

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Alenka ŽUMER

**ANALIZA NEKATERIH MOŽNIH REAKCIJSKIH
MEHANIZMOV 17 β -HIDROKSISTEROID
DEHIDROGENAZE IZ NITASTE GLIVE
*COCHLIOBOLUS LUNATUS***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Alenka ŽUMER

**ANALIZA NEKATERIH MOŽNIH REAKCIJSKIH MEHANIZMOV
17 β -HIDROKSISTEROID DEHIDROGENAZE IZ NITASTE GLIVE
*COCHLIOBOLUS LUNATUS***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANALYSIS OF CERTAIN POSSIBLE REACTION MECHANISMS OF
17 β -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE FROM
FILAMENTOUS FUNGUS *COCHLIOBOLUS LUNATUS***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Eksperimentalno delo je bilo opravljeno na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan prof. dr. Jurij Stojan, za somentorico prof. dr. Tea Lanišnik Rižner in za recenzenta prof. dr. Tom Turk.

Mentor: prof. dr. Jurij Stojan

Somentorica: prof. dr. Tea Lanišnik Rižner

Recenzent: prof. dr. Tom Turk

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Jurij STOJAN
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Članica: prof. dr. Tea LANIŠNIK RIŽNER
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Član: prof. dr. Tom TURK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Alenka Žumer

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 577.152.1: 582.282 (043)=163.6
KG glive/nitaste glive/*Cochliobolus lunatus*/encimi/17 β -hidroksisteroid dehidrogenaza/reakcijski mehanizem/ Theorell-Chanceov reakcijski mehanizem
AV ŽUMER, Alenka
SA STOJAN, Jurij (mentor)/LANIŠNIK RIŽNER, Tea (somentorica)/TURK, Tom (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2014
IN ANALIZA NEKATERIH MOŽNIH REAKCIJSKIH MEHANIZMOV 17 β -HIDROKSISTEROID DEHIDROGENAZE IZ NITASTE GLIVE *COCHLIOBOLUS LUNATUS*
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 40 str., 4 pregl., 10 sl., 39 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Kljub temu, da v glivnem primarnem metabolizmu ni steroidnih substratov, ima *Cochliobolus lunatus* 17 β -hidroksisteroid dehidrogenazo, ki relativno dobro oksidira in reducira nekatere androgene in še posebno estrogene. 17 β -HSDcl katalizira oksidacijo oz. redukcijo substratov v prisotnosti piridinskih nukleotidov NADP⁺ oz. NADPH po urejenem dvosubstratno-dvoproduktnem mehanizmu (ordered bi-bi). V poteku reakcije se na beljakovinski del encima najprej veže ustrezna oblika koencima, temu sledi vezava substrata in kemična oksido-redukcija, nato pa v obratnem vrstnem redu najprej izstopi produkt in končno še spremenjeni koencim. S skrbno načrtovanimi poskusi smo tak potek dogodkov želeli dokazati, pri čemer je bilo potrebno poskuse izpeljati pod pogoji, ko se vmesni produkti kopičijo v zadostnih količinah. V predpostavljeni reakcijski shemi smo določili vse kinetične parametre, vendar pa se je zaradi posebnosti sistema, v katerem sodelujejo zelo slabo topni steroidni substrati, vedno pokazalo, da se med katalitičnim procesom ternarni kompleks encim-koencim-substrat ne kopiči v zadostnih količinah in ga zato ni bilo mogoče dokazati. V vrsti kinetičnih poskusov smo uspeli določiti hitrostne konstante, značilne za poenostavljen t.i. Theorell-Chanceov reakcijski mehanizem. 17 β -HSDcl kaže visoko afiniteto do piridinskega koencima, kar ima za posledico nizko hitrost izstopanja koencima. Izstopanje koencima naj bi bila najpočasnejša stopnja v reakcijskem mehanizmu, kar smo s posebej načrtovanim poskusom tudi prvič dokazali.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 577.152.1: 582.282 (043)=163.6
CX fungi/filamentous fungi/*Cochliobolus lunatus*/enzymes/17 β -hydroxysteroid dehydrogenase/reaction mechanism/ Theorell-Chance reaction mechanism
AU ŽUMER, Alenka
AA STOJAN, Jurij (supervisor)/LANIŠNIK RIŽNER, Tea (co-advisor)/TURK, Tom (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2014
TI ANALYSIS OF CERTAIN POSSIBLE REACTION MECHANISMS OF 17 β -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE FROM FILAMENTOUS FUNGUS *COCHLIOBOLUS LUNATUS*
DT Graduation Thesis (University Studies)
NO IX, 40 p., 4 tab., 10 fig., 39 ref.
LA sl
AL sl/en
AB There are no steroid substrates in fungal primary metabolism; however, *Cochliobolus lunatus* has an enzyme 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, which catalyzes reduction and oxidation of androgens and especially estrogens relatively well. 17 β -HSDcl converts substrates in the presence of pyridine coenzyme NADP⁺ or NADPH in the ordered bi-bi reaction mechanism. The first step in the reaction is coenzyme binding, followed by binding of the substrate. The next step is oxidation-reduction, followed in reverse, first by the dissociation of the product and finally of the changed form of coenzyme. We tried to prove that the process happened in this order through several thoroughly planned experiments, which had to be carried out in specific circumstances, so as to obtain sufficient quantities of intermediates. In the conceived reaction scheme all kinetic parameters were set, but due to the peculiarities of the system in which very poorly soluble steroid substrates were involved, it always came out that in the catalytic process the ternary complex enzyme-coenzyme-substrate did not accumulate in sufficient quantities and was thus unable to prove. In a series of kinetic experiments we managed to set rate constants, characteristic of the simplified Theorell-Chance reaction mechanism. 17 β -HSDcl shows high affinity towards the pyridine coenzyme, which leads to the low speed of coenzyme dissociation. Coenzyme dissociation is believed to be the slowest phase in the reaction mechanism, which through a specifically designed experiment has been proven for the first time.

KAZALO VSEBINE

	Ključna dokumentacijska informacija	III
	Key words documentation	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo preglednic	VII
	Kazalo slik	VIII
	Okrajšave in simboli	IX
1	UVOD	1
2	PREGLED OBJAV	2
2.1	HIDROKSISTEROID DEHIDROGENAZE	2
2.1.1	Naddružina kratkoverižnih dehidrogenaz/reduktaz (SDR)	2
2.1.2	Hidroksisteroid dehidrogenaze pri bakterijah, glivah in kvasovkah	3
2.1.3	Mehanizem delovanja hidroksisteroid dehidrogenaz	4
2.1.4	Katalitični mehanizem hidroksisteroid dehidrogenaz iz naddružine SDR	5
2.2	NITASTA GLIVA <i>COCHLIOBOLUS LUNATUS</i>	5
2.2.1	17 β -hidroksisteroid dehidrogenaza iz glive <i>Cochliobolus lunatus</i>	5
2.2.1.1	Pomembne aminokisljine za vezavo koencima in substrata	9
3	MATERIALI IN METODE	10
3.1	MATERIALI	10
3.1.1	Laboratorijska oprema	10
3.1.2	Bakterije	10
3.1.3	Raztopine, pufri, gojišče	11
3.2	METODE	12
3.2.1	Gojenje bakterij in indukcija izražanja	12
3.2.2	Regeneracija glutation sefaroze	13
3.2.3	Izolacija in čiščenje proteina	13
3.2.4	Določevanje koncentracije proteina po Bradfordovi metodi	14
3.2.5	SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza	15
3.2.6	Kinetični poskusi	16
3.2.6.1	Materiali	16
3.2.6.2	Postopek	17
3.2.6.2.1	Klasičen spektrofotometer	17
3.2.6.2.2	Aparat za merjenje hitrih reakcij	18
3.2.6.3	Analiza kinetičnih podatkov	18
3.2.6.3.1	Določitev ravnotežne konstante	18
3.2.6.3.2	Določitev vezavnih konstant za koencim	18
3.2.6.3.3	Določitev začetnih hitrosti reakcije	19
3.2.6.3.4	Meritve časovnega poteka oksidacije in redukcije s klasičnim spektrofotometrom	19

3.2.6.3.5	Meritev časovnega poteka prve pretvorbe 4-estren-17 β -ol-3-ona s 17 β -HSDcl v prisotnosti NADP ⁺ z aparatom za merjenje hitrih reakcij (»stopped-flow«)	19
3.2.6.3.6	Določanje karakterističnih hitrostnih konstant in potrditev reakcijskega mehanizma	20
4	REZULTATI	21
4.1	IZOLACIJA PROTEINA	21
4.2	DOLOČEVANJE KONCENTRACIJE IZOLIRANEGA PROTEINA	22
4.3	KINETIČNI POSKUSI	23
4.3.1	Določitev ravnotežne konstante	23
4.3.2	Določitev vezavnih konstant koencimov	24
4.3.3	Določitev začetnih hitrosti reakcije	25
4.3.4	Meritve časovnega poteka oksidacije in redukcije do ravnotežja s klasičnim spektrofotometrom	28
4.3.5	Meritev časovnega poteka prve pretvorbe 4-estren-17 β -ol-3-ona s 17 β -HSDcl v prisotnosti NADP ⁺ z aparatom za merjenje hitrih reakcij (»stopped-flow«)	30
5	RAZPRAVA	32
6	SKLEPI	36
7	VIRI	37

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Absorbanca pri različnih koncentracijah standardne raztopine BSA	22
Preglednica 2: Številčne vrednosti začetnih hitrosti oksidacije 4-estren-17 β -ol-3-ona v prisotnosti 0,5 μ M 17 β -HSDcl in NADP ⁺	25
Preglednica 3: Številčne vrednosti začetnih hitrosti redukcije 4-estren-3,17-diona v prisotnosti 0,5 μ M 17 β -HSDcl in NADPH	25
Preglednica 4: Karakteristične hitrostne konstante za reakcije pretvorbe 4-estren-3,17-diona in 4-estren-17 β ol-3-ona v prisotnosti NADPH in NADP ⁺ s 17 β -HSDcl	29

KAZALO SLIK

Slika 1: Rossmannovo zvitje 17β -HSDcl (Humphrey in sod., 1996)	6
Slika 2: Reaktanti in katalitična triada 17β -HSDcl na začetku in na koncu reakcije (Humphrey in sod., 1996)	7
Slika 3: SDS-PAGE kot metoda za določanje čistosti izoliranega proteina	21
Slika 4: Umeritvena premica za izračun koncentracije izoliranega proteina	22
Slika 5: Časovni potek spreminjanja koncentracije NADPH v prisotnosti različnih začetnih koncentracij koencimov in substratov ter 17β -HSDcl	23
Slika 6: Titracija 17β -HSDcl z oksidiranim in reduciranim koencimom NADP(H)	24
Slika 7: Časovni potek oksidacije 4-estren- 17β -ol-3-ona s 17β -HSDcl v prisotnosti NADP^+	26
Slika 8: Časovni potek redukcije 4-estren-3,17-diona s 17β -HSDcl v prisotnosti NADPH	27
Slika 9: Časovni potek oksidacije 4-estren- 17β -ol-3-ona in redukcije 4-estren-3,17-diona s 17β -HSDcl v prisotnosti NADP^+ oz. NADPH pri posebej izbranih pogojih, ki omogočajo razrešitev mehanizma reakcije	28
Slika 10: Časovni potek oksidacije 4-estren- 17β -ol-3-ona s 17β -HSDcl v prisotnosti NADP^+ pri visoki koncentraciji encima	30

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AKR	naddružina aldo/keto-reduktaz
BSA	goveji serumski albumin
DMF	dimetilformamid
HSD	hidroksisteroid dehidrogenaza
IPTG	izopropil β -D-tiogalaktopiranozid
NAD ⁺ /NADP ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid /nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (oksidirani obliki)
NADH/NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid /nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (reducirani obliki)
PBS	fosfatni pufer
SDR	naddružina kratkoverižnih dehidrogenaz/reduktaz
SDS	natrijev dodecil sulfat
SDS-PAGE	natrijev dodecil sulfat poliakrilamidna gelska elektroforeza
TEMED	tetrametiletilendiamin
Tris-HCl	tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorid
U	enota za encimsko aktivnost (ang.: unit)

1 UVOD

V glivnem primarnem metabolizmu ni steroidnih substratov, vendar pa ima *Cochliobolus lunatus* 17 β -hidroksisteroid dehidrogenazo (17 β -HSDcl), ki relativno dobro oksidira in reducira nekatere androgene in še posebno estrogene.

17 β -hidroksisteroid dehidrogenaze so encimi, ki pretvarjajo aktivne oblike androgenov in estrogenov v neaktivne, in obratno, in sicer preko specifične oksido-redukcijske pretvorbe hidroksilne oziroma karbonilne skupine na mestu 17 steroidnega skeleta. Za svoje delovanje potrebujejo kofaktor nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP⁺ ali NADPH) (Laplante in sod., 2009).

Molekulski mehanizem delovanja 17 β -HSDcl poteka po urejenem dvosubstratno-dvoproduktnem mehanizmu (ordered bi-bi). Na beljakovinski del encima se najprej veže ustrezna oblika koencima, temu sledi vezava substrata in kemična oksido-redukcija, nato pa v obratnem vrstnem redu najprej izstopi produkt in končno še spremenjeni koencim (Kristan, 2003).

Namen dela je opredeliti primernost nekaterih zaporednih dvosubstratnih-dvoproduktnih reakcijskih mehanizmov rekombinantnega encima 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaze iz glive *Cochliobolus lunatus*. Izmed konkurenčnih reakcijskih mehanizmov želimo izbrati najprimernejšega na osnovi različnih kinetičnih in nekinetičnih kriterijev.

