



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

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

Michał Glanowski

**Modelowanie mechanizmu reakcji
bakteryjnych dehydrogenaz
ketosteroidowych – katalizatorów
do modyfikacji leków steroidowych**

Praca doktorska

Prof. dr hab. Maciej Szaleniec

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

Prof. dr hab. Andrzej J. Bojarski

**Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

KRAKÓW 2023

Streszczenie pracy doktorskiej mgr inż. Michała Glanowskiego

Δ^1 -Dehydrogenazy 3-ketosteroidowe (Δ^1 -KSTD) to klasa enzymów katalizujących odwracalną reakcję wprowadzenia wiązania podwójnego między pozycje C1 i C2 3-ketosteroli. Są one badane już od lat 60-tych XX wieku, jednakże do chwili obecnej nie przeprowadzono modelowania katalizowanej przez nich reakcji odwodornienia.

Niniejsza rozprawa, wypełniająca tę lukę, wykorzystuje metody chemii obliczeniowej do analizy właściwości katalitycznych Δ^1 -KSTD. Badania przeprowadzono w oparciu o dwie dostępne struktury krystaliczne Δ^1 -KSTD, tj. pochodzące z bakterii *Rhodococcus erythropolis* (KSTD1) oraz *Sterolibacterium denitrificans* (AcmB).

Poprzez symulacje dynamiki molekularnej z różnymi substratami przeanalizowano wiązanie różnych ketosteroidów do centrum aktywnego Δ^1 -KSTD. Dla wszystkich analizowanych cząsteczek (w tym również dla takich, które zawierały rozbudowane podstawniki w pozycji C17) uzyskano zbliżone wartości oszacowanej entalpii swobodnej wiązania. Te dane zasugerowały, że taki substrat jak cholest-4-en-3-on powinien ulegać dehydrogenacji z KSTD1, wbrew doniesieniom literaturowym wykazującym na brak konwersji tego substratu. Przewidywana aktywność enzymatyczna została ostatecznie potwierdzona doświadczalnie pod wpływem przeprowadzonych obliczeń.

Obliczenia QM:MM MD potwierdziły mechanizm dehydrogenacji zaproponowany w literaturze i dostarczyły dodatkowych informacji na jego temat. Zweryfikowano kwestię stanu protonacyjnego jednej z tyrozyn w centrum aktywnym i dowiedziono, że jej istnienie w postaci jonu tyrozylowego jest kluczowe dla reaktywności enzymu. Jest to szczególnie interesujące, ze względu na potwierdzoną eksperymentalnie aktywność niektórych Δ^1 -KSTD w nieznacznie kwasowym pH.

Szczególnie istotnym punktem pracy było obliczenie wartości kinetycznego efektu izotopowego i ich porównanie z wynikami otrzymanymi eksperymentalnie. Pozwoliło to na wyjaśnienie dotychczasowych, pozornych sprzeczności dotyczących mechanizmu reakcji katalizowanej przez Δ^1 -KSTD. W literaturze postulowano, że reakcja przebiega dwuetapowo, a drugi krok reakcji jest procesem limitującym szybkość reakcji procesu redukcji enzymu przez substrat. Jednocześnie obserwowano znaczące wartości kinetycznego efektu izotopowego, niezależnie od tego, czy związki były deuterowane w pozycji, na którą jest czuły pierwszy czy drugi etap reakcji. Wyjaśnieniem tego zjawiska okazał się oszacowany profil entalpii

swobodnej reakcji: energie stanów przejściowych są na tyle blisko siebie, aby obydwa etapy miały istotny wpływ na wypadkową szybkość całego procesu.

W przypadku Acmb dokonano analizy wpływu mutacji kluczowych aminokwasów w centrum aktywnym na profil energetyczny reakcji. Uzyskany trend jest w zgodzie z eksperymentalnymi pomiarami aktywności i ukazuje rolę poszczególnych wiązań wodorowych w otoczeniu substratu w procesie katalitycznym.

Ponadto zbadano rolę tak zwanej „pętli”, czyli 50-cio aminokwasowego fragmentu występującego w Acmb oraz wielu innych KSTD, który po rozwiązaniu struktury okazał się domeną wiążącą się do membrany. Fragment ten nie tylko wiąże enzym do membrany, ale oddziałuje z różnymi substratami, szczególnie tymi podstawionymi w pozycji C17. Dzięki temu Acmb wykazuje większe powinowactwo względem substratów takich jak cholest-4-en-3-on niż takich jak progesteron. Na koniec przeprowadzono obliczenia wyjaśniające enancjoselektywność aktywacji steroidu.

Abstract of the doctoral thesis of mgr inż. Michał Glanowski

The 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenases (Δ^1 -KSTD) are a class of enzymes that catalyze the reversible reaction of dehydrogenation, introducing a double bond between the C1 and C2 positions of 3-ketosterols. Although they have been studied since the 60's of the XXth century, their catalytic mechanism has not been described by modeling approach.

This dissertation fills the gap by using computational chemistry methods to analyze the catalytic properties of Δ^1 -KSTD. The research was conducted based on two available crystal structures of Δ^1 -KSTD, i.e., from bacteria *Rhodococcus erythropolis* (KSTD1) and *Sterolibacterium denitrificans* (AcmB).

The binding of different ketosteroids to the active site of Δ^1 -KSTD was studied by means of molecular dynamics simulations. For every analyzed molecule (including those with extended substituents in the C17 position), similar values of estimated binding free energy were obtained. These data suggested that substrates like cholest-4-ene-3-dione should be dehydrogenated by KSTD1, contrary to literature reports indicating a lack of conversion of this substrate. Prompted by modeling predictions, the enzymatic activity was finally confirmed experimentally.

QM:MM MD calculations confirmed the mechanism of dehydrogenation proposed in the literature and delivered additional mechanistic details. The protonation state of one of the tyrosines at the active site was verified. It was proved that its deprotonated state is a crucial factor for enzyme activity. It is especially interesting due to the experimentally confirmed activity of some Δ^1 -KSTD from *S. denitrificans* at slightly acidic pH.

One of the most relevant points of the dissertation was the calculation of the kinetic isotopic effect and the comparison with experimentally measured values. This allowed for an explanation of apparent contradictions related to the mechanism of the reaction catalyzed by Δ^1 -KSTD. According to the literature, the reaction proceeds in two steps, with the second being a rate-limiting process of the reduction of the enzyme by a substrate. Simultaneously, significant values of the kinetic isotopic effect were observed for substrates deuterated in the position for which the first step is sensitive, as well as for isotopic substitution in a position related to the second one. An explanation for this phenomenon is the estimated free energy profile of the process: the free energies of both transition states are close enough to each other for both processes to influence the overall rate of the reaction.

In the case of Acmb, the effect of mutations of the key amino acids in the active site on the reaction profile was analyzed. The obtained trend is in agreement with experimental activity measurements and demonstrates the importance of each hydrogen bond in substrate surroundings in the catalytic process.

In addition, the role of the so-called 'loop', a 50-amino-acid fragment found in Acmb and many other Δ^1 -KSTDs was studied. After resolving of its structure it turned out to be a putative membrane-binding domain not a loop. This fragment binds the enzyme to the membrane and interacts with various substrates, especially those substituted at the C17 position. As a result, Acmb exhibits a higher affinity for substrates, such as cholest-4-en-3-one, than for others, such as progesterone. Finally, calculations were performed explaining the enantioselectivity of steroid activation.