

Patrycja Wójcik

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

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 formulation the hypotheses 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

Patrycja Wójcik

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 development of an efficient, Acmb-catalyzed process for the synthesis of Δ^1 -3-ketosteroids. The aim of this part of the work was to perform the large-scale synthesis of the pharmacologically active Δ^1 -3-ketosteroids, including Δ^1 -diosgenone – a 3-ketosteroid saponin derivate, which exhibits biocidal, anti-inflammatory and anticancer properties and which enzymatic Δ^1 -dehydrogenation has not been previously described in the literature.

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.