Postavili smo hipotezi, da se v katalitični pretvorbi steroidnega substrata s 17 β -HSDcl ternarni kompleks encim-koencim-substrat ne kopiči, in da je najpočasnejša stopnja zasledovane encimsko katalizirane reakcije izstopanje pretvorjenega koencima.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HIDROKSISTEROID DEHIDROGENAZE

Hidroksisteroid dehidrogenaze (HSD) so encimi, ki stereospecifično in reverzibilno katalizirajo pretvorbo hidroksilne skupine v ketonsko skupino ob prisotnosti koencima NAD⁺/NADP⁺ (Steroid nomenclature, 1990). Poznamo 3 α -HSD in 20 α -HSD, najbolj raziskane pa so 3 β -HSD, 11 β -HSD in 17 β -HSD. Najdemo jih v različnih organizmih, od mikroorganizmov do sesalcev. Pri sesalcih katalizirajo zadnjo stopnjo biosinteze steroidnih hormonov, in sicer estrogenov in androgenov, uravnavajo pa tudi njihovo aktivnost. V nekaterih tkivih aktivne steroide pretvarjajo v neaktivne in s tem uravnavajo njihov učinek na jedrne receptorje (Penning, 1997). HSD uvrščamo v naddružino kratkoverižnih dehidrogenaz/reduktaz (SDR) (Persson in sod., 2009). Izjema je 17 β -HSD tipa 5 oz. AKR1C3, ki spada v naddružino aldo/keto-reduktaz (AKR) (Jin in Penning, 2007).

2.1.1 Naddružina kratkoverižnih dehidrogenaz/reduktaz (SDR)

V naddružino kratkoverižnih dehidrogenaz/reduktaz uvrščamo encime velikosti 25-35 kDa, za katere je značilno, da imajo kljub 25 % ujemanju v aminokislinskem zaporedju, podoben način zvitja in reakcijski mehanizem ter visoko ohranjena zaporedja (Penning, 1997). Encimi imajo ohranjena določena zaporedja, in sicer vezavno mesto za koencim (Gly-X-X-X-Gly-X-Gly) ter aktivno mesto (Tyr-X-X-X-Lys). Vezavno mesto za koencim, ki je del Rossmanovega zvitja (slika 1), leži na N-terminalnem delu, medtem ko je aktivno mesto prisotno v osrednjem delu aminokislinskega zaporedja (Krozowski, 1992; Krozowski, 1994). Posebna porazdelitev α -vijačnic in β -plasti (β - α - β - α - β)₂, t.i. Rossmanovo zvitje, je značilna za celotno naddružino SDR (Oppermann in sod., 2003). Ti encimi delujejo kot izomeraze, epimeraze ali oksidoreduktaze, običajno pa so aktivni v di-oz. tetramerni obliki (Joernvall in sod., 1995). Sodelujejo pri metabolizmu hormonov, oksidaciji maščobnih kislin in biotransformaciji ksenobiotikov (Oppermann in sod., 2001), povezani pa so tudi z nastankom nekaterih bolezni, in sicer rakavih obolenj (Lin in sod., 1999), bolezni policističnih ledvic (Fomitcheva in sod., 1998), povišanega krvnega tlaka

(Li in sod., 1998), Alzheimerjeve bolezni (He in sod., 1999) in debelosti (Masuzaki in sod., 2001).

2.1.2 Hidroksisteroid dehidrogenaze pri bakterijah, glivah in kvasovkah

17 β -HSD so prisotne v mikroorganizmih, in sicer v bakterijah, kvasovkah in glivah (Lanišnik Rižner in sod., 2001).

Vloga HSD pri bakterijah je razstrupljanje in razgradnja eksogenih steroidov, ki služijo kot vir energije in ogljika. 3 β ,17 β -HSD iz bakterije *Comamonas testosteroni* in 3 α ,20 β -HSD iz aktinomicete *Streptomyces hydrogenans* sodelujeta pri razstrupljanju steroidov eksogenega izvora ter pri transportu steroidov skozi membrano (Lanišnik Rižner in Žakelj-Mavrič, 2000). 3 β ,17 β -HSD bakteriji *C. testosteroni* omogoča izrabo steroidov kot edinega vira ogljika, kar je tudi razlog povečane odpornosti bakterije na steroidne antibiotike (Mindnich in sod., 2004). Raziskane so tudi 7 α -HSD iz bakterije *Escherichia coli*, 7 α -HSD iz *Eubacterium sp.*, 17 β -HSD iz *S. hydrogenans* ter 17 β -HSD iz *Alcaligenes sp.* (Yin in sod., 1991).

17 β -HSD so sprva odkrili pri dveh vrstah gliv, in sicer pri *Cochliobolus lunatus* (17 β -HSDcl) ter *Cylindrocarpon radicumicola*, kasneje pa tudi pri številnih drugih. Doslej so 17 β -HSD izolirali iz gliv *C. lunatus* in *C. radicumicola* ter določili tudi nukleotidno zaporedje genov, ki kodirajo omenjen encim, klonirali pa so le 17 β -HSDcl (Lanišnik Rižner in sod., 1996; Lanišnik Rižner in sod., 1999). Encima iz omenjenih gliv se med drugim razlikujeta po tem, da je 17 β -HSD iz *C. radicumicola* inducibilna, 17 β -HSDcl pa konstitutivna (Lanišnik Rižner, 1996). Konstitutivno 17 β -HSD so dokazali tudi pri drugih nitastih glivah, kot so *Mucor spinosus*, *Rhizopus nigricans*, *Fusarium lini*, *Pleospora herbanum*, *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma viride* in *Stropharia rugosa* (Lanišnik Rižner in sod., 1992; Lanišnik Rižner in Žakelj-Mavrič, 2000).

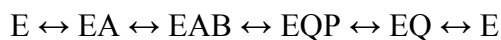
Različne vrste kvasovk so prav tako sposobne pretvorbe steroidov, in sicer androstendiona, testosterona, estrona in estradiola (Lanišnik Rižner in sod., 2001a; Lanišnik Rižner in sod., 2001b; Lanišnik Rižner in sod., 2001c). 17 β -HSD aktivnost so odkrili pri mezofilnih kvasovkah *Candida tropicalis*, *Cryptococcus tsukubaensis*, *Saccharomyces cerevisiae* in ekstremofilnih kvasovkah *Hortaea werneckii*, *Trimmatostroma salinum* in *Phaeothea triangularis* (Lanišnik Rižner in sod., 2001c).

Peroksisomalni multifunkcionalni encim tipa 2 (MFE-2) ((3R)-hidroksiacil-CoA dehidrogenaza/2-enoil-CoA hidrataza 2) iz *S. cerevisiae* in *C. tropicalis*, ki primarno sodeluje pri β -oksidaciji maščobnih kislin, prav tako izkazuje 17 β -HSD aktivnost. Rekombinantna (R)-3-hidroksiacil-CoA dehidrogenazna domena encima MFE-2 iz kvasovke *C. tropicalis* deluje podobno kot človeški MFE-2 encim, imenovan tudi 17 β -HSD tipa 4 (Lanišnik Rižner in sod., 2001a).

2.1.3 Mehanizem delovanja hidroksisteroid dehidrogenaz

HSD katalizirajo oksidoredukcije steroidov s pomočjo koencimov NADP(H) ali NAD(H), ki prenašajo redukcijske ekvivalente. Delujejo po zaporednem mehanizmu, pri čemer se na encim vežeta koencim (A) in substrat (B). Nastane ternarni kompleks, po reakciji pa encim zapustita oba, produkt (P) in druga oblika koencima (Q).

V primeru, da se substrat B ne veže na prosti encim, ampak le na binarni kompleks EA oziroma, če se P lahko veže le na kompleks EQ, govorimo o obveznem zaporednem mehanizmu (compulsory-order, ordered Bi-Bi).



V primeru, da vrstni red vezave za nastanek ternarnega kompleksa ni pomemben, govorimo o naključnem zaporednem mehanizmu (random-order, random Bi-Bi) (Engel, 1977).

Molekulski mehanizem delovanja 17 β -HSDcl poteka po t.i. Theorell-Chanceovem reakcijskem mehanizmu, ki predpostavlja zaporedno urejeno dvosubstratno encimsko reakcijo (ordered Bi-Bi) brez kopičenja ternarnega kompleksa encim-koencim-substrat. Kompleks nastane, a obstaja le tako kratek čas, da ga v raztopini ne moremo določiti (Kristan, 2003).

HSD iz naddružine SDR tvorijo ternarni kompleks po obveznem in naključnem zaporednem mehanizmu, vse do zdaj raziskane HSD iz naddružine AKR pa delujejo izključno po obveznem zaporednem mehanizmu (Penning, 1997).

2.1.4 Katalitični mehanizem hidroksisteroid dehidrogenaz iz naddružine SDR

Pri HSD iz naddružine SDR leži koencim v aktivnem mestu v sin konformaciji, kar omogoča, da se 4-pro-(S) hidridni anion iz nikotinamida prenese na α -stran steroidnega substrata.

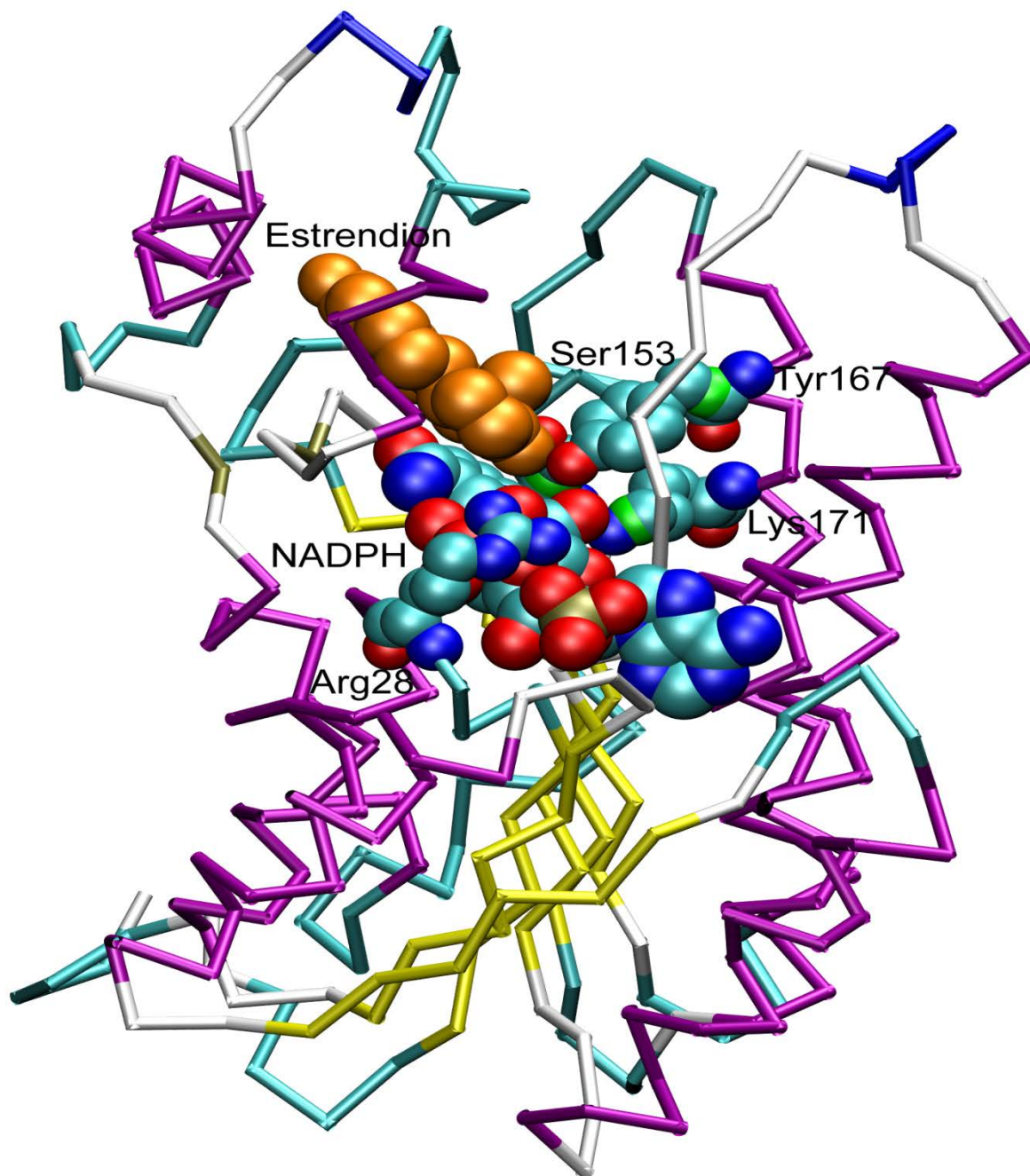
HSD iz omenjene naddružine imajo ohranjeno zaporedje Tyr-X-X-X-Lys. Tyr in Lys sta ključna za encimsko katalizo. Lys stabilizira ribozo ter zniža pKa fenolne skupine Tyr, ki po potrebi deluje kot katalitična kislina ali baza. Z usmerjeno mutagenozo so potrdili tudi pomen bližnjega Ser. Tyr in Ser elektrofilno napadeta karbonilni kisik na mestu 17 na substratu in s tem pripomoreta, da ogljikov atom sprejme (pro)-S hidridni anion.

2.2 NITASTA GLIVA *COCHLIOBOLUS LUNATUS*

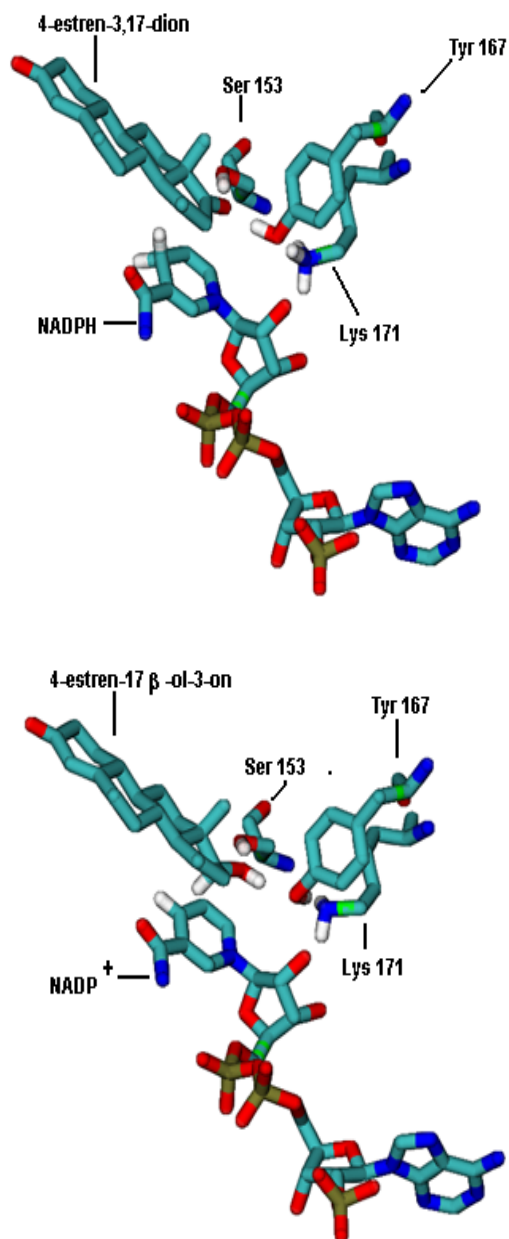
Nitasto glivo *Cochliobolus lunatus* uvrščamo med askomicete (Ascomycota), ki imajo deljene hife in dvoplastne hitin-glukanske celične stene. V naravi obstaja kot teleomorfni mikroorganizem, za katerega je značilen popoln spolni ciklus razmnoževanja s tvorbo askospor. Razmnoževalne oblike glive *C. lunatus* so zelo različne, kar je značilnost večine višjih gliv (Rozman, 1993).

2.2.1 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaza iz glive *C. lunatus*

Med vsemi glivnimi SDR je najboljše raziskana 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaza iz glive *C. lunatus* (17 β -HSDcl). 17 β -HSDcl je encim, ki v prisotnosti koencima NADP(H) regiospecifično katalizira oksido-redukcije androgenov in estrogenov, npr. 4-estren-3,17-diona in 4-estren-17 β -ol-3-ona (Lanišnik Rižner in sod., 2001a).



Slika 1: Rossmannovo zvitje 17 β -HSDc1; aminokisliline katalitične triade: Tyr167, Ser153 in Lys171; Arg28 za specifično vezavo NADP(H) koencimov; oranžno: substrat 4-estren-3,17-dion; NADPH v barvah atomov (svetlo modra: ogljiki, rdeča: kisiki, temno modra: dušiki). Polipeptidna veriga proteina je obarvana: vijolično: vijačnice, rumeno: beta strukture, modro: obrati, belo: neurejena struktura (Humphrey in sod.,1996).



Slika 2: Reaktanti in katalitična triada 17 β -HSDc1 na začetku in na koncu reakcije; prikazani so le tisti H atomi, ki sodelujejo v reakciji (Humphrey in sod., 1996).

Aminokislinsko zaporedje 17 β -HSDc1 vključuje zaporedja, ki so značilna za naddružino SDR, in sicer vezavno mesto za koencim Gly-X-X-X-Gly-X-Gly in aktivno mesto Tyr-X-X-X-Lys. Z usmerjeno mutagenozo so potrdili, da sta v aktivnem mestu encima Tyr167 in Lys171, poleg tega pa tudi His164 in Tyr212, ki sicer ne sodelujeta pri vezavi, temveč sta le sterična ovira za dostop substrata in koencima (Kristan, 2003). V fizioloških razmerah

deluje 17 β -HSDcl kot dimer (Lanišnik Rižner in sod., 1999). Med aminokislinskimi ostanki Arg129 in Glu117/Asp121 ter His111 in Asp187 nastajajo solni mostički oz. vodikove vezi. Močne hidrofobne in aromatske interakcije med α E- in α F-vijačnicama obeh podenot (oz. Phe120, Phe 124, Phe 132, Phe133 in Phe177) stabilizirajo dimerizacijo. Monomeri kljub ohranjeni sekundarni zgradbi niso aktivni (Kristan in sod., 2005).

Encim je homologen nekaterim glivnim reduktazam, ki sodelujejo v biosintezi mikotoksinov in pigmenta melanina, in sicer versicolorin reduktazi (VerA) iz vrste *Emericella nidulans* (65 %), versicolorin reduktazi (Ver1) iz *Aspergillus parasiticus* (67 %) ter 1,3,8-trihidroksinaftalen reduktazi (THNR) iz *Colletotrichum lagenarium* (61 %) in *Magnaporthe grisea* (61 %). Podobnost so odkrili tudi s 7 α -HSD iz bakterije *Escherichia coli* (37%) ter s človeškima 17 β -HSD tipa 4 in 8 (31 %) (Lanišnik Rižner in sod., 1999).

V glivi *C. lunatus* so dokazali endogeno sintezo steroidnega hormona testosterona iz radioaktivne mevalonske kisline (Kastelic-Suhadolc in sod., 1994), zato bi bil lahko naravni substrat encima 17 β -HSDcl endogeni steroid. Konstitutivna 17 β -HSDcl bi bila lahko udeležena v uravnavanju koncentracije aktivne steroidne signalne molekule, saj so v citosolu in plazemskih membranah glive *C. lunatus* odkrili tudi vezavne proteine za androgene steroide (Kastelic-Suhadolc in Lenasi, 1992; Žakelj-Mavrič in sod., 1995).

Fiziološka vloga encima še vedno ni pojasnjena. 17 β -HSDcl bi bila lahko vključena v sekundarni metabolizem, saj je izražanje proteina največje v stacionarni fazi rasti. Tako kot homologna encima Ver1 in THNR, bi lahko tudi 17 β -HSDcl sodelovala pri biosintezi mikotoksinov in melanina. Znano je, da *C. lunatus* sintetizira toksina brefeldin A in kurvularin, ki vsebujeta karbonilne in hidroksilne skupine, in bi bila lahko, tako kot steroidi, podvržena oksido-redukciji. Možno je tudi, da 17 β -HSDcl sodeluje pri detoksifikaciji eksogenih steroidov. Znano je, da določeni steroidi zavirajo rast gliv. 17 β -HSD iz *Shizosaccharomyces pombe* inaktivira steroid 4-androsten-3,17-dion, ki negativno vpliva na rast in morfologijo kvasovke. Podoben način detoksifikacije so opisali tudi pri kvasovki *Candida albicans* (Lanišnik Rižner in sod., 2001b).

58 % identičnost aminokislinskega zaporedja THNR iz glive *M. grisea* in 17 β -HSDcl, je na podlagi kristalne zgradbe THNR omogočila izdelavo tridimenzionalnega atomskega modela 17 β -HSDcl. V aktivno mesto so modelirali koencim NADPH in substrat androstendion, podobno kot sta estradiol in ekvilin vezana v aktivnem mestu človeške 17 β -HSD tipa 1 (Lanišnik Rižner in sod., 2000).

2.2.1.1 Aminokisliline, ki so pomembne za vezavo koencima in substrata

Aminokisliline v aktivnem mestu in njegovi bližini:

Aminokislinski ostanki katalitične triade so Ser153, Tyr167 in Lys171 (34). Pro197 in Pro234 razmejujeta rigidno glavno verigo od prožne zanke, ki pokriva aktivno mesto (Lanišnik Rižner in sod., 2000). Dostop do aktivnega mesta ovirata His164 in Tyr212, ki sta povezana z vodikovo vezjo (Filling in sod., 2002).

Stabilizacija nikotinamidnega obroča koencima:

Pri stabilizaciji nikotinamidnega obroča koencima sodelujejo različne aminokisliline. Thr200 in Thr202 z amidno skupino nikotinamida tvorita vodikovo vez (Kristan in sod., 2003), Met204 pa naj bi nikotinamidni del koencima usmeril v ustrezen položaj za potek reakcije (Brunskole in sod., 2009).

Aminokisliline, ki določajo koencimsko specifičnost:

Pri encimih, ki kot kofaktor uporabljajo fosforiliran koencim (NADP(H)), se dva negativna naboja 2'-fosfatne skupine izravnata z enim ali dvema pozitivnima nabojema na proteinu (Persson in sod., 2003). V primeru 17β -HSDcl je za to odgovoren Arg28, ki je del vezavnega mesta za koencim (Kristan in sod., 2007).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Laboratorijska oprema

tehtnici:	E. Mettler Sartorius Basic
magnetno mešalo:	ROTH, R 1000
pH meter:	HANNA instruments
stresalniki:	Kambič PTR-60, Grant-bio
centrifuge:	Beckman, J2-CM, rotor JA14 Eppendorf 5415 D Eppendorf 5810 R
vodna kadička:	KA, WB 13
fotometer:	UV1101, Biotech Photometer
spektrofotometer:	Perkin Elmer, Lambda 45, UV/VIS spektrofotometer
stop-flow aparatura:	SF/PQ-53, Hi-Tech Scientific
luminiscenčni spektrometer:	Perkin Elmer, LS 55

3.1.2 Bakterije

Escherichia coli: sev BL 21 s plazmidom pGex-17 β -HSDcl

3.1.3 Raztopine, pufri, gojišče

Ampicilin (c=50 mg/ml):

Zatehtamo 0,75 g ampicilina in ga raztopimo v 15 ml bidestilirane vode. Razdelimo v 1,5 ml alikvote in hranimo pri -20 °C.

IPTG (c=25 mg/ml)

Zatehtamo 0,50 g IPTG in ga raztopimo v 20 ml bidestilirane vode. Razdelimo v 1 ml alikvote in hranimo pri -20 °C.

Lizocim (c=24 mg/ml)

Zatehtamo 240 mg lizocima in ga raztopimo v 10 ml PBS. Razdelimo v 1 ml alikvote in hranimo pri -20 °C.

Trombin (c=1 U/ μ l)

1000 enot trombina raztopimo v 1 ml bidestilirane vode. Razdelimo v 40 μ l alikvote in hranimo pri -70 °C.

BSA (c=1 mg/ml)

Zatehtamo 1 mg BSA in ga raztopimo v 1 ml bidestilirane vode. Raztopino hranimo v hladilniku.

PBS:

140 mM NaCl	(8,2 g)
2,7 mM KCl	(0,2 g)
10 mM Na ₂ HPO ₄	(1,4 g)
1,8 mM KH ₂ PO ₄	(0,2 g)
destilirana voda	(ad 1 l)

pH uravnamo na 7,3 in 20 min avtoklaviramo pri 121 °C in tlaku 1,2*10⁵ kPa.

Gojišče 2YT:

pastone	(30,4 g)
kvasni ekstrakt	(19,0 g)
NaCl	(9,5 g)
destilirana voda	(ad 1,9 l)

pH uravnamo na 7,0 in 20 min avtoklaviramo pri 121 °C in tlaku $1,2 \cdot 10^5$ kPa.

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje bakterij in indukcija izražanja

Reagenti:

2YT gojišče

ampicilin (50 mg/ml)

IPTG (100 mM)

Postopek:

V štiri 500 ml erlenmajerice s 50 ml 2YT gojišča in 100 μ l ampicilina (100 μ g/ml 2YT) smo nacepili *E. coli*, BL 21 s plazmidom pGex-17 β -HSDcl. Po 16-urni inkubaciji (37 °C, 200 rpm, stresalnik Kambič) smo po 22 ml te bakterijske predkulture nacepili v osem 2 l erlenmajeric z 200 ml 2YT gojišča in 400 μ l raztopine ampicilina. Inkubacija je potekala v enakih razmerah, dokler ni optična gostota pri 600 nm znašala približno 1. Po doseženi optični gostoti smo v vsako erlenmajerico dodali 1 ml pripravljene raztopine IPTG. Indukcija izražanja je potekala 3 ure (37 °C, 200 rpm, stresalnik Kambič).

3.2.2 Regeneracija glutation sefaroze

Reagenti:

20 % etanol

puffer PBS

glutation: 10 mM v 50 mM Tris-u; pH=8,0

0,1 M Tris v 0,5 M NaCl; pH=8,5

0,1 M Na acetat v 0,5 M NaCl; pH=4,5

Postopek:

Gel smo resuspendirali v 20 % etanolu, ga centrifugirali (4 °C, 5 min, 2000 rpm, centrifuga Beckman, J2-21, rotor 14) in 4-krat sprali s trikratnim volumnom pufra PBS. Med spiranji smo ponovili centrifugiranje. Nato smo gel 2-krat po 30 min inkubirali na sobni temperaturi s trikratnim volumnom 10 mM glutationa v 50 mM Tris-u (pH=8,0). Ob tem smo odstranili vezano glutation-S-transferazo. Sledilo je trikratno izmenično spiranje gela s trikratnim volumnom 0,1 M Tris-a v 0,5 M NaCl (pH=8,5) in trikratnim volumnom 0,1 M Na acetata v 0,5 M NaCl (pH=4,5). Gel smo še dvakrat sprali s trikratnim volumnom pufra PBS, ga resuspendirali v 20 % etanolu in shranili pri 4 °C.

3.2.3 Izolacija in čiščenje proteina

Reagenti:

puffer PBS

lizocim (24 mg/ml PBS)

MgCl₂ (1M)

endonukleaza (346 U/ μ l)

gel za afinitetno kromatografijo: Glutathion Sepharose 4B, Pharmacia Biotech

trombin (1 U/ μ l)

Postopek:

Gojišče smo centrifugirali (5000 rpm, 5 min, centrifuga Beckman), supernatant zavrgli, *E. coli* pa resuspendirali v 2-krat 40 ml PBS. Suspenziji celic, ki je bila na ledu, smo dodali 400 μ l lizocima, da je razgradil celično steno, nato pa smo suspenzijo 6-krat zamrzovali in odtajali, s čimer smo porušili strukturo membran. Suspenziji smo na ledu dodali še 200 μ l 1M MgCl₂ ter 1 μ l endonukleaze (346 U/ μ l) in na sobni temperaturi na stresalniku (stresalnik PTR-60, Grant-bio) inkubirali 15 min.

Kulturo smo centrifugirali (4000 rpm, 5 min, centrifuga Eppendorf in 5000 rpm, 10 min, centrifuga Beckman) supernatant pa preko gaze prefiltrirali v sterilno epruveto. Dodali smo 2 ml gela za ločitev fuzijskega proteina (glutation-S-transferaza-17 β -HSDcl) z afinitetno kromatografijo. Gel smo skupaj s supernatantom stresali 2,5 h pri 4 °C (stresalnik CAT), nato pa ga 8-krat spirali s hlajenim PBS (2000 rpm, 5 min, centrifuga Eppendorf). Prenesli smo ga v 4 alikvotne in dodali trombin (1. alikvot 30 μ l/ml gela; 2., 3. in 4. alikvot 15 μ l/ml gela), da se je 17 β -HSDcl odcepila od glutacion-S-transferaze, ki je ostala vezana na gelu. Gel s trombinom smo preko noči stresali pri 4 °C (stresalnik PTR-60, Grant-bio). Po centrifugiranju (200 rpm, 5 min, centrifuga Eppendorf) smo supernatant odpipetirali ter še enkrat centrifugirali (14000 rpm, 5 min, centrifuga Eppendorf), da se je ves gel ločil od raztopine proteina. Raztopini proteina smo nato določili koncentracijo.

3.2.4 Določevanje koncentracije proteina po Bradfordovi metodi

Reagenti:

puffer PBS

Bradfordov reagent

BSA-standard (1 mg/ml)

Postopek:

Koncentracijo proteina smo določili po uveljavljeni Bradfordovi metodi. 5 μ l raztopine proteina smo dodali 900 μ l PBS ter 100 μ l Bradfordovega reagenta. Ker za določevanje koncentracije proteina potrebujemo umeritveno premico, smo enako naredili z 1 μ l, 2 μ l, 3 μ l, 4 μ l, 5 μ l in 7 μ l standardne raztopine BSA ter nato pri 600 nm merili absorbanco.

3.2.5 SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza

Reagenti:

12 % ločilni gel:

- 3,35 ml destilirane vode
- 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH=8,8)
- 100 μ l 10 % SDS
- 4 ml 30 % akrilamida/bis akrilamida
- 50 μ l 10 % amonijevega persulfata (APS)
- 5 μ l TEMED-a

koncentrirni gel:

- 6,1 ml destilirane vode
- 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH=6,8)
- 100 μ l 10 % SDS
- 1,3 ml 30 % akrilamida/bis akrilamida
- 50 μ l 10 % amonijevega persulfata
- 10 μ l TEMED-a

barvanje proteina:

- 0,1 % Coomassie brilliant blue barvilo
- 7 % očetna kislina

Postopek:

Ločeno smo pripravili koncentrirni in ločilni gel. Ločilni gel smo nalili med stekli in prelili s 30 % etanolom. Gel se je strjeval 45 min. Etanol smo nato sprali z vodo, popivnali s filter papirjem in nalili koncentrirni gel, ki se je strjeval 35 min.

Vzorci proteina z maso 4 μ g smo denaturirali v pufri za pripravo vzorca (razmerje volumnov 3:1, 95 °C, 5 minut). Ohlajene vzorce in standard smo nanegli na gel. V kadičko smo dolili elektroforezni puffer, ki smo ga predhodno 5-krat redčili. Elektroforeza je potekala 50 min pri napetosti 190 V.

Po koncu elektroforeze smo gel potopili v Coomassie brilliant blue barvilo in segrevali do vrenja. Nato smo barvilo odlili, gel sprali z navadno vodo, dolili 7 % očetno kislino in spet

segrevali do vrenja. Ocetno kislino smo odlili in gel ponovno sprali z destilirano vodo. Postopek segrevanja do vrenja v očetni kislini in spiranja z destilirano vodo smo 4-krat ponovili. Pri tem se je ozadje gela razbarvalo, proteini pa so ostali obarvani.

3.2.6 Kinetični poskusi

3.2.6.1 Materiali

Razmere merjenja:

$\lambda=340$ nm

T=25 °C

Reagenti:

100 mM fosfatni pufer (pH=8,0)

1 % DMF

Oksidacija:

substrat: 4-estren-17 β -ol-3-on

koencim: NADP⁺

Redukcija:

substrat: 4-estren-3,17-dion

koencim: NADPH

koencim NADP⁺:

Mr=765,4 g/mol

% čistosti=98 %

c=12 mM oz. $\gamma=9,37$ mg/ml

koencim NADPH:

Mr=833,4 g/mol

% čistosti=97 %

c=12 mM oz. γ =10,31 mg/ml

substrat 4-estren-17 β -ol-3-on:

Mr=274,41 g/mol

c=20 mM oz. γ =5,49 mg/ml

substrat: 4-estren-3,17-dion

Mr=272,39 g/mol

c=20 mM oz. γ =5,48 mg/ml

encim:

Mr=28000 g/mol

c=0,5 μ M oz. γ =1,03 mg/ml

3.2.6.2 Postopek

3.2.6.2.1 Klasičen spektrofotometer

Izoliran in očiščen encim smo kinetično opredelili z merjenjem njegove aktivnosti za redukcijo 4-estren-3,17-diona in oksidacijo 4-estren-17 β -ol-3-ona v prisotnosti ustreznih koencimov. Reakcije oksidacije in redukcije smo zasledovali s pomočjo Perkin Elmer, Lambda 45, UV/VIS spektrofotometra. Spremljali smo spreminjanje absorbance pri 340 nm, t.j. valovna dolžina, pri kateri absorbira NAD(P)H z molarnim absorpcijskim koeficientom 6600 l/mol*cm. Izvedli smo več meritev v prisotnosti različnih koncentracij obeh steroidov (20-140 μ M) in koencimov (20-140 μ M). Koncentracija encima je bila 0,5 μ M. Vse meritve smo opravili v 100 mM fosfatnem pufru, pH 8,0 pri 25 °C. Zaradi boljše topnosti steroidov je končna raztopina vsebovala 1 % DMF. Reakcije redukcije in oksidacije smo spremljali do doseženega ravnotežja.

3.2.6.2.2 Naprava za merjenje hitrih reakcij

Najpočasnejšo stopnjo v katalitičnem procesu pretvorbe steroidnega substrata s 17 β -HSDcl smo želeli določiti s pomočjo naprave za merjenje hitrih reakcij («stopped-flow apparatus» SF/PQ-53, Hi-Tech Scientific). Zasedovali smo časovni potek redukcije NADP⁺, in sicer fotometrično pri valovni dolžini 340 nm. Alikvota dveh raztopin, od katerih je prva vsebovala encim in koencim, druga pa substrat, smo zmešali v mešalni celici «stopped-flow» naprave. Končna koncentracija encima je bila 4,7 μ M, koncentracija koencima 400 μ M, koncentracija substrata pa 145 μ M. Meritev smo opravili v 100 mM fosfatnem pufru, pH 8,0 pri 25 °C. Zaradi boljše topnosti steroidov je končna raztopina vsebovala 1 % DMF.

3.2.6.3 Analiza kinetičnih podatkov

3.2.6.3.1 Določitev ravnotežne konstante

Ravnotežno konstanto oksido-redukcije s 17 β -HSDcl smo določili tako, da smo v prisotnosti encima zasedovali pretvorbo določenih začetnih koncentracij steroidov in koencimov, dokler se absorbanca ni več spreminjala. Iz sprememb absorbance smo izračunali količino pretvorjenega koencima in zaradi stehiometričnega razmerja tudi količino pretvorjenega steroida. Tako smo dobili podatke za ravnotežne koncentracije reaktantov in produktov in iz njih izračunali ravnotežno konstanto.

3.2.6.3.2 Določitev vezavnih konstant za koencim

Vezavni konstanti za koencim NADPH (K_1) in koencim NADP⁺ (K_2) smo določili z merjenjem sprememb v intenziteti intrinzične triptofanske fluorescence. 17 β -HSDcl vsebuje dva triptofana, in sicer Trp 239 in Trp 257. Encimu smo dodajali po 1 μ l različnih koncentracij obeh koencimov (0-20 μ M). Vzorci smo vzbudili s svetlobo valovne dolžine 290 nm, emitirano svetlobo pa smo merili pri 335 nm. Dobljene rezultate smo analizirali s pomočjo enačbe:

$$F/F_0 = (K_1 * A_1) / (K_1 + c(\text{NADPH})) + (K_2 * A_2) / (K_2 + c(\text{NADP}^+)) \quad 1$$

3.2.6.3.3 Določitev začetnih hitrosti reakcije

Začetne hitrosti smo določili za reakciji oksidacije in redukcije pri različnih koncentracijah substrata (0-140 μM) in ustreznega koencima (0-140 μM). Začetne hitrosti predstavljajo tangente na izmerjene krivulje spreminjanja absorbance NADPH v času nič. Pri redukciji se zaradi zmanjševanja koncentracije NADPH absorbanca zmanjšuje, pri oksidaciji pa se zaradi nastajanja NADPH absorbanca povečuje.

3.2.6.3.4 Meritve časovnega poteka oksidacije in redukcije s klasičnim spektrofotometrom

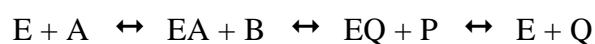
V prisotnosti 17 β -HSDcl smo zasledovali naraščanje in padanje koncentracije NADPH, ki je posledica pretvarjanja steroidov. Pri oksidaciji, kjer je NADPH nastajal, smo kot substrat uporabili 4-estren-17 β -ol-3-on, pri redukciji, kjer se je NADPH porabljal, pa 4-estren-3,17-dion. Pogoje reakcije smo izbrali tako, da se je vsakokrat porabil eden izmed reaktantov, kar nam omogoča razrešitev mehanizma reakcije. V smeri redukcije smo koncentraciji substrata in koencima spreminjali od 50 do 100 μM , v smeri oksidacije pa od 50 do 200 μM . Koncentracija encima je bila vedno 0,5 μM .

3.2.6.3.5 Meritev časovnega poteka prve pretvorbe 4-estren-17 β -ol-3-ona s 17 β -HSDcl v prisotnosti NADP⁺ z napravo za merjenje hitrih reakcij (»stopped-flow«)

Pretvorbo 4-estren-17 β -ol-3-ona smo merili z napravo za merjenje hitrih reakcij (stopped-flow apparatus). Alikvota dveh raztopin, od katerih je prva vsebovala 800 μM NADP⁺ ter 9,4 μM 17 β -HSDcl, druga pa 290 μM substrat 4-estren-17 β -ol-3-on, smo zmešali v volumskem razmerju 1:1. Absorbance nastajajočega NADPH smo zasledovali kot dvojno zaporedno meritev, in sicer najprej v časovnem obdobju 10 s, nato pa še nadaljnih 200 s. Vse meritve smo naredili v 100 mM fosfatnem pufru, pH 8,0 pri 25 °C. Zaradi boljše topnosti steroidov je končna raztopina vsebovala 1 % DMF.

3.2.6.3.6 Določanje značilnih hitrostnih konstant in potrditev reakcijskega mehanizma

Za analizo izmerjenih krivulj smo uporabili reakcijsko shemo, ki sta jo za soroden encim, alkohol-dehidrogenazo, prva vpeljala Theorell in Chance. Po tem modelu z encimom najprej reagira koencim, v naslednji stopnji pa se substrat pretvori brez kopičenja ternarnega kompleksa encim-koencim-substrat v produkt in kompleks encim-komplementaren koencim. Sledi izstopanje pretvorjenega koencima.



E predstavlja prosti encim, A koencim NADPH, B 4-estren-3,17-dion, P 4-estren-17 β -ol-3-on in Q koencim NADP⁺.

Značilne diferencialne enačbe za Theorell-Chanceovo reakcijsko shemo so:

$$d(E)/d(t) = -k_{+1}(E)(A) + k_{-1}(EA) + k_{+3}(EQ) - k_{-3}(E)(Q) \quad 2$$

$$d(EA)/d(t) = k_{+1}(E)(A) + k_{-2}(EQ)(P) - k_{-1}(EA) - k_{+2}(EA)(B) \quad 3$$

$$d(EQ)/d(t) = k_{+2}(EA)(B) + k_{-3}(E)(Q) - k_{-2}(EQ)(P) - k_{+3}(EQ) \quad 4$$

$$d(A)/d(t) = -k_{+1}(E)(A) + k_{-1}(EA) \quad 5$$

$$d(B)/d(t) = -k_{+2}(EA)(B) + k_{-2}(EQ)(P) \quad 6$$

$$d(P)/d(t) = k_{+2}(EA)(B) - k_{-2}(EQ)(P) \quad 7$$

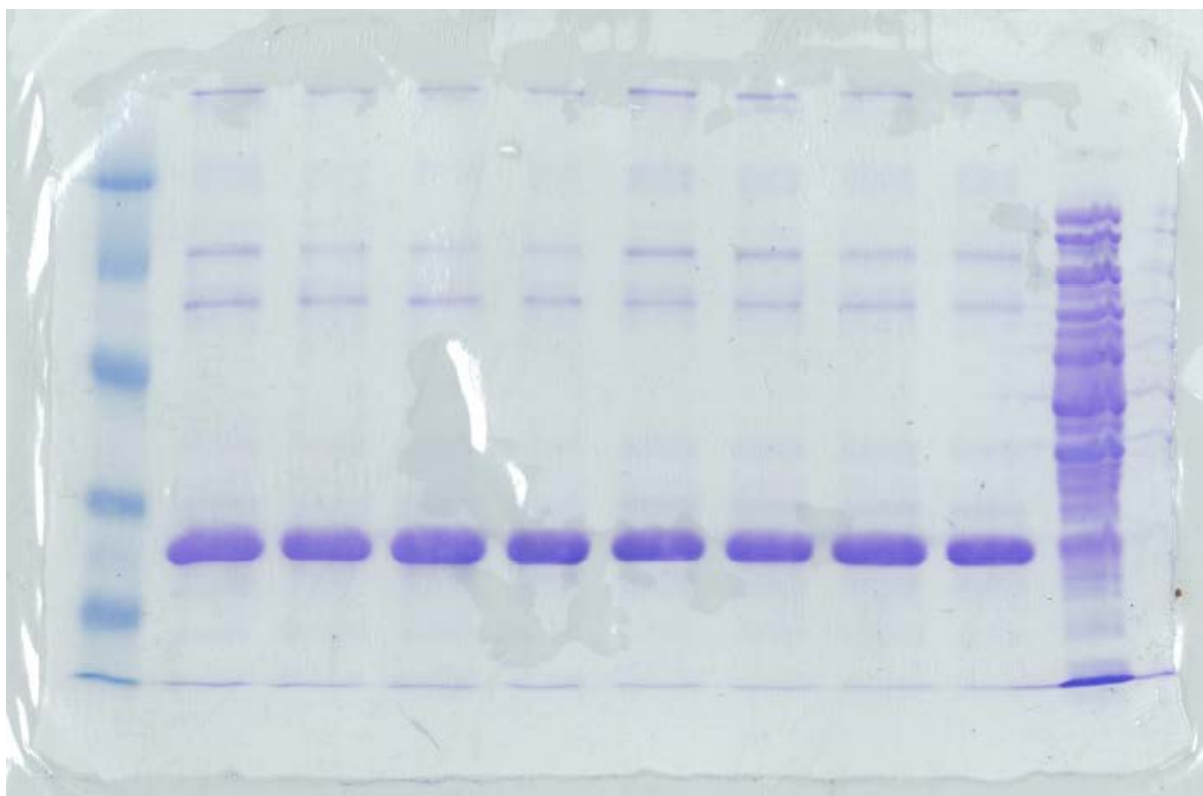
$$d(Q)/d(t) = k_{+3}(EQ) - k_{-3}(E)(Q) \quad 8$$

Ustrezen računalniški program numerično reši sistem diferencialnih enačb (enačbe 2-8) in išče njihove koeficiente s hkratnim prilagajanjem vseh eksperimentalnih krivulj nastajanja NADPH. Računalniški program je implementiran kot spletni strežnik ENZO (Bevc in sod., 2011).

4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA PROTEINA

Protein 17 β -HSDcl smo izolirali s pomočjo afinitetne kromatografije. Na glutation sefrozni gel se je vezal fuzijski protein GST-17 β -HSDcl, nato pa smo s pomočjo trombina odcepili protein 17 β -HSDcl. Čistost izoliranega encima smo preverili z SDS-PAGE (Slika 3).



Slika 3: SDS-PAGE kot metoda za določanje čistosti izoliranega proteina.

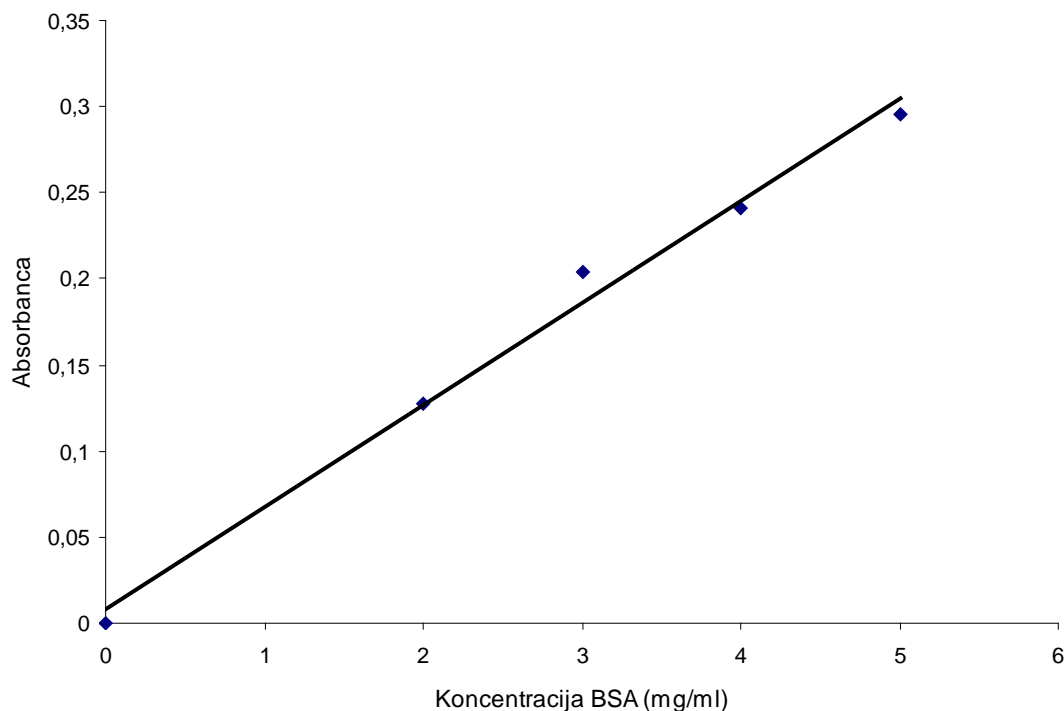
4.2 DOLOČEVANJE KONCENTRACIJE IZOLIRANEGA PROTEINA

Pri valovni dolžini 600 nm smo v dveh paralelkah izmerili absorbanco standardnih raztopin BSA in dobili rezultate, ki so predstavljeni v Preglednici 1.

Preglednica 1: Absorbanca pri različnih koncentracijah standardne raztopine BSA.

Koncentracija BSA (mg/ml)	Absorbanca		
	1. meritev	2. meritev	Povprečje
0	0	0	0
2	0,115	0,140	0,128
3	0,196	0,211	0,204
4	0,231	0,250	0,241
5	0,286	0,305	0,296

Na osnovi rezultatov v Preglednici 1 smo določili umeritveno premico (Slika 4), s pomočjo katere smo izračunali koncentracijo izoliranega encima.



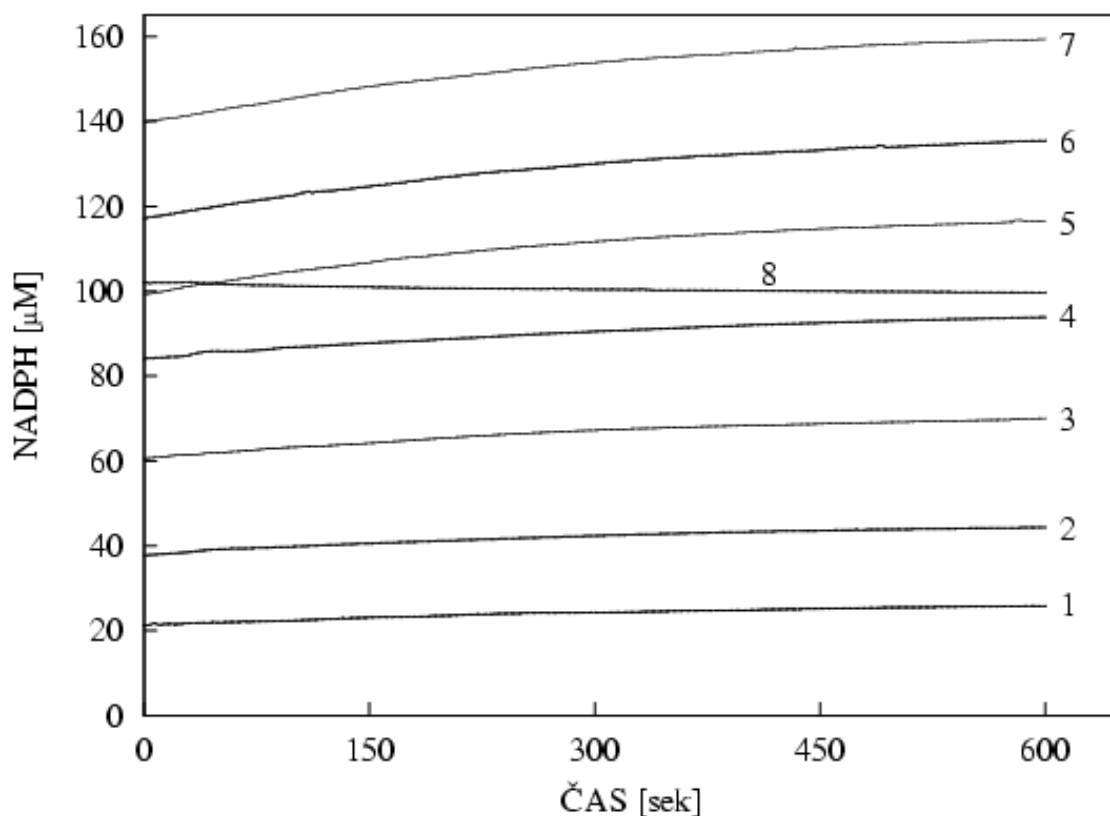
Slika 4: Umeritvena premica za izračun koncentracije izoliranega proteina

Postopek izolacije proteina smo ponovili dvakrat in skupno iz 3,2 l bakterijske kulture izolirali približno 6,5 mg encima.

Pri prvi izolaciji smo pridobili 3,9 ml raztopine proteina s koncentracijo 1,20 mg/ml, skupno 4,68 mg encima, pri drugi izolaciji pa smo pridobili 3,3 ml raztopine proteina s koncentracijo 0,54 mg/ml, skupno 1,78 mg encima.

4.3 KINETIČNI POSKUSI

4.3.1 Določitev ravnotežne konstante

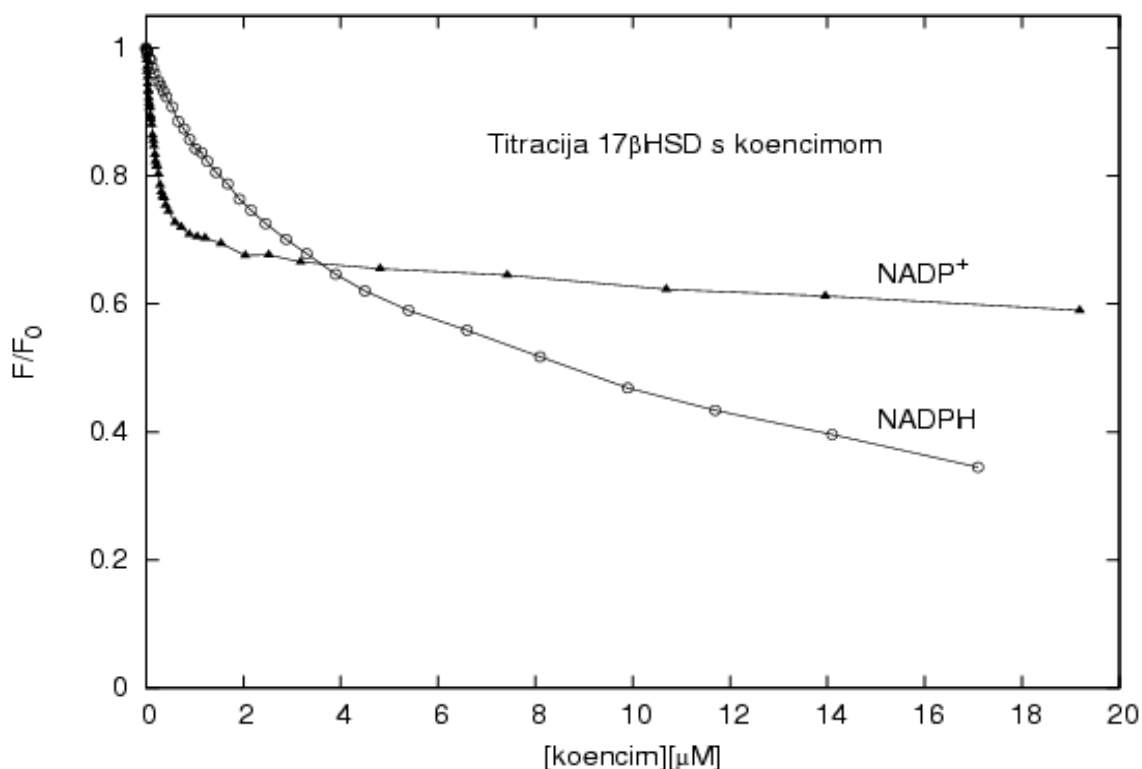


Slika 5: Časovni potek spreminjanja koncentracije NADPH v prisotnosti različnih začetnih koncentracij koencimov in substratov ter 17 β -HSDcl; začetne koncentracije obeh koencimov in substratov si na krivuljah 1-7 sledijo od 20 do 140 μ M. Na krivulji 8 sta koncentraciji NADPH in 4-estren-3,17-diona 100 μ M, koncentraciji NADP⁺ in 4-estren-17 β -ol-3-ona pa 67 μ M.

Za določitev ravnotežne konstante smo na krivuljah 1-7 uporabili enake koncentracije obeh koencimov in substratov. Pri krivulji 8 pa smo ravnotežne koncentracije posameznih reaktantov določili na podlagi ocenjene ravnotežne konstante.

Tako smo uporabili 100 μ M koncentraciji NADPH in 4-estren-3,17-diona ter 67 μ M koncentraciji NADP⁺ in 4-estren-17 β -ol-3-ona. S tem smo dosegli, da se med meritvijo absorbanca praktično ni spreminjala in tako dokazali vrednost ravnotežne konstante kot kvocient 67*67/10000.

4.3.2 Določitev vezavnih konstant koencimov



Slika 6: Titracija 17 β -HSDcl z oksidiranim in reduciranim koencimom.

Vezavni konstanti za koencim NADPH in koencim NADP⁺ smo določili s potenciometrično titracijo. Encimu smo dodajali različne koncentracije NADPH ali NADP⁺ in merili spremembe v intenziteti intrinzične triptofanske fluorescence. Vezavni konstanti smo določili za oba koencima s prilagajanjem koeficientov enačbe 1 za vsako krivuljo posebej.

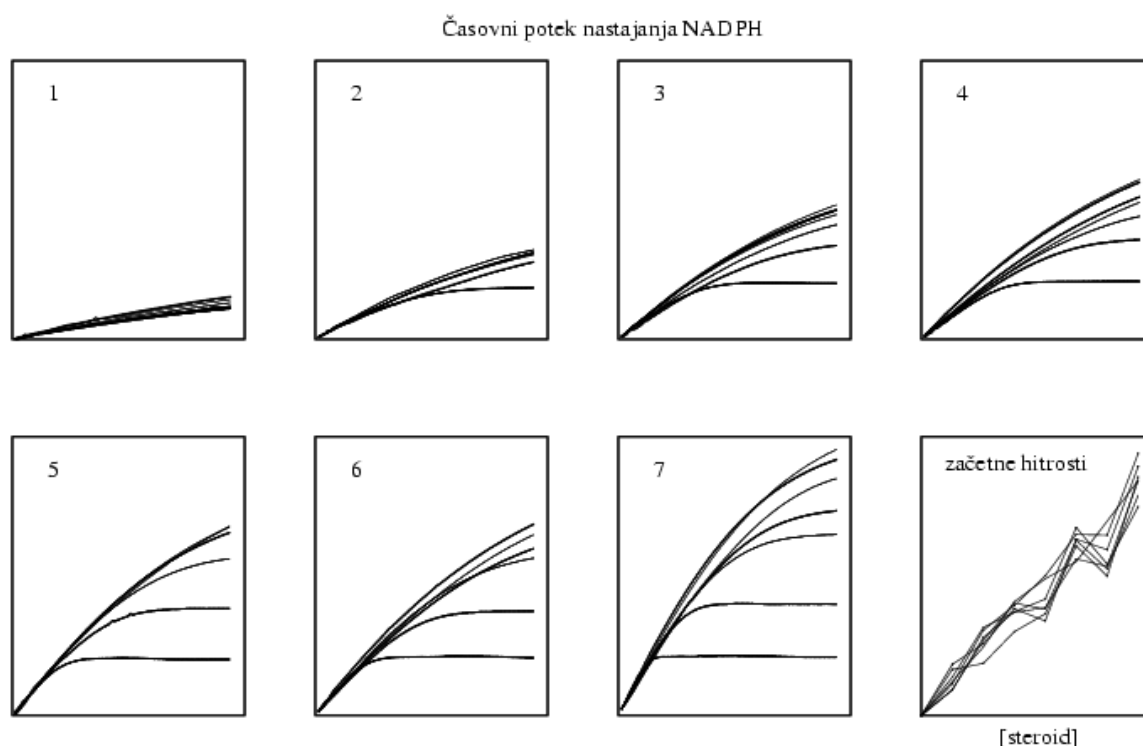
4.3.3 Določitev začetnih hitrosti reakcije

Preglednica 2: Številčne vrednosti začetnih hitrosti oksidacije 4-estren-17 β -ol-3-ona v prisotnosti 0,5 μ M 17 β -HSDcl in NADP⁺ (hitrosti so podane kot 10³*sprememba absorbance/min).

		koncentracija 4-estren-17 β -ol-3-ona (μ M)						
		20	40	60	80	100	120	140
konc. NADP ⁺ (μ M)	20	13,3	12,0	10,0	6,6	6,8	8,2	8,9
	40	18,7	13,6	22,9	20,3	19,5	22,2	17,8
	60	27,8	21,8	26,9	27,0	29,3	28,7	29,6
	80	24,6	26,5	28,1	30,4	27,7	36,4	35,6
	100	45,9	44,2	40,8	49,0	45,6	47,2	40,1
	120	43,2	36,3	38,8	39,5	38,2	47,0	/
	140	64,9	62,1	61,2	54,4	57,3	68,3	61,2

Preglednica 3: Številčne vrednosti začetnih hitrosti redukcije 4-estren-3,17-diona v prisotnosti 0,5 μ M 17 β -HSDcl in NADPH (hitrosti so podane kot 10³*sprememba absorbance/min).

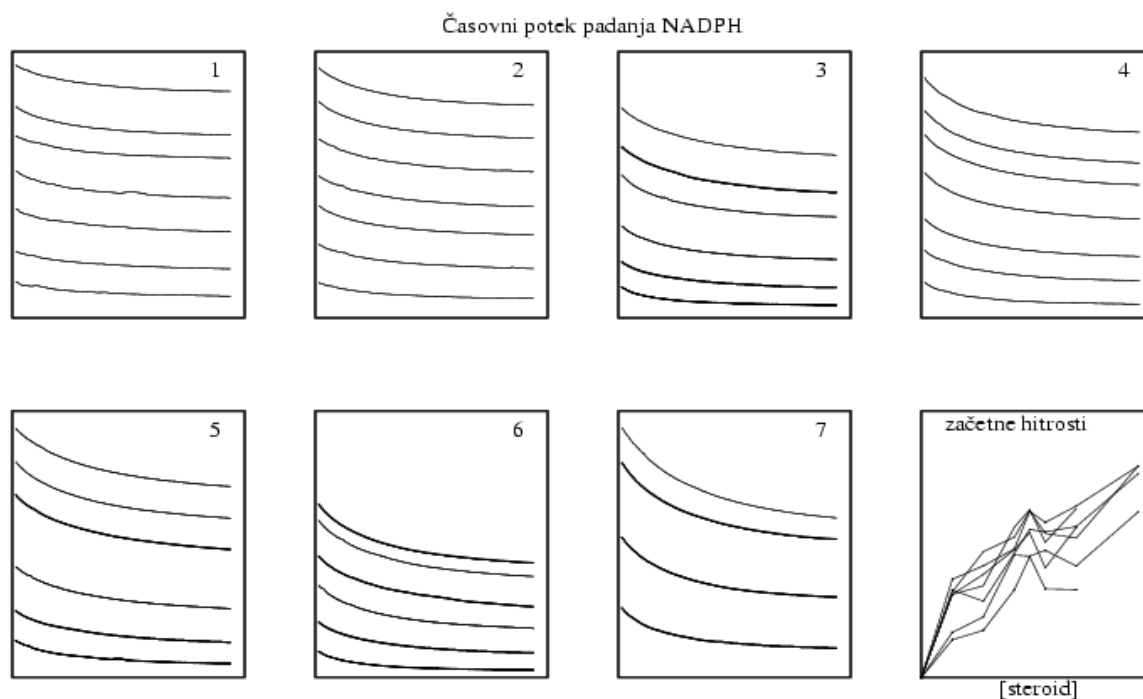
		koncentracija 4-estren-3,17-diona (μ M)						
		20	40	60	70	80	100	140
konc. NADPH (μ M)	20	19,6	24,5	45,5	62,9	46,1	45,7	/
	40	23,4	31,5	63,7	63,1	66,2	58,0	86,1
	60	43,2	53,6	66,4	75,4	57,0	78,0	/
	80	45,5	39,7	/	77,0	75,7	78,5	106
	100	43,2	47,7	78,2	87,3	70,4	87,8	/
	120	51,1	58,1	66,8	86,5	80,7	89,2	110
	140	44,5	65,4	73,0	86,6	75,0	72,5	110



Slika 7: Časovni potek oksidacije 4-estren- 17β -ol-3-ona s 17β -HSDcl v prisotnosti NADP^+ (diagrami 1-7); koncentracija 17β -HSDcl je $0,5 \mu\text{M}$, koncentracije steroida od diagrama 1 do 7 naraščajo od 20 do $140 \mu\text{M}$, koncentracije koencima na posameznem diagramu naraščajo od 20 do $140 \mu\text{M}$; časovna skala reakcije na x-osi je od 0 do 11 min.

Diagram desno spodaj prikazuje začetne hitrosti reakcije pri pogojih na diagramih 1-7; koncentracija steroida je od 0 do $140 \mu\text{M}$, hitrosti oksidacije 4-estren- 17β -ol-3-ona na y-osi pa od 0 do $11 \mu\text{mol}/\text{min}$ (številčne vrednosti so podane v Preglednici 2)

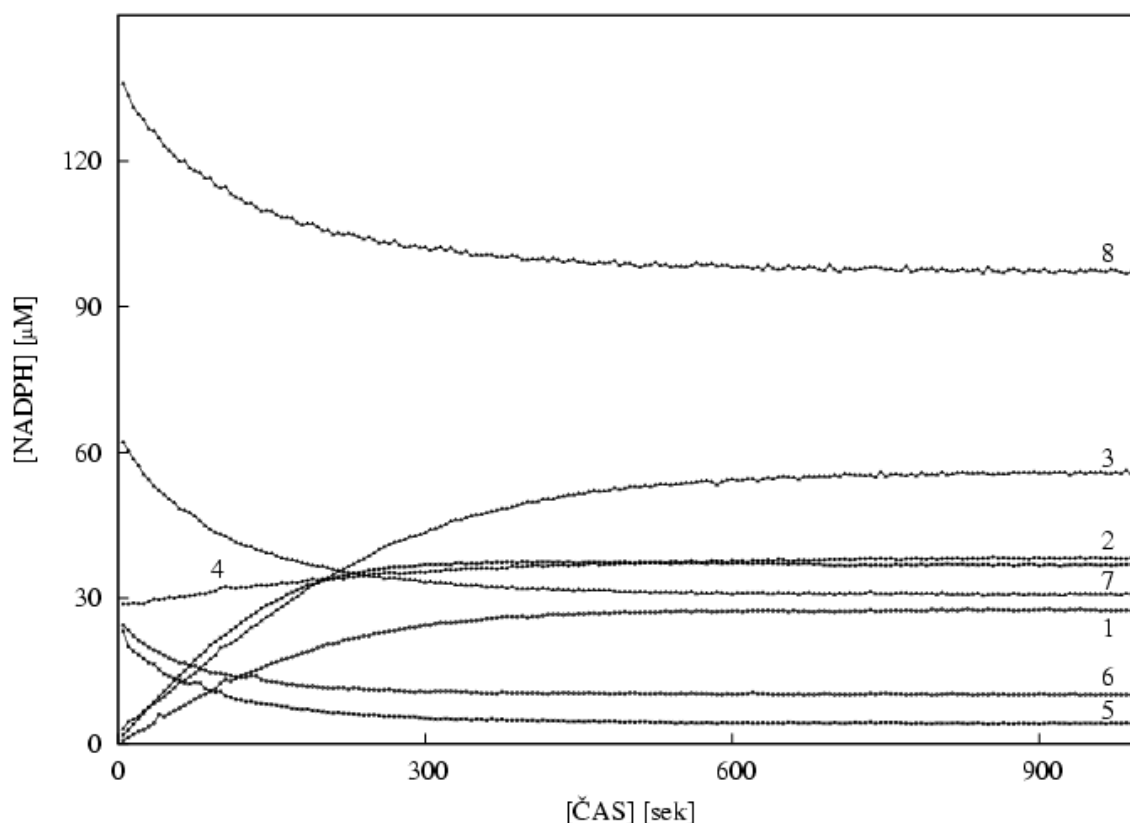
Krivulje v diagramih 1-7 na sliki 7 prikazujejo časovni potek nastajanja NADPH v odvisnosti od različnih koncentracij substrata pri različnih koncentracijah koencima v prisotnosti 17β -HSDcl, kot smo jih izmerili s klasičnim spektrofotometrom. Koncentracija nastalega NADPH je odvisna od začetnih koncentracij substrata in koencima. Začetne hitrosti reakcije so na posameznem diagramu enake in niso odvisne od koncentracije koencima. Na diagramu desno spodaj je prikazana linearna odvisnost začetnih hitrosti reakcije od koncentracije substrata. Zaradi slabe topnosti steroidov njihove koncentracije ni mogoče dvigniti do stopnje nasičenja, kjer bi se začetne hitrosti asimptotično približevale maksimalni vrednosti.



Slika 8: Časovni potek redukcije 4-estren-3,17-diona s 17 β -HSDcl v prisotnosti NADPH (diagrami 1-7); koncentracija 17 β -HSDcl je 0,5 μ M, koncentracije steroida od diagrama 1 do 7 naraščajo od 20 do 140 μ M, koncentracije koencima na posameznem diagramu naraščajo od 20 do 140 μ M; časovni potek reakcije na x-osi se giblje od 0 do 11 min. Diagram desno spodaj prikazuje začetne hitrosti reakcije pri pogojih na diagramih 1-7; koncentracija steroida je od 0 do 140 μ M, hitrosti redukcije 4-estren-3,17-diona na y-osi pa od 0 do 21 μ mol/min (številčne vrednosti so podane v Preglednici 3)

Krivulje v diagramih 1-7 na sliki 8 prikazujejo časovni potek padanja koncentracije NADPH v odvisnosti od različnih koncentracij substrata pri različnih koncentracijah koencima v prisotnosti 17 β -HSDcl. Začetne hitrosti reakcije so linearno odvisne od koncentracije substrata (diagram desno spodaj), glede na koncentracijo koencima pa se ne spreminjajo. Omejujoč dejavnik predstavlja zelo slaba topnost steroidov, zaradi česar ni mogoče doseči stopnje nasičenja. Končna koncentracija NADPH je odvisna od začetnih koncentracij substrata in koencima.

4.3.4 Meritve časovnega poteka oksidacije in redukcije do ravnotežja s klasičnim spektrofotometrom



Slika 9: Časovni potek oksidacije 4-estren-17 β -ol-3-ona (1-4) in redukcije 4-estren-3,17-diona (5-8) s 17 β -HSDcl v prisotnosti NADP⁺ oz. NADPH pri posebej izbranih pogojih, ki omogočajo razrešitev mehanizma reakcije.

krivulje 1-3: substrat 4-estren-17 β -ol-3-on 50, 100, 100 μ M, koencim NADP⁺ 50, 50, 100 μ M; krivulje 5-8: substrat 4-estren-3,17-dion 50, 100, 100, 100 μ M, koencim NADPH 50, 50, 100, 200 μ M; krivulja 4: 4-estren-17 β -ol-3-on, 4-estren-3,17-dion, NADP⁺ in NADPH, vsi 30 μ M; koncentracija encima 0,5 μ M

V prisotnosti 17 β -HSDcl smo zasledovali povečevanje in zmanjševanje koncentracije NADPH, ki je posledica pretvarjanja steroidov, in sicer do ravnotežja. Pri oksidaciji steroida, kjer je NADPH nastajal, smo kot substrat uporabili 4-estren-17 β -ol-3-on, pri redukciji, kjer se je NADPH porabljal, pa 4-estren-3,17-dion. Posamezne koncentracije reaktantov smo izbrali tako, da se je med meritvijo vsakokrat porabil eden izmed reaktantov. S tem smo pridobili podatke v celotnem merljivem območju reakcije, kar nam je omogočilo razrešitev mehanizma reakcije. Tu velja ponovno opozoriti, da zaradi slabe

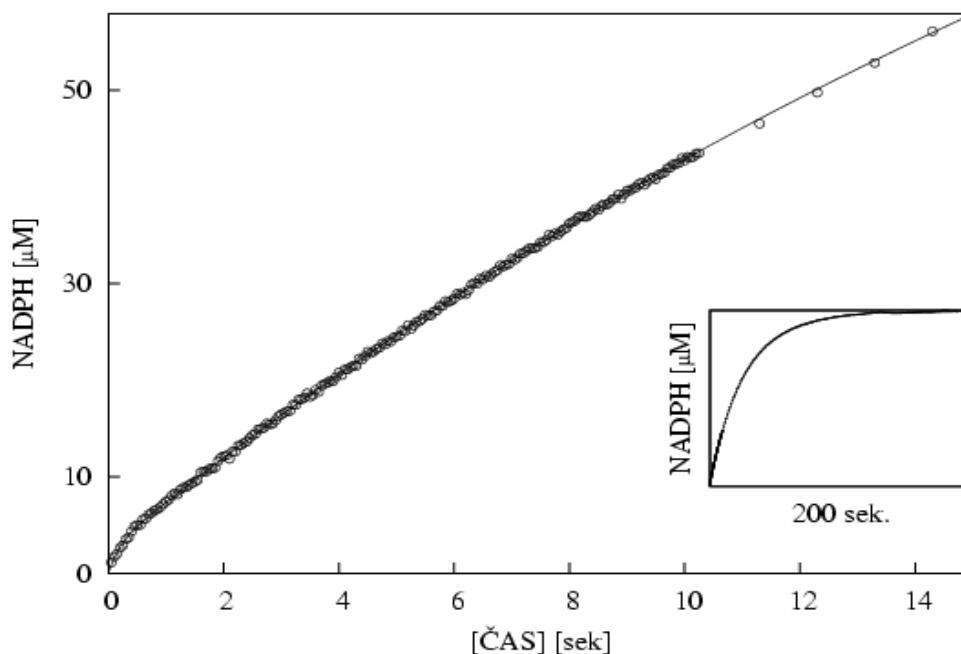
topnosti steroidov, le-teh ni bilo mogoče uporabiti v koncentracijah, ki bi zasitile kompleks encim-koencim.

Začetne hitrosti reakcije so zato linearno odvisne od koncentracije steroidov, kar izključuje kopičenje trojnega kompleksa encim-koencim-substrat. Po drugi strani, pa je afiniteta encima do koencimov tako velika, da se tudi ob dodatku najmanjše koncentracije koencima ves encim nahaja v kompleksu z njim. Kljub temu je mogoče pridobiti podatke tudi v območju delne zasičenosti encima s koencimom, in sicer v tistem delu poteka reakcije, ko se sistem približuje ravnotežju. Reakcijski mehanizem, ki vključuje vse ugotovljene značilnosti, je mogoče preveriti s sočasnim prilagajanjem koeficientov modelno specifičnih diferencialnih enačb za teoretični izračun vseh osmih krivulj na sliki 9. V preglednici 2 so podane značilne hitrostne konstante, s katerimi je ujemanje teoretičnih in eksperimentalnih krivulj izredno dobro. Iz preglednice je jasno, da je najpočasnejša stopnja v katalitičnem procesu pretvorbe steroidnega substrata s 17 β -HSDcl izstopanje pretvorjenega koencima in ne kopičenje trojnega kompleksa encim-koencim-steroid. Ternarni kompleks sicer nastane, vendar ga zaradi slabe topnosti steroidnih substratov ni mogoče nakopičiti.

Preglednica 4: Karakteristične hitrostne konstante za reakcije pretvorbe 4-estren-3,17-diona in 4-estren-17 β ol-3-ona v prisotnosti NADPH in NADP⁺ s 17 β -HSDcl.

k_{+1} (M ⁻¹ s ⁻¹)	1,77 +/- 0,20*10 ⁶
k_{-1} (s ⁻¹)	278,9 +/- 162,6
k_{+2} (M ⁻¹ s ⁻¹)	241703 +/- 128052
k_{-2} (M ⁻¹ s ⁻¹)	5162 +/- 24
k_{+3} (s ⁻¹)	1,04 +/- 0,02
k_{-3} (M ⁻¹ s ⁻¹)	1,13 +/- 0,13*10 ⁶

4.3.5 Meritev časovnega poteka prve pretvorbe 4-estren-17 β -ol-3-ona s 17 β -HSDcl v prisotnosti NADP⁺ z napravo za merjenje hitrih reakcij («stopped-flow«)



Slika 10: Časovni potek oksidacije 4-estren-17 β -ol-3-ona s 17 β -HSDcl v prisotnosti NADP⁺ pri visoki koncentraciji encima; koncentracija NADP⁺ je 400 μ M, koncentracija 17 β -HSDcl 4,7 μ M, koncentracija 4-estren-17 β -ol-3-ona 145 μ M.

Zadnja stopnja v preverjanju reakcijskega mehanizma je direktno merjenje kemijske oksidacije steroidnega substrata. Slika 10 prikazuje časovni potek oksidacije 4-estren-17 β -ol-3-ona s 17 β -HSDcl v prisotnosti NADP⁺ pri visoki koncentraciji encima. Reakcijo smo podrobno spremljali prvih deset sekund, celoten potek reakcije do nastanka ravnotežja pa smo merili 200 sekund. Potek reakcije v prvi sekundi predstavlja prvo pretvorbo pred sprostitvijo nastalega NADPH, ko je v raztopini prisoten le kompleks encim-koencim. V nadaljevanju poteka postane naklon krivulje bistveno položnejši, kar je dokaz, da je hitrost celotne reakcije omejena s hitrostjo izstopanja NADPH. To pa je tudi v skladu z visoko afiniteto 17 β -HSDcl do piridinskega koencima. Najpočasnejšo stopnjo v katalitičnem

procesu pretvorbe substrata s 17 β -HSDcl zato predstavlja izstopanje reduciranega koencima.

5 RAZPRAVA

Hidroksisteroid dehidrogenaze (HSD) so encimi, ki stereospecifično in reverzibilno katalizirajo pretvorbo hidroksilne skupine v ketonsko skupino ob prisotnosti koencima NAD⁺/NADP⁺ (Steroid nomenclature, 1990). Sesalski encimi sodelujejo pri biosintezi steroidnih hormonov v steroidogenih tkivih, v tarčnih tkivih pa uravnavajo količino biološko aktivnih steroidov (Penning, 1997). Bakterijske HSD sodelujejo v detoksifikaciji eksogenih steroidov in pri razgradnji steroidnega skeleta, kar jim predstavlja vir energije in v nekaterih primerih tudi glavni vir ogljika. Glivne HSD so manj raziskane, saj so do sedaj izolirali le dve 17 β -HSD, in sicer iz nitastih gliv *Cylindrocarpon radicicola* in *Cochliobolus lunatus*, klonirali pa le 17 β -HSD iz glive *C. lunatus* (17 β -HSDcl) (Lanišnik Rižner in sod., 1996; Lanišnik Rižner in sod., 1999).

Pred časom izdelani 3D model je pri 17 β -HSDcl razkril vse značilnosti proteinov naddružine SDR (Lanišnik Rižner in sod., 2000) in zelo uspešno omogočil usmerjene raziskave specifično mutiranih encimov (Kristan in sod., 2003; Kristan in sod., 2007; Brunskole in sod., 2009). Nedavno razrešena kristalna struktura (PDB vnos: 3IS3), ki se le zanemarljivo razlikuje od modela, je potrdila vsa predvidevanja in dodatno potrdila idejo o katalitičnem mehanizmu tega encima (Lanišnik Rižner in sod., 2000). S skrbno načrtovanimi kinetičnimi poskusi je v splošnem tak potek dogodkov mogoče dokazati. Ob tem pa je treba poskuse izpeljati v razmerah, ko se posamezni vmesni produkti kopičijo v zadostnih količinah. To opazimo s kvalitativnim ogledom eksperimentalnih krivulj, kvantitativno pa z ustrežno analizo. Rdeča nit vseh dosedanjih, in tudi te raziskave, je bila zato enolična določitev vseh kinetičnih parametrov v predpostavljeni reakcijski shemi, saj ujemanje eksperimenta s teorijo močno podpira razumevanje dogodkov na molekularnem nivoju. Zaradi posebnosti sistema, v katerem sodelujejo zelo slabo topni steroidni substrati, pa se je vedno pokazalo, da se med katalitičnim procesom ternarni kompleks encim-koencim-substrat ne kopiči v zadostnih količinah in ga zato ni bilo mogoče dokazati. Splošen zaporedni bi-bi reakcijski mehanizem se v takih primerih poenostavi. V vrsti kinetičnih poskusov smo uspeli določiti hitrostne konstante, značilne za poenostavljen, t.i. Theorell-Chanceov reakcijski mehanizem, in sicer za rekombinantno 17 β -HSDcl ter več njenih mutantov. Poleg slabe topnosti steroidnih substratov je, tako kakor pri večini proteinov z Rossmanovim zvitjem, tudi pri 17 β -HSDcl afiniteta encima do koencima zelo

velika. Zato se je uveljavilo prepričanje, da je izstopanje vezanega piridinskega nukleotida najpočasnejša stopnja v reakcijskem mehanizmu, kar smo s posebej načrtovanim poskusom tudi prvič dokazali.

Uporabili smo rekombinantni encim, pridobljen z izražanjem gena, ki smo ga predhodno vnesli v bakterijo *E. coli*. Aktivnost prečiščene rekombinantne 17 β -HSDcl smo določali s pomočjo klasične spektrofotometrije in naprave za merjenje hitrih reakcij (stopped-flow), in sicer tako, da smo pri 340 nm merili absorbanco NADPH v reakcijski raztopini. NADPH je pri reakciji oksidacije 4-estren-17 β -ol-3-ona v 4-estren-3,17-dion nastajal, pri redukciji 4-estren-3,17-diona v 4-estren-17 β -ol-3-on pa se je porabljal.

V prvem poskusu smo na klasičnem spektrofotometru merili časovni potek spreminjanja absorbance NADPH pri sedmih različnih začetnih koncentracijah koencima in substrata (sliki 7 in 8). Iz začetnih hitrosti reakcije, določenih v obeh smereh, smo izdelali diagrama odvisnosti začetnih hitrosti od koncentracije steroidnega substrata (desna spodnja diagrama na slikah 7 in 8). Ta odvisnost je v obeh smereh reakcije linearna in je popolnoma v skladu s pričakovanji. Zaradi njihove slabe topnosti, koncentracij steroidnih substratov ni mogoče dvigniti do stopnje nasičenja v kompleks encim-koencim-substrat, kjer bi se začetne hitrosti asimptotično približevale maksimalni hitrosti reakcije.

V drugem poskusu smo na napravi za merjenje hitrih reakcij želeli neposredno identificirati najpočasnejšo stopnjo v reakcijskem mehanizmu. Zaradi narave teh poskusov smo reakcijo lahko zasledovali le v smeri oksidacije, saj bi se zaradi prevelike začetne koncentracije reduciranega piridinskega koencima (NADPH) meritve začele pri prevelikih vrednostih absorbance. Najpomembnejša značilnost tega poskusa je, da smo uporabili visoko koncentracijo encima, povezanega v kompleks encim-koencim (holoencim), ki ob dodatku substrata, še preden reducirani koencim disociira in se zamenja z novim, omogoča zanesljivo zasledovanje spreminjanja absorbance. Zaradi relativno nizkega absorpcijskega koeficienta koencima NADPH je bila potrebna koncentracija encima nekaj mikromolarna. Seveda pa tako visoka koncentracija encima zelo pospeši reakcijo, ki jo je mogoče zasledovati le na napravi stopped-flow. Dodatno je potrebno uporabiti prebitno koncentracijo koencima: po eni strani zato, da ves encim steroidni substrat pričaka v obliki kompleksa encim-koencim, po drugi strani pa zato, da se koncentracija koencima med kasnejšo popolno pretvorbo steroidnega substrata le minimalno zmanjša. Zaradi tega je srednji del osrednje krivulje na sliki 10 nekaj časa praktično linearen, vendar z drugačnim naklonom kot tangenta skozi izhodišče. Ker pa je naklon srednjega dela krivulje na sliki 10

manjši od začetnega, je to dokaz, da je disociacija pretvorjenega koencima najpočasnejša stopnja v katalitičnem procesu pretvorbe steroidnega substrata s 17 β -HSDcl.

S tema dvema poskusoma smo kvalitativno dokazali na začetku postavljene hipotezi, da se v katalitični pretvorbi steroidnega substrata s 17 β -HSDcl ternarni kompleks encim-koencim-substrat ne kopiči, in da je najpočasnejša stopnja zasledovane encimsko katalizirane reakcije izstopanje pretvorjenega koencima. Da bi to tudi kvantitativno podprli, smo morali ponoviti nekatere predhodne poskuse.

Najprej smo želeli ponovno izmeriti ravnotežno konstanto v reakciji med steroidnima substratoma z obema oblikama fosforiliranega piridinskega koencima. Čeprav ravnotežna konstanta ni odvisna od encima, je to prva od šestih neznank pri določanju kinetičnih parametrov reakcije. Pri tem smo uporabili encim le, da smo reakcijo čimprej privedli v ravnotežje. Iz dodanih začetnih in fotometrično izmerjenih ravnotežnih koncentracij, smo po stehiometričnih principih izračunali vrednost ravnotežne konstante: pri pH=8 je enaka 0,4. To je za kinetične študije izredno ugodno, saj omogoča skoraj idealne meritve v obe smeri.

Naslednji dve neznanki Theorell-Chance-ovega reakcijskega mehanizma smo dobili iz poskusov, kjer smo encim titrirali z obema oblikama koencima in to zasledovali z merjenjem spremembe intrinzične triptofanske fluorescence. Ta eksperimentalna metoda se je pri 17 β -HSDcl pokazala kot zelo primerna. Zadnji kristalografski podatki razkrivajo, da se najobsežnejše konformacijske spremembe pri 17 β -HSDcl zgodijo prav ob vezavi koencima, ko se premakne Trp239, ki leži na meji najbolj gibljive zanke v proteinu. S temi poskusi smo določili vezavni konstanti za oba koencima in med njima potrdili precejšnjo razliko. Kljub temu, da naj bi po naših predvidevanjih reakcija pri *C. lunatus* potekala v smeri redukcije steroidnega substrata, je afiniteta za oksidirano obliko koencima skoraj cel velikostni razred večja od afinitete za reducirano obliko. Navidezno nasprotje je mogoče razložiti s tem, da je v celicah koncentracija NADP⁺ približno 100-krat nižja, kar ravnotežje kljub večji afiniteti močno premakne v smeri redukcije steroida.

Za določitev preostalih treh kinetičnih neznank v reakciji moramo uporabiti časovni potek nastajanja in padanja koncentracije NADPH od začetka do ravnotežja, in sicer izmerjene v obeh smereh (Slika 9). Analiza takih krivulj ni trivialna, vendar jo je mogoče elegantno izpeljati z uporabo ustreznega računalniškega programa. Program, ki uporablja numerično metodo za izračun časovnega poteka posameznih intermediatov iz ustreznih diferencialnih enačb predpostavljene Theorell-Chance-ove reakcijske sheme (enačbe 2-8), je od

nedavnega implementiran kot spletni strežnik ENZO (Bevc in sod., 2011). Izmed vseh krivulj časovnega poteka na slikah 7 in 8 smo izbrali le osem najbolj značilnih, in sicer takih, ki vsebujejo informacije v celotnem merljivem območju koncentracij reaktantov. Na sliki 5 so krivulje, kjer smo reakcije začeli z enakimi koncentracijami vseh štirih reaktantov. Dodatna osma krivulja pa kaže razmere, ko so bile koncentracije že ravnotežne, zato se med meritvijo absorbanca ni spreminjala.

Z analiziranjem vseh rezultatov smo uspeli določiti vse kinetične parametre in tako razrešiti teoretično reakcijsko shemo za pretvorbo steroidnih substratov s 17 β -HSDcl v prisotnosti ustreznih piridinskih koencimov. Preostanek smo posvetili zadnjemu križnemu preverjanju dobljenih hitrostnih konstant z analizo krivulje iz poskusa na stopped flow napravi. Tudi to smo izvedli na spletnem strežniku ENZO in za prve približke uporabili kar prej ocenjene konstante. V preglednici 4 so zapisane vrednosti hitrostnih konstant, ki smo jih določili s prilagajanjem koeficientov diferencialnih enačb, pri čemer smo razmerja konstant fiksirali tako, kot smo jih določili iz meritev ravnotežja in titracije encima s koencimoma. Zelo majhne razlike v številčnih vrednostih so močan dokaz o pravilnosti kompleksnega razmišljanja pri identifikaciji kvalitativnih in analizi kvantitativnih kinetičnih podatkov o delovanju 17 β -HSDcl.

6 SKLEPI

Kljub temu, da v glivnem primarnem metabolizmu ni steroidnih substratov, ima *C. lunatus* 17 β -hidroksisteroid dehidrogenazo, ki relativno dobro oksidira in reducira nekatere androgene in še posebno estrogene.

Zaradi velike afinitete encima do piridinskega koencima in zelo slabe topnosti steroidov je proučevanje reakcijskega mehanizma oteženo. Kljub nekaterim pomanjkljivostim je najprimernejši Theorell-Chanceov mehanizem, ki ne vključuje niti centralne izomerizacije niti ternarnih kompleksov. Theorell-Chanceov mehanizem predpostavlja urejeno dvosubstratno reakcijo (ordered Bi-Bi), pri kateri z večanjem koncentracije substrata ni mogoče doseči kopičenja ternarnega kompleksa encim-koencim-substrat. Vrstni red vezave je pomemben, saj se substrat lahko veže le na binarni kompleks encim-koencim, ne pa tudi na prost encim.

17 β -HSDcl kaže visoko afiniteto do piridinskega koencima, kar ima za posledico nizko hitrost izstopanja koencima. Intermediat, ki prevladuje med reakcijo, je kompleks encim-koencim (E-A, E-P), še posebej zato, ker je spektrofotometrično zasledovanje reakcije možno le v prebitnih koncentracijah koencima. 17 β -HSDcl je slab encim, zato mora biti njegova koncentracija med meritvijo približno enaka disociacijski konstanti koencima. Katalitska konstanta za pretvorbo steroidnih substratov s 17 β -HSDcl zato odseva hitrost izstopanja koencima in ne kemične pretvorbe substratov v produkte.

7 VIRI

- Brunskole M., Kristan K., Stojan J., Lanišnik Rižner T. 2009. Mutations that affect coenzyme binding and dimer formation of fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 301, 1-2: 47-50
- Engel P.C. 1977. *Enzyme kinetics: the steady-state approach*. London, Chapman and Hall: 96 str.
- Bevc S., Konc J., Stojan J., Hodošček M., Penca M., Praprotnik M., Janežič D. 2011. ENZO: a web tool for derivation and evaluation of kinetic models of enzyme catalyzed reactions. *PLoS ONE*, 6,7: e22265, doi:10.1371/journal.pone.0004242: 10 str.
- Filling C., Berndt K. D., Benach J., Knapp S., Prozorovski T., Nordling E., Ladenstein R., Jornvall H., Oppermann U. 2002. Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 25677-25684
- Fomitcheva J., Baker M.E., Anderson E., Lee G.Y., Aziz N. 1998. Characterization of Ke6, a new 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, and its expression in gonadal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 22664-22671
- He X.Z., Merz G., Mehta P., Schultz H., Yang S.-Y. 1999. Human brain short-chain L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase is a single domain multifunctional enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 15014-15019
- Humphrey W., Dalke A., Schulten, K. 1996. "VMD - Visual Molecular Dynamics". *Journal of Molecular Graphics*, 14: 33-38
- Jin Y., Penning T.M. 2007. Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47: 263-292
- Joernvall H., Persson B., Krook M., Atrian S., Gonzalez-Duarte R., Jeffery J., Ghosh D. 1995. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*, 34, 18: 6003-6013
- Kastelic-Suhadolc T., Lenasi H. 1993. Androgen binding proteins in *Cochliobolus lunatus*. *FEMS Microbiology Letters*, 108, 1: 121-125
- Kastelic-Suhadolc T., Plemenitaš A., Žigon D. 1994. Isolation and identification of testosterone and androstendione in the fungus *Cochliobolus lunatus*. *Steroids*, 59, 6: 357-361
- Kristan K. 2003. Pomen posameznih aminokislinskih ostankov pri delovanju 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze iz glive *Cochliobolus lunatus*-priprava in karakterizacija usmerjeno mutiranih proteinov. Magistrska naloga. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 116 str.

- Kristan K., Lanišnik Rižner T., Stojan J., Gerber J.K., Kremmer E., Adamski J. 2003. Significance of individual amino acid residues for coenzyme and substrate specificity of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase from the fungus *Cochliobolus lunatus*. *Chemico-Biological Interactions*, 143-144: 493-501
- Kristan K., Deluca D., Adamski J., Stojan J., Lanišnik Rižner T. 2005. Dimerization and enzymatic activity of fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase from the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *BMC Biochemistry*, 6: 28, doi: 10.1186/1471-2091-6-28: 10 str.
- Kristan K., Stojan J., Adamski J., Lanišnik Rižner T. 2007. Rational design of novel mutants of fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Biotechnology*, 129, 1: 123-130
- Krozowski Z. 1992. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the short-chain alcohol dehydrogenase (SCAD) superfamily. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 84, 1-2: C25-C31
- Krozowski Z. 1994. The short-chain alcohol dehydrogenase superfamily: variations on a common theme. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 51, 3-4: 125-130
- Lanišnik T., Žakelj-Mavrič M., Belič I. 1992. Fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *FEMS Microbiology Letters*, 78, 1: 49-52
- Lanišnik Rižner T. 1996. Izolacija in karakterizacija 17 β -hidroksisteroidne dehidrogenaze iz glive *Cochliobolus lunatus*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 202 str.
- Lanišnik Rižner T., Žakelj-Mavrič M., Plemenitaš A., Zorko M. 1996. Purification and characterization of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase from filamentous fungus *Cochliobolus lunatus*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 59, 2: 205-214
- Lanišnik Rižner T., Moeller G., Thole H.H., Žakelj-Mavrič M., Adamski J. 1999. A novel 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the fungus *Cochliobolus lunatus*: new insights into the evolution of steroid-hormone signalling. *Biochemical Journal*, 337: 425-431
- Lanišnik Rižner T., Žakelj-Mavrič M. 2000. Characterization of fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 127, 1: 53-63
- Lanišnik Rižner T., Adamski J., Stojan J. 2000. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase from *Cochliobolus lunatus*: model structure and substrate specificity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384, 2: 255-262
- Lanišnik Rižner T., Stojan J., Adamski J. 2001a. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase from the fungus *Cochliobolus lunatus*: structural and functional aspects. *Chemico-Biological Interactions*, 130-132: 793-803

- Lanišnik Rižner T., Stojan J., Adamski J. 2001b. Searching for the physiological function of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase from the fungus *Cochliobolus lunatus*: studies of substrate specificity and expression analysis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 171, 1-2: 193-198
- Lanišnik Rižner T., Adamski J., Žakelj-Mavrič M. 2001c. Expression of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in mesophilic and extremophilic yeast. *Steroids*, 66, 1: 49-54
- Laplante Y., Rancourt C., Poirier D. 2009. Relative involvement of three 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (types 1, 7 and 12) in the formation of estradiol in various breast cancer cell lines using selective inhibitors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 301, 1-2: 146-153
- Li A., Tedde R., Krozowski Z.S., Pala A., Li K.X.Z., Schakleton C.H.L., Mantero F., Palermo M., Stewart P.M. 1998. Molecular basis for hypertension in the 'type II variant' of apparent mineralocorticoid excess. *American Journal of Human Genetics*, 63, 2: 370-379
- Lin S.X., Han Q., Azzi A., Zhu D-W., Gangloff A., Campbell R.L. 1999. 3D-structure of human estrogenic 17 β -HSD1: binding with various steroids. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 69, 1-6: 425-429
- Masuzaki H., Paterson J., Shinyama H., Morton N.M., Mullins J.J., Seckl J.R., Flier J.S. 2001. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science*, 294: 2166-2170
- Mindnich R., Möller G., Adamski J. 2004. The role of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 218, 1-2: 7-20
- Oppermann U.C.T., Filling C., Jörnvall H. 2001. Forms and functions of human SDR enzymes. *Chemico-Biological Interactions*, 130-132: 699-705
- Oppermann U., Filling C., Hult M., Shafqat N., Wu X., Lindh M., Shafqat J., Nordling E., Kallberg Y., Persson B., Jörnvall H. 2003. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chemico-Biological Interactions*, 143-144: 247-253
- Penning T.M. 1997. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocrine