

- 2016/21/B/ST4/03798 [2017-2020] Mechanizm regioselektywnego utleniającego odwodornienia 3-ketosteroidów przez dehydrogenazę D1-cholest-4-en-3-onu ze *Sterolibacterium denitrificans* – dr hab. M. Szaleniec, prof. IkiFP PAN

Steroidy to szeroka grupa cząsteczek chemicznych o charakterystycznej budowie cztero-pierścieniowej i zróżnicowanych funkcjach. Możemy wyróżnić steroidy pełniące funkcje budulcowe jak cholesterol w błonach biologicznych oraz funkcje regulatorowe jak decydujące o drugorzędowych cechach płciowych człowieka hormony steroidowe np. testosteron, progesteron i estrogeny. Bywa również, że steroidy stanowią podstawowe pożywienie dla mikroorganizmów jak bakterie jelitowe lub bakterie wyizolowane z osadów dennych. Wszechobecność i różnorodność funkcji steroidów w organizmie człowieka sprawia, że są one powszechnie wykorzystywane jako terapeutyki. Stosowane są w leczeniu wielu chorób, od astmy przez choroby autoimmunologiczne takie jak: choroba Leśniowskiego-Crohna czy reumatoidalne zapalenie stawów aż do chorób nowotworowych. W kontekście projektu na uwagę zasługują stosowane jako sterydowe leki przeciwzapalne popularne kortykosterydy oraz stosowane w schorzenia ch związanych m.in. ze spadkiem masy mięśniowej, androgenne sterydy anaboliczne. Te ostatnie wykorzystywane są również przez kulturystów czy sportowców jako niedozwolony doping.

Tak szeroki wachlarz stosowania steroidów powoduje duże zapotrzebowanie na ich produkcję. Chociaż współczesna chemia organiczna umożliwia syntezę wielu skomplikowanych pochodnych steroidowych, często są to metody technologicznie złożone, niezbyt przyjazne dla środowiska, a przez to drogie. Stąd potrzeba odkrywania nowych sposobów skutecznej i relatywnie niedrożej ich syntezy.

Z uwagi na prężnie rozwijający się przemysł biotechnologiczny, do produkcji wyżej wymienionych biologicznie aktywnych związków coraz częściej wykorzystuje się enzymy izolowane z bakterii lub wyspecjalizowane szczepy bakteryjne. Przykładem takiej aplikacji jest, stanowiąca obiekt naszych badań, $\Delta 1$ -dehydrogenaza 3-ketosteroidowa (AcmB), enzym pozyskiwany z wyizolowanej w oczyszczalni ścieków i wyspecjalizowanej w rozkładaniu cholesterolu bakterii *Sterolibacterium denitrificans*. Enzym ten może być wykorzystany do produkcji 1-dehydrosteroidów (m.in. androgenne sterydy anaboliczne oraz leki przeciw-zapalne). W każdym procesie technologicznym stosowany katalizator wymaga jednak dokładnego scharakteryzowania np. by zapewnić mu optymalne warunki działania. Podobnie jest z bio-katalizatorami, dla których kompleksowa charakterystyka obejmuje z jednej strony poznanie ich białkowej struktury, począwszy od budowy centrum aktywnego aż do złożonej struktury czwartorzędowej białka, z drugiej zaś obejmuje badanie właściwości katalitycznych tj. określenie optimum temperaturowego, pH, siła jonowej, identyfikacja substratów oraz poznanie, jakie czynniki wpływają na ich fenomenalną aktywność katalityczną.

W naszym projekcie pragniemy scharakteryzować AcmB nie tylko pod względem struktury i właściwości katalitycznych lecz również pragniemy określić jaki jest mechanizm katalizowanej reakcji na poziomie molekularnym. Podjęte badania prowadzone będą w oparciu o enzym uzyskany dzięki nadekspresji w genetycznie zmodyfikowanej bakterii. Dla takiego enzymu podejmiemy próberozwiązania struktury krystalicznej, po czym AcmB poddany będzie mutacjom punktowym, które pozwolą precyzyjnie scharakteryzować aminokwasy aktywnie zaangażowane w katalizowanie reakcji. Dodatkowymi badaniami walidującymi mechanizm reakcji będą doświadczenia ze znakowanymi izotopowo substratami. Badania eksperymentalne zostaną skonfrontowane z obliczeniami teoretycznymi ścieżki reakcji metodami chemii kwantowej (DFT) oraz uhonorowaną nagrodą Nobla metodą QM:MM. Pomimo wielu badań eksperymentalnych dla tych enzymów żadnych obliczeń teoretycznych dotyczących mechanizmu reakcji jak dotąd nie przeprowadzono. Mamy nadzieję, że zastosowanie kombinacji teoretycznych i eksperymentalnych technik badawczych zaskutkuje efektem synergii, który pomoże przeniknąć sekrety tego interesującego enzymu. Tym samym nasze badania nad AcmB rzucą nowe światło na całą klasę dehydrogenaz 3-ketosteroidowych, biokatalizatorów użytecznych w produkcji leków steroidowych.