano w **Rozdziale 1.1.3**, w przypadku KSTD1 aminokwasami kluczowymi z punktu widzenia katalizowanej przez enzym reakcji okazały się być tyrozyny Y119, Y318, Y487 oraz glicyna G491 [24]. Bazując na analizie sekwencji aminokwasowej Δ^1 -KSTD pochodzących z różnych bakterii określono, że te cztery aminokwasy są ściśle zakonserwowane w centrum aktywnym enzymów tej klasy [24]. U Acmb odpowiadają one odpowiednio aminokwasom Y118, Y363, Y536 oraz G540, które zostały poddane ukierunkowanej mutagenecie i zamienione na fenyloalaniny w przypadku tyrozyn lub prolinę w przypadku glicyny. Ponadto mutagenecie poddano dwie dodatkowe tyrozyny znajdujące w bliskim otoczeniu substratu (Y115 oraz Y467), również zamieniając je na fenyloalaniny. Y115 i Y467 nie są resztami zakonserwowanymi w sekwencji aminokwasowej Δ^1 -KSTD, a w przypadku KSTD1 w ich miejscu znajdują się właśnie fenyloalaniny (na podstawie analizy bioinformatycznej przeprowadzonej przez mgr. inż. Michała Glanowskiego). Wszystkie warianty Acmb zostały wyekspresjonowane i oczyszczone w trzech powtórzeniach, zgodnie z protokołem opisanym dla białka typu dzikiego, jednak nie stosowano dodatku FAD, celem sprawdzenia czy mutacje wpływają na wiązanie kofaktora.

Aktywność właściwą mutein zmierzoną w stanie stacjonarnym porównano do aktywności białka typu dzikiego (**Tab. 15**). Aktywność mutantów Y118F, Y363F oraz G540P okazała się być niemierzalna w teście spektrofotometrycznym. W kolejnym kroku sprawdzono czy aktywność wspomnianych mutantów oraz Y536F (który wykazał znikomą aktywność na poziomie 0,6% aktywności WT w teście spektrofotometrycznym) zostanie zaobserwowana po 30 min trwania reakcji, których wynik przeanalizowano

z wykorzystaniem techniki HPLC. Jedynie w przypadku muteiny Y363F nie potwierdzono resztkowej aktywności. Również zmutowanie tyrozyn Y115 oraz Y467 nie pozostało bez wpływu na aktywność enzymu. Uległa ona obniżeniu odpowiednio o prawie 70% i ponad 40%. Jako że żaden z poddanych mutacji aminokwasów nie oddziałuje z FAD (**Rozdział 4.2.2**), nie zaobserwowano, aby którakolwiek z wprowadzonych mutacji wpłynęła w istotny statystycznie negatywny sposób na proces wiązania kofaktora w centrum aktywnym białka.

Tab. 15. Aktywność właściwa oraz procentowa zawartość FAD Acmb typu dzikiego oraz jej mutantów.

Mutant	Aktywność właściwa [$\mu\text{M min}^{-1}$]	Aktywność właściwa [%]	Potwierdzenie aktywności HPLC	Zawartość FAD [%]
WT	$30,25 \pm 1,89$	100	–	$31,4 \pm 1,7$
Y115F	$9,58 \pm 0,55$	31,7	–	$27,6 \pm 4,8$
Y118F	NM ^a	–	aktywny	$27,9 \pm 2,2$
Y363F	NM	–	nieaktywny	$36,6 \pm 2,8$
Y467F	$17,55 \pm 0,46$	58	–	$29,9 \pm 1,2$
Y536F	$0,17 \pm 0,06$	0,6	aktywny	$31,2 \pm 3,4$
G540P	NM	–	aktywny	NM

^aNM, niemierzalne

Otrzymane dla mutantów Acmb wyniki są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Rohman *et al.* dla KSTD1 [24]. Potwierdzają one jednoznacznie, że znajdująca się w odległości 2,6 Å od atomu węgla C2 substratu Y363 pełni kluczową dla procesu katalicznego rolę zasady odrywającej proton 2H β od atomu C2 (brak aktywności Y363F). Aminokwas Y118, którego zmutowanie obniżyło aktywność dehydrogenazy niemalże do zera, najprawdopodobniej stabilizuje zdeprotonowaną Y363 przez wiązania wodorowe, jednocześnie moderując jej zasadowy charakter. Ponadto w strukturze krystalicznej Acmb Y118 tworzy wiązanie wodorowe ze strukturalną cząsteczką wody, która z kolei wiąże się wodorowo z Y115 w ramach tzw. systemu transferu protonu. Tak więc mutacja Y118F utrudnia kontakt Y363 z systemem transportującym protony do roztworu. Z kolei mutacja Y536F, która również czyni enzym praktycznie nieaktywnym, znajduje się w odległości wiązania wodorowego od tlenu karbonylowego przy węglu C3 i poza rolę w wiązaniu substratu, może stabilizować też tautomeryzację keto-enolową produktu przejściowego wraz z G540. Niestety, w przypadku mutacji glicyny określenie procentowego spadku

aktywności zmutowanego białka okazało się niemożliwe, przede wszystkim ze względu na zmiany strukturalne będące wynikiem wprowadzenia w jej miejsce proliny. Uniemożliwiły one uzyskanie klarownego roztworu białka i oszacowanie procentowego obsadzenia enzymu przez FAD. Niemniej jednak w teście HPLC potwierdzono szczątkową aktywność muteiny. Co ciekawe, wyniki wskazują, że oddalone od pierścienia A steroidu tyrozyny Y115 oraz Y467 również biorą udział w reakcji. Ich bliskie sąsiedztwo z wejściem do centrum aktywnego Acmb sugeruje, że wraz z Y118 mogą uczestniczyć w szlaku przekazania protonu do środowiska. Taką ich rolę sugeruje również osłonięcie centrum aktywnego Acmb od rozpuszczalnika (**Rys. 31**). W przypadku KSTD1, u której w tych pozycjach znajdują się aminokwasy odpowiednio F136 i F438, rozpuszczalnik ma bezpośredni dostęp do miejsca aktywnego.

4.5.2. Kolejność wiązania reagentów

Eksperyment kinetyczny przeprowadzony dla Acmb i androst-4-en-3,17-dionu, który został opisany w **Rozdziale 4.4.3** potwierdził, że Δ^1 -odwodornienie katalizowane przez Δ^1 -KSTD przebiega zgodnie z mechanizmem Ping Pong *bi bi*, co wcześniej zostało też zaobserwowane dla reakcji transhydrogenacji przez Itagaki *et al.* [32]. Otrzymane dane kinetyczne dla różnych stężeń DCPIP dopasowano do trzech typów mechanizmów reakcji dwusubstratowych, tj. niesekwencyjnego Ping Pong *bi bi*, sekwencyjnego przypadkowego *bi bi* oraz sekwencyjnego uporządkowanego *bi bi*. Dopasowanie oceniano poprzez porównanie otrzymanych parametrów kinetycznych i statystycznych. Choć parametry statystyczne przeprowadzonej analizy wskazywałyby na mechanizm sekwencyjny przypadkowy *bi bi*, uzyskane dla obu substratów stałe Michaelisa mają wartości ujemne (**Tab. 16**). Mechanizmem o najlepszych parametrach statystycznych, a jednocześnie realnych parametrach kinetycznych jest mechanizm Ping Pong *bi bi*, zgodnie z którym steroidowy substrat wiąże się z centrum aktywnym enzymu, gdzie ulega utlenieniu, a następnie odwodorniony produkt zostaje uwolniony (RHR), kolejno zredukowany enzym wiąże się z akceptorem elektronowym, który utlenia FAD_{red} , a zredukowany akceptor opuszcza centrum aktywne (OHR). W przedstawionym w poprzednim rozdziale eksperymencie wprowadzono dodatkową zmienną w postaci HBC, która jednak nie wpływa na kolejność wiązania substratów i uwalniania produktów. Co więcej, analogiczne

wyniki otrzymano dla układu niezawierającego solubilizatora, gdzie katalizatorem reakcji była KSTD1 [145].

Tab. 16. Parametry kinetyczne oraz statystyczne modeli reakcji enzymatycznej dwusubstratowej dopasowanych do danych kinetycznych zmierzonych dla AcMB i AD, w obecności 2% (w/v) HBC.

Parametr	Mechanizm niesekwencyjny Ping Pong <i>bi bi</i>	Mechanizm sekwencyjny przypadkowy <i>bi bi</i>	Mechanizm sekwencyjny uporządkowany <i>bi bi</i>
K_S [μM]	$529,2 \pm 32,5$	$-53,2 \pm 3,0$	$3623,0 \pm 3859,5$
K_{DCPIP} [μM]	$223,5 \pm 16,9$	$-22,6 \pm 1,2$	$6,8 \pm 7,4$
V_{max} [$\mu\text{M min}^{-1}$]	$859,2 \pm 45,5$	$1745,8 \pm 187,4$	$318,6 \pm 17,0$
χ^2	32,8	15,4	285,7
R^2	0,9932	0,9968	0,9405
AICc	546,1	430,6	881,8

4.5.3. Etap limitujący szybkość reakcji dehydrogenacji

Początkowo wartości KIE zostały wyznaczone poprzez bezpośrednie porównanie szybkości reakcji w stanie stacjonarnym dla C1 deuterowanego 1,16,16,17- d_4 -DHT (**32**, **Rys. 14**), C2 deuterowanego 2,2,4,6,6- d_5 -17MT (**34**) i ich nieznakowanych odpowiedników (**31**, **33**). Reakcje dla obu enzymów przeprowadzono w obecności 200 μM DCPIP, przy 200 μM (KSTD1 i AcMB w pH 8,5) lub 100 μM (AcMB w pH 6,5) stężeniu steroidów, zgodnie z metodyką stosowaną we wczesnych badaniach nad mechanizmem działania Δ^1 -KSTD [31]. Wyniki uzyskane tą metodą zarówno dla AcMB, jaki i KSTD1 były zbliżone do tych uzyskanych przed laty [31] i nie przekraczały wartości 1,5 (**Tab. 17**). Jak wspomniano w **Rozdziale 1.3.3**, KIE tego rzędu można określić jako stosunkowo niski w przypadku wymiany wodoru na deuter i tym samym dwukrotnego zwiększenia masy odrywanego atomu. Dla KSTD1 KIE okazał się być nieco wyższy dla etapu oderwania jonu wodorkowego 1α niż protonu 2β , analogiczny wynik uzyskano dla AcMB w pH 8,5. Natomiast w pH 6,5 tendencja była odwrotna. Bez względu na pH roztworu, w którym mierzono szybkości reakcji, w przypadku AcMB KIE był niższy niż uzyskany dla KSTD1.

Opisana w **Rozdziale 4.3.2** silna zależność optimum pH zmierzonego w stanie stacjonarnym od zastosowanego akceptora elektronowego, może świadczyć, że to etap reutlenia enzymu w znaczącym stopniu limituje szybkość reakcji katalizowanej przez Δ^1 -KSTD. W związku z powyższym pomiary KIE dokonano też z zastosowaniem techniki zatrzymanego przepływu, metodą bezpośrednią w stanie przedstacjonarnym dla KSTD1

(**Tab. 17**). W przypadku Acmb pomiar był niemożliwy, gdyż szybkość reakcji dla stosowanych substratów przekraczała możliwości pomiarowe aparatury.

Tab. 17. Wartości KIE zmierzonego metodą bezpośrednią w stanie przedstacjonarnym i/lub stacjonarnym oraz metodą wewnętrznej konkurencji dla Acmb i KSTD1. Substrat deuterowany w pozycji C1 – 1,16,16,17-d₄-DHT, w pozycji C2 – 2,2,4,6,6-d₅-17MT.

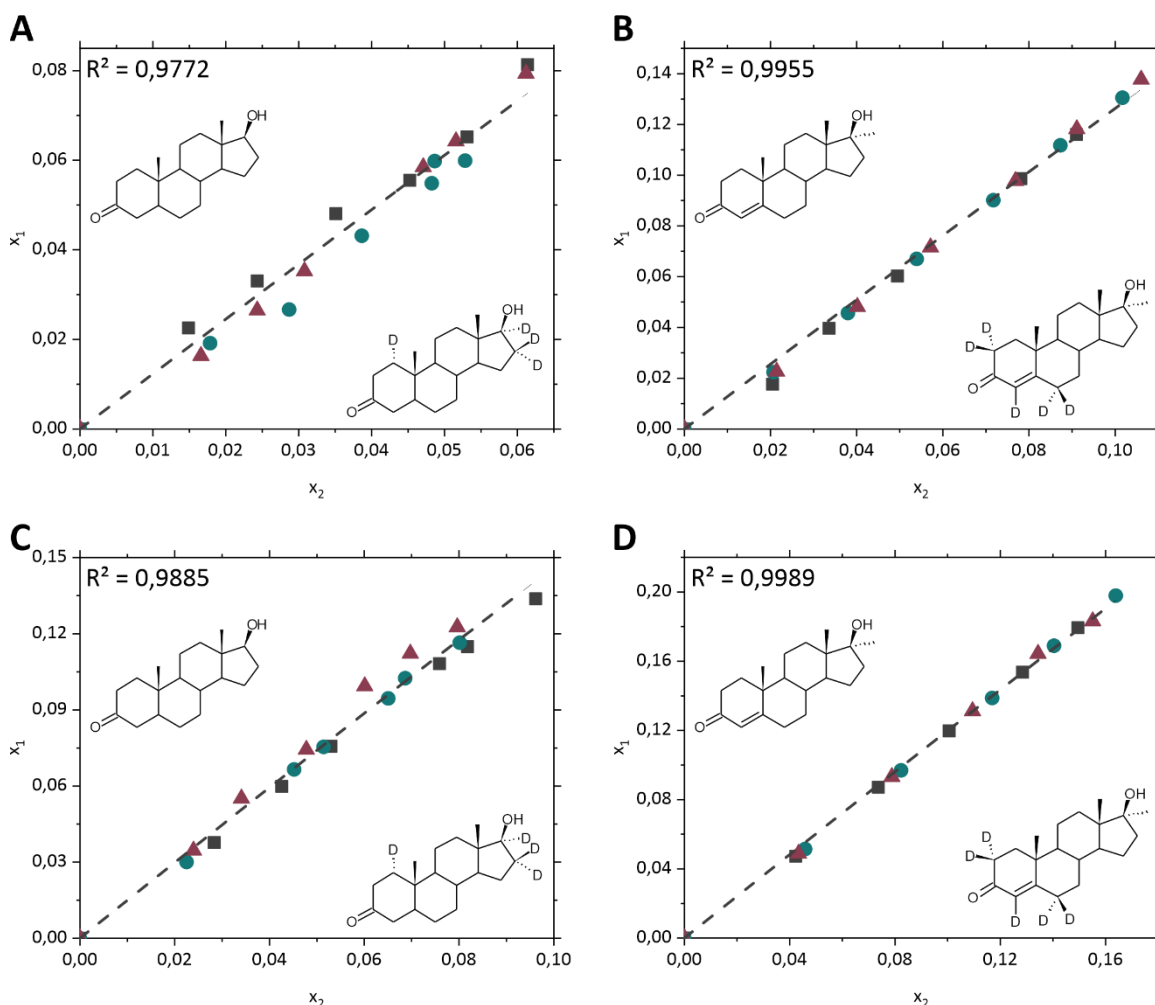
Deuterowany atom	pH	Pomiar bezpośredni w stanie przedstacjonarnym	Pomiar bezpośredni w stanie stacjonarnym	Konkurencyjny KIE ^D (V/K _m)
Acmb				
C1	6,5	NM ^a	1,05 ± 0,04	1,50 ± 0,02
	8,5		1,33 ± 0,08	1,21 ± 0,01
C2	6,5	NM	1,17 ± 0,02	1,23 ± 0,02
	8,5		1,06 ± 0,03	1,28 ± 0,01
KSTD1				
C1	8,0	3,46 ± 0,04	1,49 ± 0,04	2,39 ± 0,07
C2	8,0	1,51 ± 0,04	1,28 ± 0,02	2,21 ± 0,02

^aNM, niemierzalne

Pomiaru obserwowanej szybkości zaniku utlenionej flawiny (λ) dokonano dla DHT (**31**) i 1,16,16,17-d₄-DHT (**32**) w stężeniu 100 μ M oraz dla 17MT (**33**) i 2,2,4,6,6-d₅-17MT (**34**) w stężeniu 250 μ M. KIE wyznaczony w stanie przedstacjonarnym dla 17MT nie odbiegał znacząco od wyznaczonego w stanie stacjonarnym i wyniósł 1,51 ± 0,04. Wzrost wartości KIE z 1,49 ± 0,04 do 3,46 ± 0,04 zaobserwowano natomiast dla DHT.

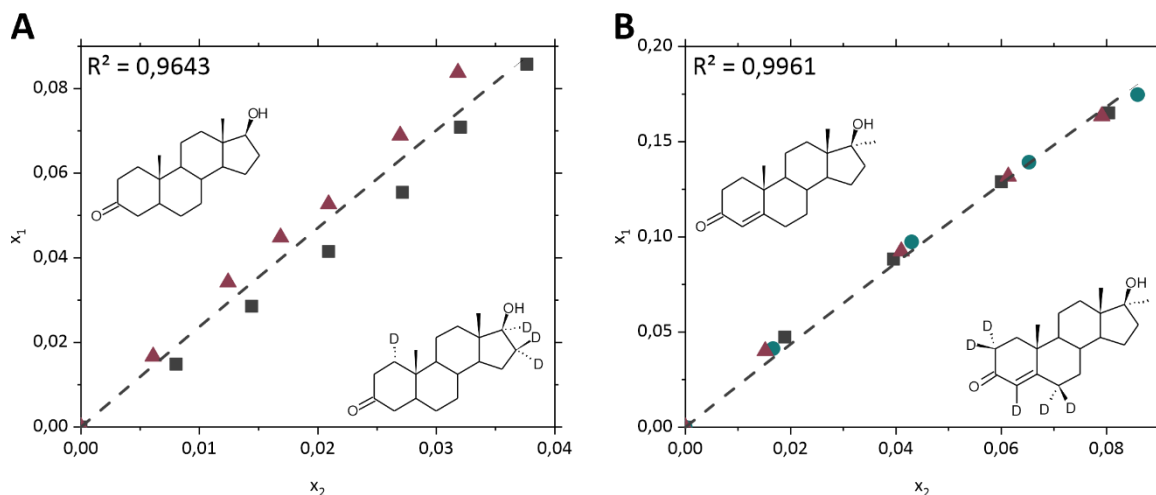
Aby uzyskać informację na temat wpływu wiązania się znakowanych substratów z centrum aktywnym enzymu na KIE, zmierzono ^D(V/K_m) w eksperymencie konkurencyjnym. Metodyka prowadzenia pomiarów została szczegółowo opisana w **Rozdziale 3.7.2**. Całkowite stężenie steroidów w reakcji wynosiło 200 μ M (po 100 μ M znakowanego i 100 μ M nieznakowanego steroidu), a DCPIP 100 μ M. Reakcje prowadzono w zakresie czasowym, w którym przyrost produktu był liniowy. W przypadku Acmb eksperyment przeprowadzono w pH 6,5 oraz pH 8,5, ze względu na niejednoznaczne optimum pH. Wyniki eksperymentu frakcjonowania izotopowego zmierzonego dla Acmb zostały przedstawione na **Rys. 47**. Uzyskane wyniki (**Tab. 17**) dla atomów C1 i C2 były bardzo zbliżone (bez względu na pH medium reakcyjnego) i wahały się w zakresie 1,21–1,50. Nie różniły się też znacząco od KIE otrzymanych w wyniku bezpośredniego pomiaru szybkości reakcji w warunkach stacjonarnych. Niewielki, ale konsekwentny (zarówno w

pH 6,5, jak i 8,5) wzrost KIE dla 17MT sugeruje możliwość występowania w przypadku tego podstawienia deuterem izotopowego efektu wiązania.



Rys. 47. Wyniki eksperymentu frakcjonowania izotopowego zmierzonego dla Acmb w pH 6,5: DHT (A), 17MT (B) oraz pH 8,5: DHT (C) i 17MT (D). x_1 – ułamek molowy substratu/produktu izotopu lekkiego; x_2 – ciężkiego izotopu; \square , \circ , Δ – kolejne powtórzenia pomiarów.

Na **Rys. 48** przedstawiono wyniki analogicznego eksperymentu przeprowadzonego dla KSTD1 w pH 8,0. Uzyskano $^D(V/K_m)$ równy $2,39 \pm 0,07$ dla DHT i $2,21 \pm 0,02$ dla 17MT (**Tab. 17**). Co ciekawe, w przypadku DHT wiązanie znakowanego substratu zmniejszyło obserwowany KIE względem wartości obserwowanej w stanie przed-stacjonarnym ($3,46 \pm 0,04$). Z kolei dla 17MT zaobserwowano wyższą wartość $^D(V/K_m)$ w porównaniu z wynikiem KIE otrzymanym przez bezpośredni pomiar szybkości reakcji (w stanie przedstacjonarnym i stacjonarnym, odpowiednio $1,51 \pm 0,04$ i $1,28 \pm 0,02$). Wyniki te wskazują, że można oczekiwać odwrotnego izotopowego efektu wiązania dla DHT i normalnego (powyżej 1) dla 17MT. Rezultat uzyskany dla C2-znakowanego substratu jest zbliżony z uzyskanym dla Acmb.

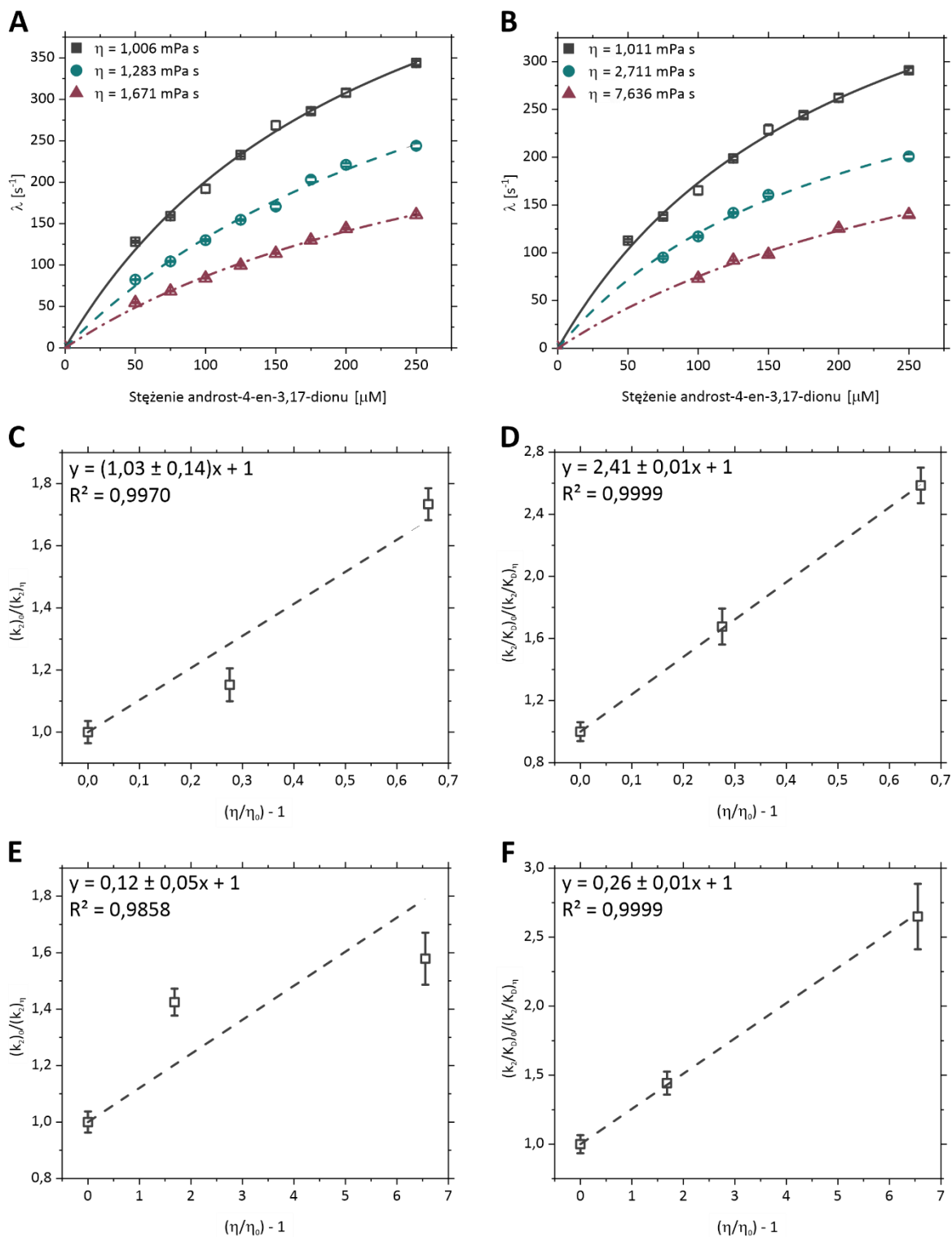


Rys. 48. Wyniki eksperymentu frakcjonowania izotopowego zmierzonego dla KSTD1 w pH 8,0 dla DHT (**A**) oraz 17-MT (**B**). x_1 – ułamek molowy substratu/produktu izotopu lekkiego; x_2 – ciężkiego izotopu; □, ○, Δ – kolejne powtórzenia pomiarów.

Celem wyjaśnienia niskiego KIE obserwowanego dla Acmb i KSTD1 postanowiono ocenić w jakim stopniu zwiększanie lepkości środowiska reakcji wpływa na wiązanie substratu do centrum aktywnego enzymu i zmiany konformacyjne białka zachodzące w trakcie tego procesu. KSVE określono dla reakcji odwodornienia AD przez KSTD1 w stanie przedstacjonarnym. Pomiar prowadzono stosując glicerol lub PEG 20000 jako czynniki zwiększające odpowiednio mikro- lub makrolepkość. Wpływ stężenia substratu na szybkość redukcji flawiny przy rosnącym stężeniu glicerolu lub PEG 20000 zaprezentowano odpowiednio na **Rys. 49A** oraz **B**. λ można opisać za pomocą wzoru **XLV**, gdzie k_2 jest maksymalną szybkością redukcji FAD w warunkach wysycenia enzymu substratem ($[S] \gg [E]$), a K_D stałą dysocjacji kompleksu enzym–substrat.

$$\lambda = \frac{k_2[S]}{K_D + [S]}$$

XLV



Rys. 49. Wpływ lepkości rozpuszczalnika na kinetykę w stanie przedstacjonarnym zmierzoną dla KSTD1 i AD w obecności glicerolu (A) lub PEG 20000 (B). Wpływ glicerolu na wartości k_2 (C) oraz k_2/K_D (D). Wpływ PEG 20000 na wartości k_2 (E) oraz k_2/K_D (F).

W zakresie mikrolepkości 1,006–1,671 mPa s zaobserwowano istotny statystycznie spadek maksymalnej szybkości redukcji flawiny z 658 do 407 s⁻¹ oraz wzrost wartości K_D z 224 do 372 μM (Tab. 18). Otrzymane dane przedstawiono na wykresie jako

znormalizowane parametry kinetyczne: $(k_2)_0/(k_2)_\eta$ i $(k_2/K_D)_0/(k_2/K_D)_\eta$ w funkcji lepkości względnej $(\eta/\eta_0 - 1)$, a następnie dopasowano funkcję liniową, gdzie wyraz wolny wyniósł 1 (**Rys. 49C–D**). Analogicznie opracowano dane otrzymane dla makrolepkości w zakresie 1,011–7,636 mPa s (**Rys. 49E–F**). Jak szczegółowo opisano w **Rozdziale 1.3.4**, wartość współczynnika kierunkowego prostej określa stopień zależności parametrów kinetycznych od lepkości. Współczynnik ten dla prostej przedstawionej na wykresie na **Rys. 49C** wyniósł $1,03 \pm 0,14$, co wskazuje, że proces katalizowany przez KSTD1 silnie zależy od makrolepkości roztworu. Tymczasem w eksperymencie z dodatkiem PEG 20000 współczynnik kierunkowy prostej wyniósł jedynie $0,12 \pm 0,05$ (**Rys. 49E**), co wskazuje na znikomą zależność etapu katalitycznego od makrolepkości wprowadzonej przez PEG 20000. W związku z czym można stwierdzić, że nie dochodzi do istotnych zmian konformacyjnych enzymu podczas reakcji.

Tab. 18. Parametry kinetyczne zmierzone w stanie przedstacjonarnym dla reakcji dehydrogenacji AD przez KSTD1 przy różnej lepkości, modulowanej glicerolem (mikrolepkość) lub PEG 20000 (makrolepkość).

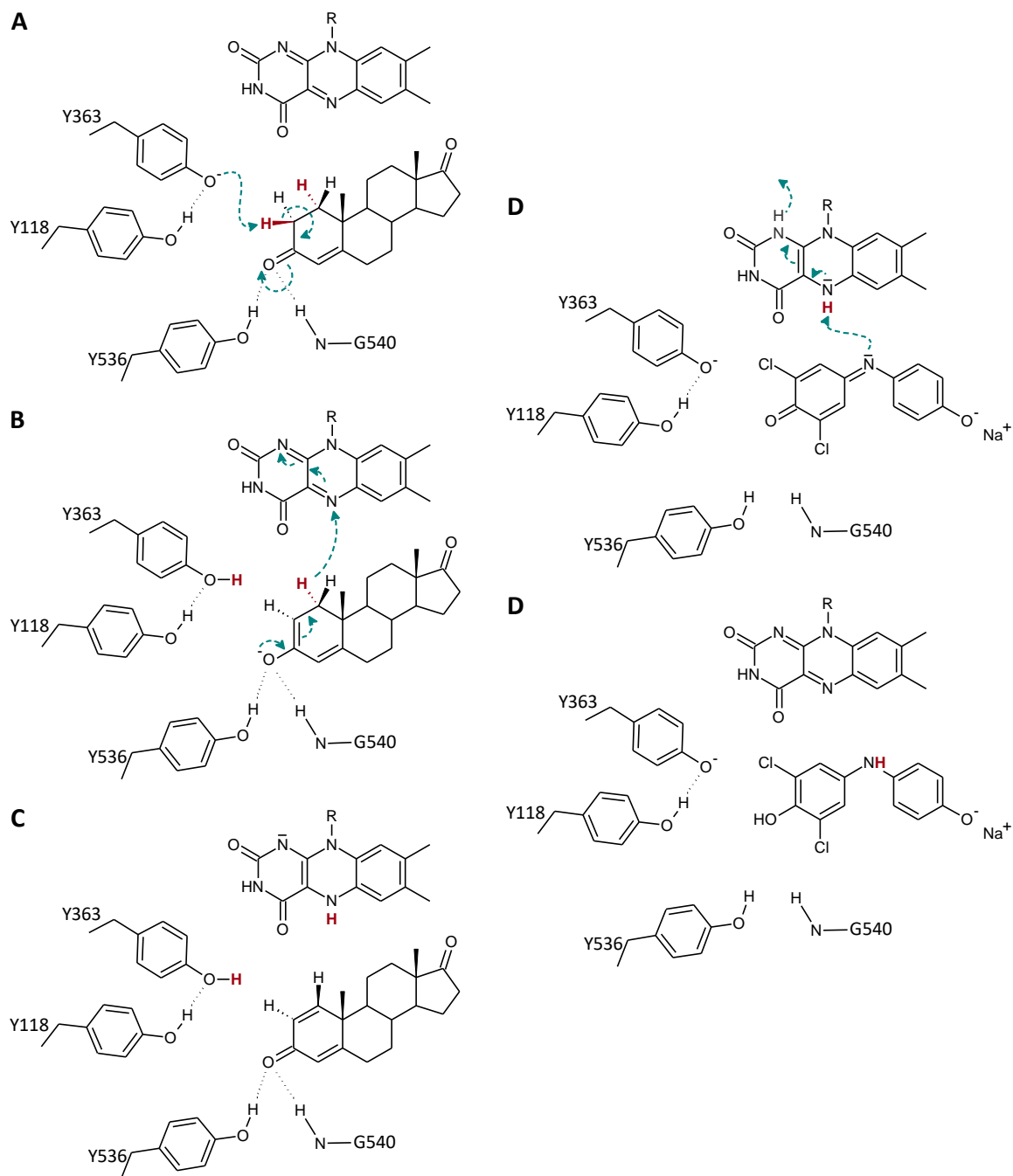
η [mPa s]	K_D [μ M]	k_2 [s^{-1}]	k_2/K_D [$M^{-1} s^{-1}$]
Glycerol			
1,006 (η_0)	$227,7 \pm 13,9$	$658,4 \pm 23,6$	$(2,9 \pm 0,2) \times 10^6$
1,283	$331,2 \pm 22,9$	$571,2 \pm 26,3$	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^6$
1,671	$339,5 \pm 15,0$	$379,7 \pm 11,2$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^6$
PEG 20000			
1,011 (η_0)	$208,0 \pm 13,7$	$533,4 \pm 20,0$	$(2,6 \pm 0,2) \times 10^6$
2,711	$210,5 \pm 12,2$	$374,4 \pm 12,6$	$(1,8 \pm 0,1) \times 10^6$
7,636	$348,9 \pm 31,2$	$337,9 \pm 19,8$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^6$

W przypadku wykresu zależności $(k_2/K_D)_0/(k_2/K_D)_\eta$ od $(\eta/\eta_0 - 1)$ dla glicerolu współczynnik kierunkowy prostej okazał się być większy od 2 (**Rys. 49D**), co sugeruje, że proces tworzenia kompleksu enzym–substrat jest również zależny od lepkości i może być częściowo limitowany przez dyfuzję substratu do centrum aktywnego. Wartość współczynnika m (**Rozdział 1.3.4**) prostej dopasowanej do wykresu zależności $(k_2/K_D)_0/(k_2/K_D)_\eta$ od $(\eta/\eta_0 - 1)$ dla PEG (**Rys. 49F**) wyniosła $0,26 \pm 0,01$. Na tej podstawie można wnioskować, że zmiany konformacyjne enzymu w trakcie wiązania substratu są tylko nieznacznie ograniczone przez makrolepkość wprowadzoną przez PEG i wynikają głównie z ograniczenia dyfuzji steroidu.

4.5.4. Proponowany mechanizm reakcji

Δ^1 -Odwodornienie katalizowane przez Δ^1 -KSTD postępuje zgodnie z dwuetapowym mechanizmem Ping Pong *bi bi*, gdzie pierwszy etap stanowi utlenienie steroidowego substratu i redukcja kofaktora FAD (**Rys. 50A–C**), a drugi reutlenie kofaktora pod wpływem akceptora elektronowego (**Rys. 50D–E**). Biorąc pod uwagę silną zależność optimum pH reakcji zmierzonego w stanie stacjonarnym od zastosowanego akceptora elektronowego można spodziewać się, że reutlenie enzymu zachodzi znacznie wolniej niż redukcja steroidu.

Steroidowy substrat stabilizowany jest w centrum aktywnym przez wiązania wodorowe utworzone z Y536 oraz G540. Aminokwasem kluczowym dla funkcjonowania AcMB jest tyrozyna Y363, odpowiadająca za oderwanie pierwszego z protonów od atomu C2 substratu. Z kolei aminokwas Y118 tworzący wiązanie wodorowe z Y363, stabilizuje tyrozylową formę Y363, jednocześnie moderując jej zasadowy charakter, co umożliwia oddanie protonu i odtworzenie formy tyrozylowej. Y363 najprawdopodobniej pozostaje zdeprotonowana w całym badanym zakresie pH, ze względu na brak wyraźnego optimum pH Δ^1 -dehydrogenacji katalizowanej przez AcMB w stanie przedstacjonarnym. Kolejny etap RHR stanowi oderwanie jonu wodorkowego od atomu C1 3-ketosteroidu i przeniesienie go na FAD. Potwierdzono, że drugi etap redukcji jest enancjoselektywny wobec wodoru 1α , gdyż w tej pozycji został izotopowo oznakowany DHT stosowany do oznaczenia KIE (KIE zaobserwowano dla obu testowanych enzymów). Oba z wspomnianych procesów, tj. oderwanie $2H\beta$ i $1H\alpha$, są związane z KIE, mierzalnym zarówno w stanie przedstacjonarnym, jak i w stanie stacjonarnym. Aby to było możliwe bariery energetyczne obu etapów RHR muszą być do siebie zbliżone, jednak to etap przeniesienia jonu wodorkowego $1H\alpha$ wydaje się limitować szybkości etapu katalicznego reakcji (wyraźnie wyższy KIE zmierzony w stanie przedstacjonarnym dla C1-deuterowanego DHT niż C2-znakowanego 17MT). W przypadku AcMB, w szlaku przekazania oderwanego protonu do środowiska najprawdopodobniej uczestniczą tyrozyny Y118, Y115 oraz Y467, wraz z przynajmniej jedną cząsteczką wody widoczną w strukturze krystalograficznej.



Rys. 50. Schemat reakcji półkowej redukcji (A–C) oraz utlenienia (D–E) Δ^1 -KSTD na przykładzie Acmb.

KIE dla obu badanych Δ^1 -KSTD jest stosunkowo niski biorąc pod uwagę, że masa odrywanego od substratu atomu została zwiększona dwukrotnie (**Rozdział 1.3.3**) i obliczenia teoretyczne, wg których wartość KIE wynosi ~ 4 [145]. Przyczyną obniżenia obserwowanego KIE mogą być ograniczenia dyfuzyjne etapu katalitycznego oraz wiązania substratu, a także izotopowy efekt wiązania występujący w przypadku substratu C2-deuterowanego. Zważywszy na strukturę obu badanych enzymów można spodziewać

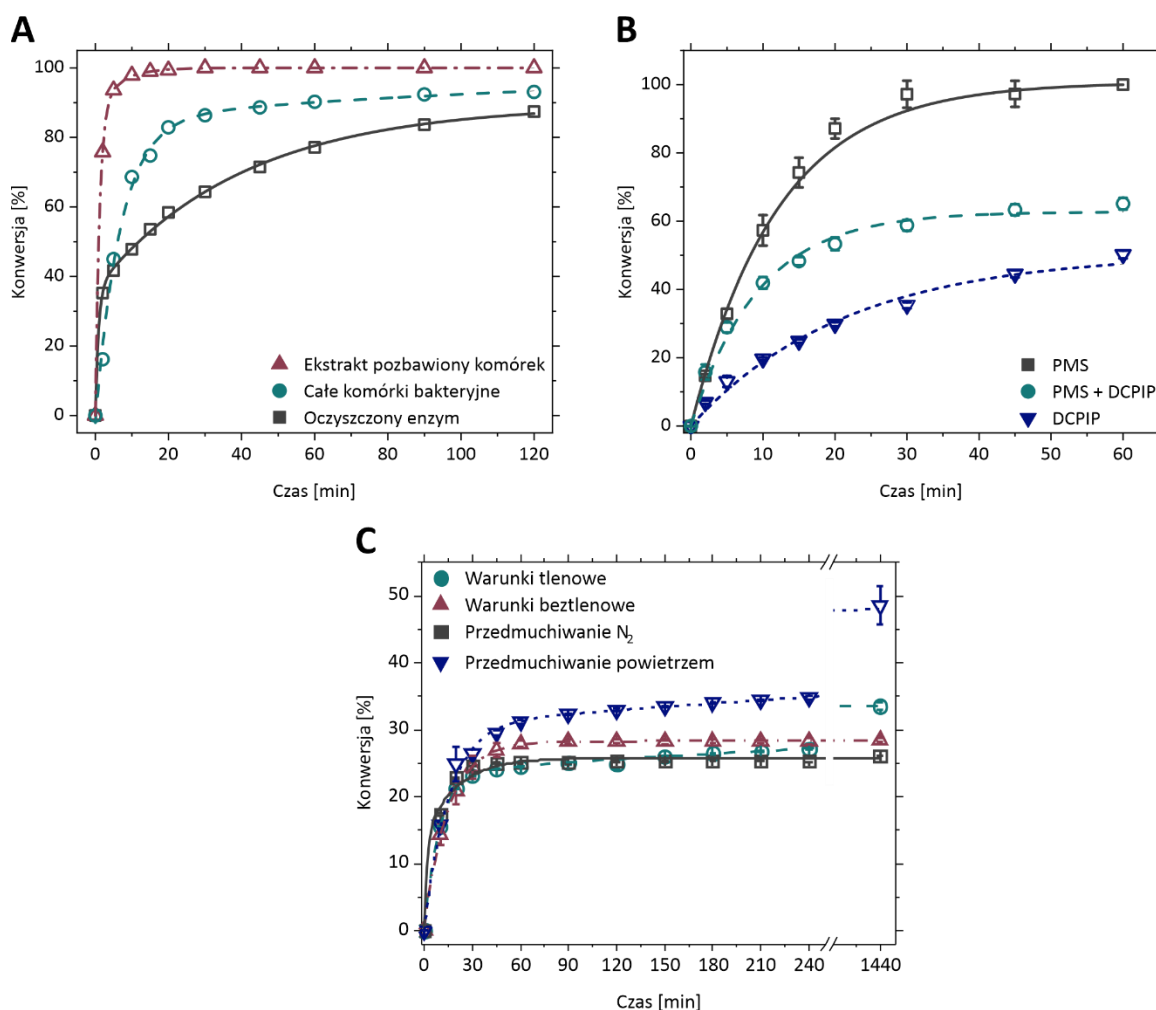
się, że ograniczenia dyfuzyjne wywierają większy wpływ na przebieg reakcji w przypadku Acmb (częściowo zasłonięte centrum aktywne), stąd niższy KIE zmierzony dla Acmb niż KSTD1. Co więcej, w przypadku KSTD1 wiązanie substratu nie łączy się ze znaczącymi zmianami konformacyjnymi enzymu, jednak nie ma pewności jak ten proces przebiega u Acmb i czy również nie maskuje etapu katalitycznego.

4.6. Synteza Δ^1 -dehydro-3-ketosteroidów z wykorzystaniem Δ^1 -KSTD

4.6.1. Optymalizacja warunków Δ^1 -dehydrogenacji

Ostatni etap pracy stanowiła synteza wybranych Δ^1 -dehydro-3-ketosteroidów o znaczeniu farmakologicznym z zastosowaniem Acmb jako biokatalizatora. Niektóre z parametrów syntezy zostały zoptymalizowane w ramach wcześniej opisanych eksperymentów. Ustalono optimum temperaturowe reakcji Δ^1 -dehydrogenacji katalizowanej przez Acmb (**Rozdział 4.3.1**), ponadto wyznaczono optimum pH reakcji zależne od obecności sztucznych akceptorów elektronowych, które zostały wykorzystane do syntezy (**Rozdział 4.3.2**) oraz ich parametry kinetyczne (**Rozdział 4.4.1**). Dalsza, opisana w niniejszym rozdziale optymalizacja polegała na przetestowaniu w warunkach reaktorowych działania różnych frakcji enzymu i akceptorów elektronowych oraz na określeniu wpływu atmosfery na przebieg reakcji z udziałem DCPIP.

W **Rozdziale 4.1**, bazując na spektrofotometrycznym teście aktywności, stwierdzono, iż frakcją o największej aktywności był uzyskany w trakcie oczyszczania Acmb surowy ekstrakt komórkowy po inkubacji z Triton X-100 i FAD. Ponieważ nie sposób określić aktywność właściwą całych komórek bakteryjnych (co wynika z braku możliwości pomiaru całkowitego stężenia białka), zdecydowano się przeprowadzić testy reaktorowe z tą frakcją. Efektywność systemu złożonego z niedzielących się komórek porównano do efektywności ekstraktu pozbawionego komórek oraz oczyszczonego enzymu. Testy reaktorowe przeprowadzono z użyciem takiej ilości roztworu komórek *E. coli* w buforze i ekstraktu pozbawionego komórek, która była proporcjonalna do ilości oczyszczonego enzymu. Eksperyment wykazał, że biokatalizator w postaci całych komórek może być skutecznie wykorzystywany do odwodornienia 3-ketosteroidów, a jego efektywność jest wyższa niż oczyszczonego enzymu (**Rys. 51A**). Jednak to ekstrakt pozbawiony komórek okazał się najwydajniejszą frakcją, co potwierdza opisaną w **Rozdziale 4.1** deagregację białka pod wpływem Triton X-100 i rekonstytucję FAD.



Rys. 51. Przebieg reakcji Δ^1 -dehydrogenacji zależny od frakcji enzymu zastosowanej jako katalizator (A), użytego sztucznego akceptora elektronowego (B) lub atmosfery (C).

W efekcie w reaktorze z ekstraktem pozbawionym komórek możliwe było przetworzenie 99% substratu w czasie 20 min, podczas gdy w reaktorze z całymi komórkami 93% konwersję osiągnięto po 2 h trwania reakcji. Ze względu na utratę aktywności enzymu podczas oczyszczania, w przypadku wyizolowanego enzymu osiągnięto zaledwie 58% konwersji po 20 min reakcji, a 87% po 2 h.

Biorąc pod uwagę wspomnianą w **Rozdziale 4.3.2** fotolizę PMS (**24**) oraz towarzyszące jej reakcje następcze [138], dobrym sposobem na określenie efektywności tego katalizatora okazało się przeprowadzenie Δ^1 -dehydrogenacji w warunkach reaktorowych, monitorując przebieg reakcji z wykorzystaniem HPLC. Reakcja w analogicznych warunkach została przeprowadzona z udziałem PMS, DCPIP (**25**), systemu DCPIP–PMS oraz $K_3[Fe(CN)_6]$ (**29**), każdorazowo w optymalnym dla danego akceptora elektronowego pH (tj. odpowiednio 8,0, 6,5, 9,0 i 8,0). Podejście to miało też na celu sprawdzenie, czy obserwowane wysokie optimum pH dla PMS i układu DCPIP–PMS nie

jest wynikiem wspomnianej niestabilności PMS przy wyższym pH i nieenzymatycznej redukcji DCPIP [146]. Najwyższą konwersję substratu do produktu zaobserwowano dla PMS (>99% po 30 min), następnie mieszaniny DCPIP–PMS (60% po 45 min) i DCPIP (40% po 60 min) (**Rys. 51B**). Konwersja substratu w przypadku $K_3[Fe(CN)_6]$ była znikoma (0,1% po 21 h), dlatego też przebiegu reakcji z udziałem tego akceptora nie zaprezentowano na wykresie. Uzyskane wyniki są zgodne z parametrami kinetycznymi uzyskanymi dla akceptorów elektronowych (**Rozdział 4.4.1**), a najbardziej efektywnym okazał się PMS.

Wcześniejsze badania wykazały, że zredukowany FAD w centrum aktywnym Δ^1 -KSTD można ponownie utlenić z wykorzystaniem tlenu cząsteczkowego, co jak wspomniano w **Rozdziale 1.2.2** skutkuje powstawaniem szkodliwego (dla enzymów) nadtlenku wodoru [45,50,83]. Chociaż Acmb w stanie utlenionym pozostaje stabilna podczas inkubacji w atmosferze tlenowej (**Rys. 51B**), podczas reakcji zredukowany FAD, nawet w obecności innego utleniacza może aktywować tlen cząsteczkowy rozpuszczony w środowisku reakcji, co z kolei prowadzi do produkcji niekorzystnego H_2O_2 . Jednakże w przypadku DCPIP zaobserwowano, że obecność O_2 umożliwia syntezę z wydajnością wyższą niż wynikałoby ze stechiometrii dodanego reutleniacza. W ramach niniejszej pracy potwierdzono, że DCPIP zredukowany chemicznie (ditiocyanatem (III) sodu), elektrochemicznie, bądź enzymatycznie przez Acmb, może być ponownie utleniony przez H_2O_2 w warunkach beztlenowych lub bezpośrednio przez O_2 . W celu zbadania wpływu O_2 (i generowanego w trakcie reakcji H_2O_2) na reutlenianie DCPIP, a tym samym Δ^1 -dehydrogenację katalizowaną przez Acmb, prowadzono reakcje z ok. 4-krotnym nadmiarem molowym progesteronu w stosunku do DCPIP. Reaktory pracowały w warunkach tlenowych, w warunkach beztlenowych (98:2 (v/v) $N_2:H_2$) oraz przy ciągłym przedmuchiwanym sprzężonym powietrzem lub N_2 (**Rys. 51C**). Ostatni typ reaktora (przedmuchiwany N_2) zastosowano jako kontrolę pozwalającą na ocenę potencjalnej denaturacji białka, spowodowanej jego pienieniem się w reaktorze. W warunkach beztlenowych reakcja zatrzymała się po 60 min z powodu wyczerpania DCPIP (98% konwersja DCPIP), a po 24 h osiągnięto 100% konwersję DCPIP (co odpowiada konwersji progesteronu na poziomie 28,4%). W przypadku reaktora pracującego przy ciągłym przedmuchiwanym sprzężonym azotem osiągnięto niższą wydajność, która po 24 h wyniosła 92% w stosunku do DCPIP. Wskazuje to na niewielką dezaktywację enzymu przez przepływający gaz. W warunkach tlenowych reakcja postępowała nieco wolniej

w porównaniu do warunków beztlenowych, ale po prawie całkowitym wyczerpaniu DCPIP po 60 min (86% konwersja DCPIP) reakcja postępowała ze stałą szybkością do osiągnięcia 33,5% konwersji względem progesteronu po 24 h, co odpowiada 118% początkowego stężenia DCPIP. Ostatecznie reaktor przedmuchiwany sprężonym powietrzem okazał się być najbardziej efektywny. Już po 60 min udało się osiągnąć konwersje substratu na poziomie 31,1% (110% początkowego stężenia DCPIP), a po 24 h wyniosła ona ponad 48,5% (171% początkowego stężenia DCPIP). Również w tym ostatnim przypadku po 60 min procesu szybkość reakcji była stała, ale wyższa niż w warunkach tlenowych. Eksperymenty te wykazały, że obecność O₂ w układzie reakcyjnym z DCPIP rzeczywiście pozwala na uzyskanie wydajności produktu znacznie przewyższającej stężenie reutleniacza, a potencjalna inaktywacja enzymu przez H₂O₂ jest równoważona wzrostem szybkości reakcji w wyniku ponownego utleniania akceptora elektronowego, a tym samym enzymu (tj. brakiem spadku szybkości reakcji spowodowanego obniżeniem stężenia DCPIP).

4.6.2. Zwiększanie skali syntezy

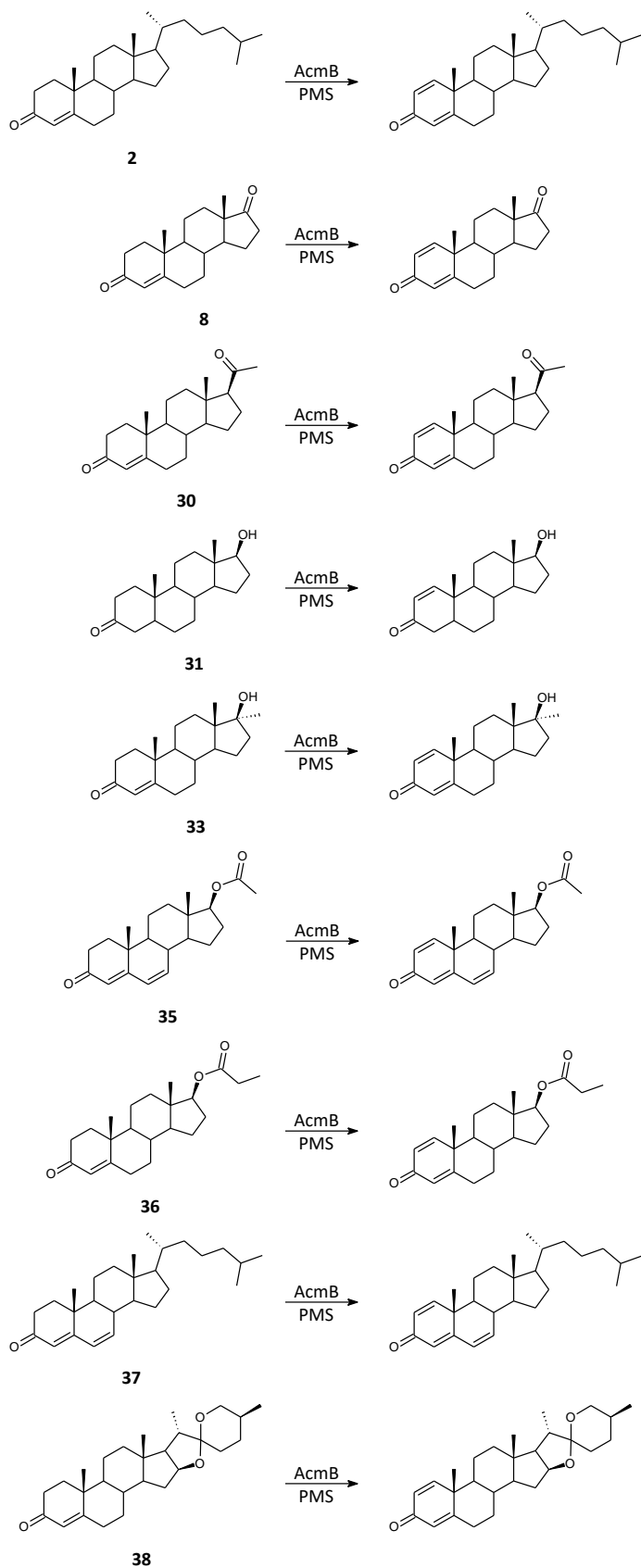
Potencjał AcMB jako katalizatora do syntezy Δ^1 -odwodornionych 3-ketosteroidów sprawdzono wykorzystując oczyszczony enzym i PMS jako akceptor elektronowy. Reakcje zostały przeprowadzone w skali 10 mL, w warunkach tlenowych, w temperaturze 30°C, z dodatkiem HBC i EGME. Synteza substratów **2, 8, 30, 31, 33, 35, 36, 37 (Rys. 52)** była prowadzona w skali 1,5–2,1 g L⁻¹, przy dodatku 5% (w/v) HBC i 2% (v/v) EGME, przez 2 h. Po tym czasie reakcje zatrzymano i sprawdzono stopień przereagowania substratów z wykorzystaniem HPLC lub LC-MS/MS (**Tab. 19**). AD, PG, DHT, 17-MT, octan 6-dehydrotestosteronu oraz propionian testosteronu osiągnęły konwersję przekraczającą 99%, a wydajność izolacji (przeprowadzonej przez dr hab. Tomasza Janeczko, profesora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu) mieściła się w zakresie 60–86%. Dodatkowy łańcuch alifatyczny w strukturze cholest-4-en-3-onu oraz cholest-4,6-dien-3-onu spowodował spadek wydajności syntezy do 70–78% i wydajność izolacji do 50–59%. Było to wynikiem znacznie słabszej rozpuszczalności tych związków w warunkach reakcji. Poprawa wydajności syntezy wymagałaby przeprowadzenia optymalizacji składu mieszaniny reakcyjnej dla tych hydrofobowych substratów, gdyż skład ten został zoptymalizowany dla znacznie lepiej rozpuszczalnego w środowisku wodnym

progesteronu [141]. Dla substratów **8**, **30** i **31** syntezę powtórzono w skali zwiększonej do 3,5–3,8 g L⁻¹. Ilość HBC i EGME zwiększono do odpowiednio 8% (w/v) i 4% (v/v) w przypadku AD i PG, oraz 10% (w/v) i 5% (v/v) w przypadku DHT. Związki **8** i **30** przereagowały całkowicie w czasie 5,5 h, a substrat **31** w czasie 2 h, jednak wymagało to zastosowania większej ilości enzymu. Dla ostatniego z substratów – diosgenonu (**38**) zaobserwowano 87% konwersję przy stężeniu 1,2 mM (0,5 g L⁻¹), po 4,5 h prowadzenia reakcji w układzie okresowym z zasilaniem. Po przereagowaniu pierwszych 0,6 mM związku **38**, do systemu dodano kolejne 0,6 mM, a reakcję prowadzono przez kolejne 4 h 15 min. Wydajność syntezy udało się zwiększyć do 100% przez dodanie świeżej porcji enzymu po osiągnięciu przez reakcję pozornej równowagi. (25*R*)-Spirosta-1,4-dien-3-on oczyszczono przez ekstrakcję do fazy stałej, przy użyciu kolumny C18, a wydajność izolacji wynosiła 53%. Jest to pierwsze doniesienie o enzymatycznym odwodornieniu tej pochodnej saponiny, która wykazuje właściwości biobójcze, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe [71,147].

Tab. 19. Wyniki syntezy Δ^1 -3-ketosteroidów z wykorzystaniem Acmb jako katalizatora.

Substrat	Stężenie [g L ⁻¹]	Wydajność syntezy [%]	Wydajność oczyszczania [%] [141]
Cholest-4-en-3-on (2)	1,9	78,6 ± 1,7	50
AD (8)	1,5	100	86
	3,5	100	NM ^a
PG (30)	1,6	100	74
	3,5	100	NM
DHT (31)	1,9	100	71
	3,8	100	NM
17-MT (33)	1,7	100	80
Octan 6-dehyrotestosteronu (35)	1,6	100	60
Propionian testosteronu (36)	1,6	99,2 ± 0,2	83
Cholest-4,6-dien-3-on (37)	2,1	70,2 ± 0,5	59
Diosgenon (38)	0,5	87	53

^aNM, nie zmierzono



Rys. 52. Schematy reakcji Δ^1 -dehydrogenacji cholest-4-en-3-onu (**2**), androst-4-en-3,17-dionu (**8**), progesteronu (**30**), dihydrotestosteronu (**31**), 17-metylotestosteronu (**33**), octanu 6-dehydrotestosteronu (**35**), propionianu testosteronu (**36**) cholest-4,6-dien-3-onu (**37**) oraz diosgenonu (**38**).

5. Podsumowanie

- Zasocjowana z wewnętrzną błoną komórkową *S. denitrificans* Acmb, wyizolowana z komórek bakteryjnych tworzy agregaty o masie przekraczającej 600 kDa. Za agregację białka odpowiadają przede wszystkim oddziaływania hydrofobowe pomiędzy hydrofobowymi aminokwasami zlokalizowanymi licznie na powierzchni białka. Dodatkowo zjawisko jest wzmacniane przez oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy monomerami białka a utworzonymi agregatami, posiadającymi w pH obojętnym przeciwne ładunki.
- Zastosowanie niejonowych detergentów oraz czynników redukujących mostki disiarczkowe na wszystkich etapach oczyszczania Acmb umożliwia deagregację. Co więcej, deagregacja wraz z rekonstytucją kofaktora prowadzi do ponad 2-krotnego wzrostu całkowitej aktywności preparatu enzymatycznego w formie surowego ekstraktu komórkowego.
- Acmb w kompleksie z FAD i ADD krystalizuje w układzie trygonalnym w grupie przestrzennej P3₁21 z dwiema cząsteczkami białka w jednostce asymetrycznej. W budowie enzymu można wyróżnić trzy domeny: wiążącą FAD, katalityczną oraz zasocjowaną z błoną, z czego ta pierwsza zawiera charakterystyczny dla białek wiążących FAD motyw Rossmanna. Ze względu na liczne insercje w obrębie wspomnianego motywu Rossmanna można stwierdzić, że Acmb należy do podrodziny GR₂ rodziny strukturalnej reduktazy glutationowej (GR).
- Kofaktor w formie utlenionej wiązany jest do apoenzymu głównie przez liczne wiązania wodorowe, a także liczne interakcje typu π -alkil, π -sigma oraz alkil-alkil. Natomiast steroidowy ligand tworzy wiązania wodorowe z tyrozyną Y536 i glicyną G540, ponadto utrzymywany jest w centrum aktywnym przez oddziaływania typu π -alkil i alkil-alkil.
- Do związania białka z błoną dochodzi najprawdopodobniej przez amfipatyczną α -helisę stanowiącą część domeny nazwanej domeną zasocjowaną z błoną. Obecność dodatkowej domeny u Acmb, a tym samym bezpośrednie sąsiedztwo centrum aktywnego i błony cytoplazmatycznej, najprawdopodobniej wpływa na zwiększenie powinowactwa enzymu do 3-ketosteroidów podstawionych w pozycji C17 np. długim alifatycznym łańcuchem.

- Biorąc pod uwagę początkową szybkość reakcji oraz stabilność Acmb optimum temperaturowe enzymu wynosi 30°C. Optimum pH Δ^1 -dehydrogenacji katalizowanej przez Acmb zmierzone w stanie stacjonarnym silnie zależy od zastosowanego akceptora elektronowego i waha się w zakresie od 6,5 do 9,0. Zjawisko to może być związane z oddziaływaniami elektrostatycznymi pomiędzy akceptorem a zredukowanym FAD, gdyż pomiary kinetyczne w stanie przedstacjonarnym nie wykazały występowania wyraźnego optimum pH dla etapu RHR.
- Cholest-4-en-3-on mógłby stanowić substrat natywny Acmb, natomiast rolę naturalnego akceptora elektronowego mógłby pełnić któryś z obecnych w komórkach bakteryjnych chinonów, np. 2-metylo-1,4-naftochinon, 4-benzochinon lub 1,2-naftochinon.
- Słaba rozpuszczalność steroidów z alifatycznymi lub policyklicznymi podstawnikami przy atomie C17 powoduje ich niską biodostępność, prowadząc do błędnych wniosków dotyczących specyficzności substratowej Δ^1 -KSTD. KSTD1 okazała się być zdolna do katalizowania Δ^1 -odwodornienia steroidów z łańcuchem alifatycznym (a nawet policyklicznym pierścieniem) w pozycji C17, choć wcześniejsze badania temu zaprzeczały [45].
- W centrum aktywnym Acmb Y363 pełni rolę kluczową dla procesu katalitycznego – zasady odrywającej proton 2H β od atomu C2. Aminokwas Y118 stabilizuje zdeprotonowaną Y363 przez wiązania wodorowe, jednocześnie moderując jej zasadowy charakter. Z kolei Y536 wraz z G540 mogą stabilizować wiązanie substratu i tautomeryzację keto-enolową produktu przejściowego. Y115, Y467 wraz z Y118 najpewniej uczestniczą w szlaku przekazania protonu do środowiska z zabudowanego centrum aktywnego.
- Reakcja katalizowana przez Acmb postępuje zgodnie z mechanizmem Ping Pong *bi bi*, gdzie pierwszy z wiązanych substratów stanowi 3-ketosteroid, a drugi akceptor elektronowy.
- KIE występuje zarówno w przypadku podstawienia deuterem substratu w pozycji C1, jak i C2, i zmierzony metodą bezpośrednią w stanie stacjonarnym jest bardzo zbliżony dla obu podstawień i testowanych enzymów, co wskazuje na podobną wysokość barier energetycznych obu etapów reakcji połówkowej redukcji. Wyższy KIE dla C1-deuterowanego substratu (w stosunku do KIE na atomie C2) w przypadku pomiaru

szybkości redukcji flawiny w stanie przedstacjonarnym wskazuje na etap przeniesia jonu wodorokowego na FAD jako nieznacznie limitujący RHR.

- Ograniczenia dyfuzyjne procesu katalitycznego oraz wychwytu substratu, wraz z izotopowym efektem wiązania zaobserwowanym dla C2-znakowanego substratu mogą wpływać na zniżenie wyznaczonego eksperymentalnie KIE w stosunku do wartości KIE określonego metodami obliczeniowymi.
- W przypadku KSTD1 nie zaobserwowano aby etap katalizy i wiązania substratu łączył się z istotnymi zmianami konformacyjnym białka.
- Biokatalizator w postaci całych komórek zawierających AcMB może być skutecznie wykorzystywany do odwodornienia 3-ketosteroidów, jednak to ekstrakt pozbawiony komórek jest najwydajniejszą frakcją enzymu pozyskaną w trakcie jego oczyszczania.
- Najefektywniejszym sztucznym akceptorem elektronowym w warunkach reaktorowych okazał się PMS. Natomiast obecność O₂ w układzie reakcyjnym z DCPIP pozwala na odtwarzanie akceptora elektronowego i uzyskanie wydajności produktu znacznie przewyższającej stężenie reutleniacza. W takim przypadku potencjalna inaktywacja enzymu przez generowany w trakcie reakcji prowadzonej w warunkach tlenowych H₂O₂ jest równoważona wzrostem szybkości reakcji w wyniku ponownego utleniania DCPIP.
- Z wykorzystaniem oczyszczonej AcMB udało się z sukcesem zsyntezować szereg Δ^1 -3-ketosteroidów z wydajnością dochodzącą do 3,8 g L⁻¹. Wśród produktów Δ^1 -dehydrogenacji znalazł się Δ^1 -diosegnon – steroidowa pochodna saponiny o właściwościach biobójczych, przeciwzapalnych i przeciwnowotworowych, której enzymatyczne odwodornienie zostało przeprowadzone po raz pierwszy.

6. Literatura

1. Tong W, Dong X. Microbial Biotransformation: Recent Developments on Steroid Drugs. *Recent Pat Biotechnol.* 2009;3:141–53.
2. Donova M V, Egorova O V. Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;94:1423–47.
3. Fernández-cabezón L, Galán B, García JL. New Insights on Steroid Biotechnology. *Front Microbiol.* 2018;9:958.
4. Global Steroids Industrial Chain Market Growth Overview [Internet]. [cited 2021 Jul 27]. Available from: <https://www.qyresearch.com/index/detail/701226/global-steroids-industrial-chain-market>
5. Yi D, Bayer T, Badenhorst CPS, Wu S, Doerr M, Ho M, et al. Recent trends in biocatalysis. *Chem Soc Rev. Royal Society of Chemistry;* 2021;50:8003–49.
6. Rohman A, Dijkstra BW. The role and mechanism of microbial 3-ketosteroid Δ 1-dehydrogenases in steroid breakdown. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019;191:105366.
7. Urich K. Sterols and Steroids. *Comp Anim Biochem.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1994. p. 624–56.
8. Lin CW, Wang PH, Ismail W, Tsai YW, Nayal A El, Yang CY, et al. Substrate uptake and subcellular compartmentation of anoxic cholesterol catabolism in *Sterolibacterium denitrificans*. *J Biol Chem.* 2015;290:1155–69.
9. Chiang YR, Ismail W, Müller M, Fuchs G. Initial steps in the anoxic metabolism of cholesterol by the denitrifying *Sterolibacterium denitrificans*. *J Biol Chem.* 2007;282:13240–9.
10. Chiang Y, Ismail W, Heintz D, Schaeffer C, Dorsselaer A Van, Fuchs G. Study of Anoxic and Oxic Cholesterol Metabolism by *Sterolibacterium denitrificans*. *J Bacteriol.* 2008;190:905–14.
11. García JL, Uhía I, Galán B. Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria. *Microb Biotechnol.* 2012;5:679–699.
12. Capyk JK, Kalscheuer R, Stewart GR, Liu J, Kwon H, Zhao R, et al. Mycobacterial Cytochrome P450 125 (Cyp125) Catalyzes the Terminal Hydroxylation of C27 Steroids. *J Biol Chem.* 2009;284:35534–42.
13. Rośtoniec KZ, Wilbrink MH, Capyk JK, Mohn WW, Ostendorf M, Geize R Van Der, et al.

Cytochrome P450 125 (CYP125) catalyses C26-hydroxylation to initiate sterol side-chain degradation in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Mol Microbiol.* 2009;74:1031–43.

14. Driscoll MD, Mclean KJ, Levy C, Mast N, Pikuleva IA, Lafite P, et al. Structural and Biochemical Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CYP142. *J Biol Chem.* 2010;285:38270–82.

15. Wilbrink MH, Petrusma M, Dijkhuizen L, Wilbrink MH, Petrusma M, Dijkhuizen L, et al. FadD19 of *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269, a Steroid-Coenzyme A Ligase Essential for Degradation of C-24 Branched Sterol Side Chains. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:4455–4464.

16. Casabon I, Swain K, Crowe AM, Lindsay D, Mohn WW. Synthetases Involved in Steroid Side-Chain Actinobacterial Acyl Coenzyme A Synthetases Involved in Steroid. *J Bacteriol.* 2014;196:579–87.

17. Sih CJ, Tai HH, Lee SS, Coombet RG. Steroid Oxidation by Microorganisms. XIV. Pathway of Cholesterol Side-Chain Degradation. *Biochemistry.* 1968;7:808–18.

18. Wang PH, Lee TH, Ismail W, Tsai CY, Lin CW, Tsai YW, et al. An Oxygenase-Independent Cholesterol Catabolic Pathway Operates under Oxic Conditions. *PLoS One.* 2013;8:e66675.

19. Yang M, Lu R, Guja KE, Wipperman MF, Clair JRS, Bonds AC, et al. Unraveling Cholesterol Catabolism in *Mycobacterium tuberculosis*: ChsE4-ChsE5 α 2 β 2 Acyl-CoA Dehydrogenase Initiates β -Oxidation of 3-Oxo-cholest-4-en-26-oyl CoA. *ACS Infect Dis.* 2015;1:110–25.

20. Jacoby C, Ferlaino S, Bezold D, Jessen H, Müller M, Boll M. ATP-dependent hydroxylation of an unactivated primary carbon with water. *Nat Commun.* 2020;11:1–10.

21. Chiang YR, Ismail W, Gallien S, Heintz D, Van Dorsselaer A, Fuchs G. Cholest-4-en-3-one- Δ 1-dehydrogenase, a flavoprotein catalyzing the second step in anoxic cholesterol metabolism. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:107–13.

22. Chiang Y, Ismail W. Anaerobic Biodegradation of Steroids. *Anaerob Util Hydrocarb Oils, Lipids.* Springer, Cham; 2017. p. 1–32.

23. Rohman A, Van Oosterwijk N, Dijkstra BW. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of 3-ketosteroid Δ 1-dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* SQ1. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2012;68:551–6.

24. Rohman A, Van Oosterwijk N, Thunnissen AMWH, Dijkstra BW. Crystal structure and

- site-directed mutagenesis of 3-ketosteroid δ 1-dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* SQ1 explain its catalytic mechanism. *J Biol Chem*. 2013;288:35559–68.
25. Shin W, Kihara D. 55 Years of the Rossmann Fold. *Protein Supersecondary Struct Methods Mol Biol*. Humana Press, New York, NY; 2019. p. 1–13.
 26. Ghisla S, Massey V. Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions. *Eur J Biochem*. 1989;181:1–17.
 27. Dijkstra BW, van Oosterwijk N, Rohman A. Structure and Catalytic Mechanism of 3-Ketosteroid Dehydrogenases. *Procedia Chem*. 2016;18:3–11.
 28. Levy HR, Talalay P. Bacterial oxidation of steroids. II. Studies on the enzymatic mechanism of ring A dehydrogenation. *J Biol Chem*. 1959;234:2014–21.
 29. Hayano M, Ringold HJ, Stefanovic V, Gut M, Dorfman RI. The stereochemical course of enzymatic steroid 1,2-dehydrogenation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1961;4:454–9.
 30. Ringold HJ, Hayano M, Stefanovic V. Concerning the Stereochemistry and Bacterial of the of Steroids. *J Biol Chem*. 1963;238:1960–5.
 31. Jerussi R, Ringold HJ. The Mechanism of the Bacterial C-1,2 Dehydrogenation of Steroids. III. Kinetics and Isotope Effects. *Biochemistry*. 1965;4:2113–26.
 32. Itagaki E, Matushita H, Hatta T. Steroid transhydrogenase activity of 3-ketosteroid- δ -dehydrogenase from *Nocardia corallina*. *J Biochem*. 1990;108:122–7.
 33. Itagaki E, Wakabayashi T, Hatta T. Purification and characterization of 3-ketosteroid- Δ 1-dehydrogenase from *Nocardia corallina*. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol*. 1990;1038:60–7.
 34. Ullrich V. Enzymatic Hydroxylations with Molecular Oxygen. *Angew Chemie Int Ed*. 1972;11:701–12.
 35. Penasse L, Peyre M. Studies of 3-oxo steroid delta-1-oxydo reductase of *Arthrobacter simplex*. *Steroids*. 1968;12:525–44.
 36. Groh H, Komel R, Deppmeyer V, Schade W, Hörhold C. Steroid transforming enzymes from microorganisms: The reverse reaction of the steroid-1-dehydrogenase from *Nocardia*. *J Steroid Biochem*. 1980;13:1413–5.
 37. Gual C, Stich S, M Gut M, Dorfman R. Microbiological Synthesis of 2-Hydroxyandrost-1,4-diene-3,17-dione. *J Org Chem*. 1958;24:1958–9.
 38. Choi KP, Molnár I, Yamashita M, Murooka Y. Purification and characterization of the 3-ketosteroid- δ -dehydrogenase of *Arthrobacter simplex* produced in *Streptomyces*

- lividans. *J Biochem.* 1995;117:1043–9.
39. Shao M, Chen Y, Zhang X, Rao Z, Xu M, Yang T, et al. Enhanced intracellular soluble production of 3-ketosteroid- Δ 1-dehydrogenase from *Mycobacterium neoaurum* in *Escherichia coli* and its application in the androst-1,4-diene-3,17-dione production. *J Chem Technol Biotechnol.* 2017;92:350–7.
40. Mao S, Guo Q, Xu P, Gao D, Cheng X, Zhu M, et al. Biochemical and structural characterization of 3-ketosteroid- Δ 1-dehydrogenase, a candidate enzyme for efficient bioconversion of steroids. *J Chem Technol Biotechnol.* 2019;94:309–16.
41. Zhang R, Xu X, Cao H, Yuan C, Yuminaga Y, Zhao S, et al. Purification, characterization, and application of a high activity 3-ketosteroid- Δ 1-dehydrogenase from *Mycobacterium neoaurum* DSM 1381. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103:6605–16.
42. Kreit J. Aerobic catabolism of sterols by microorganisms: key enzymes that open the 3-ketosteroid nucleus. *FEMS Microbiol Lett.* Oxford University Press; 2019;366:1–13.
43. Wang X, Feng J, Zhang D, Wu Q, Zhu D, Ma Y. Characterization of new recombinant 3-ketosteroid- Δ 1-dehydrogenases for the biotransformation of steroids. *Appl Microbiol Biotechnol.* Applied Microbiology and Biotechnology; 2017;101:6049–60.
44. Mao S, Wang JW, Liu F, Zhu Z, Gao D, Guo Q, et al. Engineering of 3-ketosteroid Δ 1-dehydrogenase based site-directed saturation mutagenesis for efficient biotransformation of steroidal substrates. *Microb Cell Fact.* BioMed Central; 2018;17:1–13.
45. Knol J, Bodewits K, Hessels GI, Dijkhuizen L, Van Der Geize R. 3-Keto-5 α -steroid Δ 1-dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* SQ1 and its orthologue in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv are highly specific enzymes that function in cholesterol catabolism. *Biochem J.* 2008;410:339–46.
46. Wovcha MG, Brooks KE, Kominek LA. Evidence for two steroid 1,2-dehydrogenase activities in *Mycobacterium fortuitum*. *Biochim Biophys Acta.* 1979;574:471–9.
47. Manosroi J, Sripalakit P, Manosroi A. Factors affecting the biotransformation of chlormadinone acetate to delmadinone acetate. *J Mol Catal B Enzym.* 2003;23:37–42.
48. Sih CJ, Bennett RE. Steroid 1-dehydrogenase of *Nocardia restrictus*. *Biochim Biophys Acta.* 1962;56:584–92.
49. Madyastha KM, Shankar VN. Role of Neutral Metabolites in Microbial Conversion of 3 β -Acetoxy-19-Hydroxycholest-5-Ene into Estrone. *Appl Environ Microbiol.*

1994;60:1512–8.

50. Aries VC, Goddard P, Hill MJ. Degradation of steroids by intestinal bacteria. III. 3-Oxo-5 β -steroid Δ 1-dehydrogenase and 3-oxo-5 β -steroid Δ 4-dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*. 1971;248:482–8.

51. Zhang Q, Ren Y, He J, Cheng S. Multiplicity of 3-ketosteroid Δ 1-dehydrogenase enzymes in *Gordonia neofelifaecis* NRRL B-59395 with preferences for different steroids. *Ann Microbiol*. 2015;65:1961–1971.

52. Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*. 2001;409:258–68.

53. Zhang W, Shao M, Rao Z, Xu M, Zhang X, Yang T, et al. Bioconversion of 4-androstene-3,17-dione to androst-1,4-diene-3,17-dione by recombinant *Bacillus subtilis* expressing ksdd gene encoding 3-ketosteroid- Δ 1-dehydrogenase from *Mycobacterium neoaurum* JC-12. *J Steroid Biochem Mol Biol*. Elsevier Ltd; 2013;135:36–42.

54. Fernandes P, Cruz A, Angelova B, Pinheiro HM, Cabral JMS. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme Microb Technol*. 2003;32:688–705.

55. Xu L, Liu Y, Yao K, Liu H, Tao X, Wang F, et al. Unraveling and engineering the production of 23,24-bisnorcholesterol steroids in sterol metabolism. *Sci Rep*. 2016;6:1–13.

56. Rohman A, Dijkstra BW. Application of microbial 3-ketosteroid Δ 1-dehydrogenases in biotechnology. *Biotechnol Adv*. Elsevier Inc.; 2021;49:107751.

57. Lammers T, Sofias AM, Meel R Van Der, Schiffelers R, Storm G, Tacke F, et al. Dexamethasone nanomedicines for COVID-19. *Nat Nanotechnol*. 2020;15:622–624.

58. The RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021;384:693–704.

59. Pagani O, Regan MM, Walley BA, Fleming GF, Colleoni M, Láng I, et al. Adjuvant Exemestane with Ovarian Suppression in Premenopausal Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2014;371:107–18.

60. Bunim JJ, Pechet MM, Bollet AJ. Studies on metacortandralone and metacortandracin in rheumatoid arthritis; antirheumatic potency, metabolic effects, and hormonal properties. *J Am Med Assoc*. 1955;157:311–8.

61. Samuel S, Nguyen T, Choi HA. Pharmacologic Characteristics of Corticosteroids. *J Neurocritical Care*. 2017;10:53–9.

62. Van Der Geize R, Hessels GI, Van Gerwen R, Van Der Meijden P, Dijkhuizen L.

Unmarked gene deletion mutagenesis of *kstD*, encoding 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenase, in *Rhodococcus erythropolis* SQ1 using *sacB* as counter-selectable marker. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;205:197–202.

63. Griffin JE, Gawronski JD, Dejesus MA, Ioerger TR, Akerley BJ, Sassetti CM. High-Resolution Phenotypic Profiling Defines Genes Essential for Mycobacterial Growth and Cholesterol Catabolism. *PLOS Pathog.* 2011;7:1–9.

64. Brzostek A, Pawelczyk J, Rumijowska-galewicz A, Dziadek B, Dziadek J. Mycobacterium tuberculosis Is Able To Accumulate and Utilize Cholesterol. *J Bacteriol.* 2009;191:6584–91.

65. Brzezinska M, Szulc I, Brzostek A, Klink M, Kielbik M, Sulowska Z. The role of 3-ketosteroid 1(2)-dehydrogenase in the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Microbiol.* 2013;13:1–12.

66. D'Arcy BM, Swingle MR, Schambea L, Pannell L, Prakash A, Honkanen RE. Development of a Synthetic for the Generation of a Novel Catabolic Pathway Enabling Cholesterol Degradation in Human Cells. *Sci Rep.* 2019;9:1–17.

67. Agnello EJ, Laubach GD. The Dehydrogenation of Corticosteroids with Chloranil. *J Am Chem Soc.* 1960;3:4293–9.

68. Chen K, Liu C, Deng L, Xu G. A practical 1-dehydrogenation of 4-3-keto-steroids with DDQ in the presence of TBDMSCl at room temperature. *Steroids.* Elsevier Inc.; 2010;75:513–6.

69. Iida T, Omura K, Sakiyama R, Kodomari M. Regioselective dehydrogenation of 3-ketosteroids to form conjugated enones using *o*-iodoxybenzoic acid and trifluoroacetic acid catalysis. *Chem Phys Lipids.* 2014;178:45–51.

70. Malaviya A, Gomes J. Androstenedione production by biotransformation of phytosterols. *Bioresour Technol.* 2008;99:6725–37.

71. Pabón A, Escobar G, Vargas E, Cruz V, Notario R, Blair S, et al. Diosgenone synthesis, anti-malarial activity and QSAR of analogues of this natural product. *Molecules.* 2013;18:3356–78.

72. Loughlin WA. Biotransformations in organic synthesis. *Bioresour Technol.* 2000;74:49–62.

73. Herráiz I. Chemical Pathways of Corticosteroids, Industrial Synthesis from Sapogenins. *Microb Steroids Methods Mol Biol.* Humana Press, New York, NY; 2017. p. 15–26.

74. Kondo E, Masuo E. 'Pseudo-crystallofermentation' of steroid: a new process for preparing prednisolone by a microorganism. *J Gen Appl Microbiol*. 1961;7:113–7.
75. Kondo E. Steroid 1-Dehydrogenation by a Crude Enzyme Preparation from *Arthrobacter simplex*. *Agric Biol Chem*. 1963;27:69–70.
76. Li J, Guan Y, Wang H, Yao S. 17-epoxyprogesterone by encapsulated *Arthrobacter simplex* cells in an aqueous/organic solvent two-liquid-phase system. *J Chem Technol Biotechnol*. 2009;84:208–14.
77. Luo J, Cui H, Jia H, Li F, Cheng H, Shen Y, et al. Identification, Biological Characteristics, and Active Site Residues of 3-Ketosteroid Δ^1 -Dehydrogenase Homologues from *Arthrobacter simplex*. *J Agric Food Chem*. 2020;69:9496–512.
78. Stefanov S, Yankov D, Beschkov V. Biotransformation of Phytosterols to Androstenedione in Two Phase Water-oil Systems. *Chem Biochem Eng Q*. 2006;20:421–427.
79. Hesselink PGM, Vliet S Van, Vries H De, Witholt B. Optimization of steroid side chain cleavage by *Mycobacterium* sp. in the presence of cyclodextrins. *Enzyme Microb Technol*. 1989;11:398–404.
80. Manosroi A, Saowakhon S, Manosroi J. Enhancement of androstadienedione production from progesterone by biotransformation using the hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complexation technique. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;108:132–6.
81. Wang M, Zhang L, Shen Y, Ma Y, Zheng Y, Luo J. Effects of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on steroids 1-en-dehydrogenation biotransformation by *Arthrobacter simplex* TCCC 11037. *J Mol Catal B Enzym*. 2009;59:58–63.
82. Zhang L, Wang M, Shen Y, Ma Y, Luo J. Improvement of Steroid Biotransformation with Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin Induced Complexation. *Appl Biochem Biotechnol*. 2009;159:642–54.
83. Itagaki E, Hatta T, Wakabayashi T, Suzuki K. Spectral properties of 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase from *Nocardia corallina*. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol*. 1990;1040:281–6.
84. Jeon SJ, Shin IH, Sang BI, Park DH. Electrochemical regeneration of FAD by catalytic electrode without electron mediator and biochemical reducing power. *J Microbiol Biotechnol*. 2005;15:281–286.
85. Shao M, Sha Z, Zhang X, Rao Z, Xu M, Yang T, et al. Efficient androst-1,4-diene-3,17-

dione production by co-expressing 3-ketosteroid- Δ 1-dehydrogenase and catalase in *Bacillus subtilis*. *J Appl Microbiol*. 2016;122:119–28.

86. Schneier M, Razdan S, Miller AM, Briceno ME. Current technologies to endotoxin detection and removal for biopharmaceutical purification. *Biotechnol Bioeng*. 2020;117:2588–609.

87. El-hadi AA. Factors affecting the production of prednisolone by immobilization of *Bacillus pumilus* E601 cells in poly (vinyl alcohol) cryogels produced by radiation polymerization. *Process Biochem*. 2003;38:1659–64.

88. Wang W, Ge F, Ma C, Li J, Ren Y, Li W, et al. Heterologous expression and characterization of a 3-ketosteroid- Δ 1-dehydrogenase from *Gordonia neofelifaecis* and its utilization in the bioconversion of androst-4,9(11)-dien-3,17-dione. *3 Biotech*. 2017;7:1–9.

89. Mao S, Chen Y, Sun J, Wei C, Song Z, Lu F, et al. Enhancing the sustainability of KsdD as a biocatalyst for steroid transformation by immobilization on epoxy support. *Enzyme Microb Technol*. 2021;146:109777.

90. Plapp B V. Site-directed mutagenesis: a tool for studying enzyme catalysis. *Methods Enzymol*. 1995;249:91–119.

91. Wagner CR, Benkovic SJ. Site directed mutagenesis: a tool for enzyme mechanism dissection. *Trends Biotechnol*. 1990;8:263–70.

92. Carrigan PE, Ballar P, Tuzmen S. Site-directed mutagenesis. *Dis Gene Identification Methods Protoc*. Humana Press, New York, NY; 2011. p. 107–12.

93. Hsieh P, Vaisvila R. Protein Engineering: Single or Multiple Site-Directed Mutagenesis. *Enzym Eng Methods Protoc*. Humana Press, New York, NY; 2013. p. 173–5.

94. Copeland RA. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2nd Edition. Wiley-VCH; 2000.

95. Henri V. Über das Gesetz der Wirkung des Invertins. *Zeitschrift für Phys Chemie*. 1902;39U:194–216.

96. Segel IH. *Enzyme Kinetics*. *Encycl Biol Chem*. Elsevier Inc.; 2013. p. 216–20.

97. Punekar NS. ES Complex and Pre-steady-state Kinetics. *Enzym Catal Kinet Mech*. Springer, Singapore; 2018. p. 107–14.

98. Gadda G, Sobrado P. Kinetic Solvent Viscosity Effects as Probes for Studying the Mechanisms of Enzyme Action. *Biochemistry*. 2018;57:3445–3453.

99. Weber S, Walker JM. *Flavins and Flavoproteins Methods and Protocols*. Humana Press, New York, NY; 2014.
100. Gu H, Zhang S. Advances in Kinetic Isotope Effect Measurement Techniques for Enzyme Mechanism Study. *Molecules*. 2013;18:9278–92.
101. Cleland WW. The use of isotope effects to determine enzyme mechanisms. *Arch Biochem Biophys*. 2005;433:2–12.
102. Kramers HA. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica*. 1940;7:284–304.
103. Heyes DJ, Levy C, Sakuma M, Robertson DL, Scrutton NS. A Twin-track Approach Has Optimized Proton and Hydride Transfer by Dynamically Coupled Tunneling during the Evolution of Protochlorophyllide Oxidoreductase. *J Biol Chem*. 2011;286:11849–54.
104. Romero E, Hamelberg D, Gadda G. Solvent-Slaved Motions in the Hydride Tunneling Reaction Catalyzed by Human Glycolate Oxidase. *ACS Catal*. 2016;6:2113–2120.
105. Kyushikil H, Ikai A. The Effect of Solvent Viscosity on the Rate-Determining Step of Fatty Acid Synthetase. *PROTEINS Struct Funct Genet*. 1990;8:287–93.
106. Sekhar A, Latham MP, Vallurupalli P, Kay LE. Viscosity-Dependent Kinetics of Protein Conformational Exchange: Microviscosity Effects and the Need for a Small Viscogen. *J Phys Chem B*. 2014;118:4546–4551.
107. Sashi P, Bhuyan AK. Viscosity Dependence of Some Protein and Enzyme Reaction Rates: Seventy-Five Years after Kramers. *Biochemistry*. 2015;54:4453–4461.
108. Sofińska K, Wojtkiewicz AM, Wójcik P, Zastawny O, Guzik M, Winiarska A, et al. Investigation of quaternary structure of aggregating 3-ketosteroid dehydrogenase from *Sterolibacterium denitrificans*: In the pursuit of consensus of various biophysical techniques. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2019;1863.
109. Aliverti A, Curti B, Vanoni MA. Identifying and quantitating FAD and FMN in simple and in iron-sulfur-containing flavoproteins. *Methods Mol Biol*. 1999;131:9–23.
110. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;7:248–54.
111. Oxford Diffraction, 2006. *CrysAlis Pro* Oxford Diffraction Ltd, Version 1.171.36.20 (release 27-06-2012 CrysAlis171.NET), Abingdon, England.
112. Kabsch W. XDS. *Acta Crystallogr Sect D*. 2010;66:125–32.

113. Adams PD, Pavel V, Chen VB, Ian W, Echols N, Moriarty NW, et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2010;66:213–21.
114. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2011;67:235–42.
115. Murshudov GN, Skubák P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, et al. REFMAC 5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2011;67:355–67.
116. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2010;66:486–501.
117. Chen VB, Arendall III WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2009;66:12–21.
118. Young JY, Westbrook JD, Feng Z, Sala R, Peisach E, Oldfield TJ, et al. OneDep: Unified wwPDB System for Deposition , Biocuration , and Validation of Macromolecular Structures in the PDB Archive. *Structure*. Elsevier Ltd.; 2017;25:536–45.
119. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.
120. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera — A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J Comput Chem*. 2004;25:1605–12.
121. BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio, v21.1.0.20298, San Diego: Dassault Systèmes, 2021.
122. Lomize MA, Pogozheva ID, Joo H, Mosberg HI, Lomize AL. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:370–6.
123. Forneris F, Orru R, Bonivento D, Chiarelli LR, Mattevi A. ThermoFAD, a ThermoFluor®-adapted flavin ad hoc detection system for protein folding and ligand binding. *FEBS J*. 2009;276:2833–40.
124. Dijkman WP, Gonzalo G De, Mattevi A, Fraaije MW. Flavoprotein oxidases classification and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97:5177–88.
125. Ma YH, Wang M, Fan Z, Shen YB, Zhang LT. The influence of host-guest inclusion

complex formation on the biotransformation of cortisone acetate Δ 1-dehydrogenation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009;117:146–51.

126. Martin del Valle EM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* 2004;39:1033–46.

127. Loftsson T, Magnúsdóttir A, Másson M, Sigurjónsdóttir JF. Self-Association and Cyclodextrin Solubilization of Drugs. *J Pharm Sci.* 2002;91:2307–16.

128. Rugor A, Wójcik-Augustyn A, Niedzialkowska E, Mordalski S, Staroń J, Bojarski A, et al. Reaction mechanism of sterol hydroxylation by steroid C25 dehydrogenase – Homology model, reactivity and isoenzymatic diversity. *J Inorg Biochem.* 2017;173:28–43.

129. Shapiro AL, Viñuela E, Maizel Jr J V. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun.* 1967;28:815–20.

130. Bhat EA, Abdall M, Rather I. Key Factors for Successful Protein Purification and Crystallization. *Glob J Biotechnol Biomater Sci.* 2018;4:1–7.

131. Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins , lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2004;1666:105–17.

132. Dym O, Eisenberg D. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci.* 2001;10:1712–28.

133. Kyte J, Doolittle RF. A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein. *J Mol Biol.* 1982;157:105–32.

134. Johnson JE, Cornell RB. Amphitropic proteins: regulation by reversible membrane interactions. *Mol Membr Biol.* 1999;16:217–35.

135. Kreit J, Sampson NS. Cholesterol oxidase: physiological functions. *FEBS J.* 2009;276:6844–56.

136. Ksenzhek OS, Petrova SA, Kolodyazhny M V. Electrochemical properties of some redox indicators. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* 1977;4:346–57.

137. O'Reilly JE. Oxidation-reduction potential of the ferro-ferricyanide system in buffer solutions. *Biochim Biophys Acta.* 1973;292:509–15.

138. Sanderson DG, Gross EL, Seibert M. A photosynthetic photoelectrochemical cell using phenazine methosulfate and phenazine ethosulfate as electron acceptors. *Appl Biochem Biotechnol.* 1987;14:1–20.

139. van den Heuvel RHH, Fraaije MW, van Berkel WJH. Redox properties of vanillyl-

- alcohol oxidase. *Methods Enzymol.* 2002;353:177–86.
140. Jahn B, Jonasson NSW, Hu H, Singer H, Pol A, Good NM, et al. Understanding the chemistry of the artificial electron acceptors PES, PMS, DCPIP and Wurster's Blue in methanol dehydrogenase assays. *J Biol Inorg Chem.* 2020;25:199–212.
141. Wojtkiewicz AM, Wójcik P, Procner M, Flejszar M, Oszejca M, Hochołowski M, et al. The efficient Δ^1 -dehydrogenation of a wide spectrum of 3-ketosteroids in a broad pH range by 3-ketosteroid dehydrogenase from *Sterolibacterium denitrificans*. *J Steroid Biochem Mol Biol. Elsevier;* 2020;202:105731.
142. Wójcik P, Glanowski M, Wojtkiewicz AM, Rohman A, Szaleniec M. Universal capability of 3- ketosteroid Δ^1 dehydrogenases to catalyze Δ^1 - dehydrogenation of C17- substituted steroids. *Microb Cell Fact.* 2021;20:1–12.
143. D'Souza VT, Lipkowitz KB. Cyclodextrins : Introduction. *Chem Rev.* 1998;98:1741–2.
144. Williams III RO, Mahaguna V, Sriwongjanya M. Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm.* 1998;46:355–60.
145. Glanowski M, Wójcik P, Procner M, Borowski T, Lupa D, Mielczarek P, et al. Enzymatic Δ^1 -Dehydrogenation of 3-Ketosteroids—Reconciliation of Kinetic Isotope Effects with the Reaction Mechanism. *ACS Catal.* 2021;11:8211–8225.
146. Ghosh R, Quayle JR. Phenazine ethosulfate as a preferred electron acceptor to phenazine methosulfate in dye-linked enzyme assays. *Anal Biochem.* 1979;99:112–7.
147. Quan H-J, Koyanagi J, Ohmori K, Uesato S, Tsuchido T, Saito S. Preparations of heterospirostanols and their pharmacological activities. *Eur J Med Chem.* 2002;37:659–69.

Dorobek naukowy

Staż zagraniczne:

- 08.11.2021 - Pharmadox Healthcare Ltd., Paola, Malta, staż naukowy finansowany ze
17.12.2021 środków programu NCBR POWR.03.02.00-00-I013/16
- 22.03.2019 - Department of Molecular Physiology and Biological Physics, University of
18.04.2019 Virginia, Charlottesville, VA, Stany Zjednoczone, staż naukowy
finansowany ze środków programu NAWA PROM
PPI/PRO/2018/1/00006/U/001
- 17.11.2018 - Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, University
21.12.2018 of Groningen, Groningen, Holandia, staż naukowy finansowany ze
środków programu NCBR POWR.03.02.00-00-I013/16
- 04.07.2016 - Centre for Research in Agriculture Genomics, Universitat Autònoma de
22.09.2016 Barcelona, Barcelona, Hiszpania, staż naukowy finansowany ze środków
programu ERASMUS+
- 22.06.2015 - Max F. Perutz Laboratories, Medical University of Vienna Wiedeń,
22.09.2015 Austria, staż naukowy finansowany ze środków programu ERASMUS+

Kursy i szkolenia:

- 19.09.2021 - V Akademia Chemii Analitycznej, Spektrometria mas w chromatografii
22.09.2021 cieczerwowej – praktyczne zastosowania, SHIM-POL
- 05.03.2021 HPLC Basic Method Development & Column Selection CUST-ALL-1000v,
Agilent Technologies
- 24.10.2019 - ACTA User Day 2019 - Trends in protein purification, GE Healthcare
25.10.2019 (Cytiva)
- 24.10.2018 - ACTA User Day 2018 - Pure proteins today. Powerful results tomorrow,
25.10.2018 GE Healthcare (Cytiva)

Publikacje:

- 2021** 1) **P. Wójcik**, M. Glanowski, A. M. Wojtkiewicz, A. Rohman, M. Szaleniec,
Universal capability of 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenases to catalyze Δ^1 -dehydrogenation of C17-substituted steroids, *Microb. Cell Fact.*, 20
(2021) 119*

- 2) M. Glanowski, **P. Wójcik**, M. Procner, T. Borowski, D. Lupa, P. Mielczarek, M. Oszajca, K. Świderek, V. Moliner, A. J. Bojarski, M. Szaleniec, *Enzymatic Δ^1 -Dehydrogenation of 3-Ketosteroids - Reconciliation of Kinetic Isotope Effects with the Reaction Mechanism*, ACS Catal., 11 (2021) 8211–8225
- 3) E. Stepinac, N. Landrein, D. Skwarzyńska, **P. Wójcik**, J. Lesigang, I. Lučić, C. Y. He, M. Bonhivers, D. R. Robinson, G. Dong, *Structural studies of a novel extended synaptotagmin with only two C2 domains from Trypanosoma brucei*, iScience, 24 (2021) 102422**
- 2020** 4) M. Wojtkiewicz, **P. Wójcik**, M. Procner, M. Flejszar, M. Oszajca, M. Hochołowski, M. Tataruch, B. Mrugała, T. Janeczko, M. Szaleniec, *The efficient Δ^1 -dehydrogenation of a wide spectrum of 3-ketosteroids in a broad pH range by 3-ketosteroid dehydrogenase from Sterolibacterium denitrificans*, J. Steroid Biochem., 202 (2020) 105731*
- 5) M. Tataruch, **P. Wójcik**, A. M. Wojtkiewicz, K. Zaczyk, K. Szymańska, M. Szaleniec, *Application of Immobilized Cholest-4-En-3-One Δ^1 -Dehydrogenase from Sterolibacterium Denitrificans for Dehydrogenation of Steroids*, Catalyst, 10 (2020) 1460
- 2019** 6) K. Sofińska, A. M. Wojtkiewicz, **P. Wójcik**, O. Zastawny, M. Guzik, A. Winiarska, P. Waligórski, M. Cieśla, J. Barbasz, M. Szaleniec, *Investigation of quaternary structure of aggregating 3-ketosteroid dehydrogenase from Sterolibacterium denitrificans: In the pursuit of consensus of various biophysical techniques*, BBA - Gen. Subjects, 1863 (2019) 1027-1039

* publikacje pierwszoautorskie

** publikacje niezwiązane z rozprawą doktorska

Zgłoszenia patentowe:

- 2020** 1) **P. Wójcik**, A. M. Wojtkiewicz, M. Tataruch, J. Morzycki, M. Szaleniec, *Sposób wytwarzania (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu z diosgenonu*, Polish Patent Application P.433249 (13.03.2020)

Konferencje naukowe:

- 2021** 1) 63 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Łódź 13–17.09.2021, M. Glanowski, **P. Wójcik**, M. Procner, M. Oszajca, K. Świderek, V. Moliner, A. J. Bojarski, M. Szaleniec, *Dehydrogenazy 3-ketosteroidowe – modelowanie QMMM skonfrontowane z pomiarami kinetycznego efektu izotopowego*
- 2) 63 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Łódź 13–17.09.2021, M. Tataruch, K. Zaczyk, **P. Wójcik**, A. M. Wojtkiewicz, K. Szymańska, M. Szaleniec, *Efektywność procesów reaktorowych z zastosowaniem immobilizowanej Δ^1 -dehydrogenazy-3-ketosteroidowej*

- 3) 15th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, Graz 19–22.07.2021, **P. Wójcik**, B. Mrugała, M. Glanowski, M. Prochner, K. Kurpiewska, O. Zastawny, M. Guzik, M. Oszejca, M. Szaleniec, plakat pt. *Δ^1 -Dehydrogenation of 3-ketosteroids by 3-ketosteroid dehydrogenase from Sterolibacterium denitrificans – structural and mechanistic studies*
- 4) International Conference on Theoretical Aspects of Catalysis, Lyon 13, 22, 30.06.2021, M. Glanowski, **P. Wójcik**, M. Prochner, M. Oszejca, K. Świderek, V. Moliner, A. J. Bojarski, M. Szaleniec, plakat pt. *QM/MM modeling of enzymatic Δ^1 -dehydrogenation of 3-ketosteroids and validation by kinetic isotope effects*
- 2020**
- 5) 52 Ogólnopolskie Kolokwium Katalityczne, Kraków 25–27.11.2020, A. M. Wojtkiewicz, M. Tataruch, K. Zaczyk, **P. Wójcik**, K. Szymańska, M. Szaleniec, wystąpienie ustne pt. *Porównanie procesów reaktorowych z zastosowaniem immobilizowanej i homogenicznej Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowej*
- 6) 52 Ogólnopolskie Kolokwium Katalityczne, Kraków 25–27.11.2020, M. Prochner, **P. Wójcik**, M. Szaleniec, G. Bailleul, M. Fraaije, M. Oszejca, R. van Eldik, wystąpienie ustne pt. *Stopped-flow technique for mechanistic studies of catalytic reactions*
- 7) 52 Ogólnopolskie Kolokwium Katalityczne, Kraków 25–27.11.2020, M. Glanowski, **P. Wójcik**, M. Prochner, M. Szaleniec, A. Bojarski, K. Świderek, V. Moliner, wystąpienie ustne pt. *Modeling of oxidative 1-dehydrogenation catalyzed by 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenases*
- 8) 52 Ogólnopolskie Kolokwium Katalityczne, Kraków 25–27.11.2020, **P. Wójcik**, B. Mrugała, M. Glanowski, O. Zastawny, A. M. Wojtkiewicz, K. Kurpiewska, E. Niedziałkowska, W. Minor, M. Szaleniec, wystąpienie ustne pt. *Investigation of the structure and the reaction mechanism of the 3-ketosteroid dehydrogenase from Sterolibacterium denitrificans for further application to the biosynthesis of pharmaceuticals*
- 2019**
- 9) Trends in Enzyme Catalysis: Merging theory and experiment, Benicassim 28–29.10.19, M. Szaleniec, **P. Wójcik**, M. Glanowski, A. M. Wojtkiewicz, M. Prochner, B. Mrugała, O. Zastawny, M. Guzik, E. Niedziałkowska, W. Minor, K. Świderek, V. Moliner, wystąpienie ustne pt. *Combining kinetic studies with theoretical modeling – case study for ketosteroid dehydrogenases*
- 10) Summer School of Chemical Biology, Hirschegg 01–06.09.2019, M. Szaleniec, **P. Wójcik**, M. Glanowski, A. M. Wojtkiewicz, M. Prochner, B. Mrugała, O. Zastawny, M. Guzik, E. Niedziałkowska, W. Minor, K. Świderek, V. Moliner, wystąpienie ustne pt. *Combining kinetic studies with theoretical modeling – case study for ketosteroid dehydrogenases*

- 11) Workshop on data collection and structure solving in macromolecular X-ray diffraction, Kraków 12–16.07.2019, **P. Wójcik**, B. Mrugała, M. Glanowski, E. Niedziałkowska, A. M. Wojtkiewicz, W. Minor, M. Szaleniec, plakat pt. *Optimization of membrane flavoprotein purification and crystallization conditions*
- 12) 14th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, Groningen 07–11.07.2019, M. Szaleniec, **P. Wójcik**, M. Glanowski, A. M. Wojtkiewicz, M. Flejszar, M. Hochołowski, O. Zastawny, M. Guzik, plakat pt. *Biocatalytic dehydrogenation of steroids by cholest-4-en-3-one Δ^1 -dehydrogenase - mechanistic study and examples of application*
- 13) 14th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, Groningen 07–11.07.2019, **P. Wójcik**, A. M. Wojtkiewicz, O. Zastawny, M. Sroczyk, M. Guzik, E. Romero, M. W. Fraaije, M. Szaleniec, plakat pt. *Cholest-4-en-3-one Δ^1 -dehydrogenase from Sterolibacterium denitrificans – investigation of reaction mechanism*
- 14) 23rd West Coast Structural Biology Workshop, Pacific Grove 17–20.03.2019, **P. Wójcik**, B. Mrugała, M. Glanowski, C. Martin, G. Bailleul, A. M. Wojtkiewicz, M. W. Fraaije, M. Szaleniec, plakat pt. *Optimization of aggregating flavoprotein expression and purification*
- 15) LI Ogólnopolskie Kolokwium Katalityczne, Kraków 20–22.03.2019, A. M. Wojtkiewicz, K. Sofińska, **P. Wójcik**, O. Zastawny, A. Winiarska, P. Waligórski, J. Barbasz, M. Szaleniec, plakat pt. *Badania agregacji dehydrogenazy 3-ketosteroidowej z S. denitrificans*
- 16) LI Ogólnopolskie Kolokwium Katalityczne, Kraków 20–22.03.2019, M. Szaleniec, **P. Wójcik**, A. M. Wojtkiewicz, M. Flejszar, O. Zastawny, M. Guzik, E. Romero, M. W. Fraaije, wystąpienie ustne pt. *Biocatalytic oxidative dehydrogenation of steroids by 3-ketosteroid dehydrogenase from Sterolibacterium denitrificans*
- 2018** 17) 61 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Kraków 17–21.09.2018, M. Szaleniec, **P. Wójcik**, A. M. Wojtkiewicz, M. Sroczyk, M. Oszejca, plakat pt. *Regioselektywne odwodornienie steroidów anaboliczno-androgennych*
- 18) 9th International Congress on Biocatalysis, Hamburg 26–30.08.2018, A. M. Wojtkiewicz, **P. Wójcik**, M. Sroczyk, M. Oszejca, K. Sofińska, J. Barbasz, O. Zastawny, M. Guzik, E. Romero, M. W. Fraaije, M. Szaleniec, wystąpienie ustne pt. *Aggregating flavoprotein as a catalyst for 1-dehydro-3-ketosteroids production*
- 19) 9th International Congress on Biocatalysis, Hamburg 26–30.08.2018, **P. Wójcik**, M. Glanowski, A. M. Wojtkiewicz, A. Winiarska, M. Szaleniec, plakat pt. *Cholest-4-en-3-one Δ^1 -dehydrogenase – a biocatalyst for regioselective dehydrogenation of steroids*

- 20) 4th Symposium on Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetic Industry, Trzebnica 25–27.06.2018, D. Gillner, M. Przypis, D. Kowalczykiewicz, **P. Wójcik**, K. Matuszek, A. Chrobok, K. Szymańska, A. Jarzębski, wystąpienie ustne pt. *Chemical and enzymatic methods for the synthesis of levulinic acid esters*
- 21) 4th Symposium on Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetic Industry, Trzebnica 25–27.06.2018, **P. Wójcik**, A. M. Wojtkiewicz, M. Sroczyk, O. Zastawny, M. Oszejca, E. Romero, M. W. Fraaije, M. Szaleniec, wystąpienie ustne pt. *Cholest-4-en-3-one Δ^1 -dehydrogenase – a new tool for anabolic steroids production*
- 22) Modeling and Design of Molecular Materials 2018, Polanica Zdrój 24–28.06.2018, A. M. Wojtkiewicz, M. Glanowski, **P. Wójcik**, S. Mordalski, A. J. Bojarski, M. Szaleniec, plakat pt. *3-Ketosteroid Δ^1 -dehydrogenases – comparative analysis of homology models and calculations of ODH reaction mechanism*
- 23) International Conference on Catalysis and Surface Chemistry, Kraków, 18–23.03.2018, **P. Wójcik**, A. M. Wojtkiewicz, M. Sroczyk, M. Oszejca, E. Romero, M. W. Fraaije, M. Szaleniec, wystąpienie ustne pt. *Catalytic characterisation of cholest-4-en-3-one Δ^1 -dehydrogenase, a catalyst for anabolic steroids production*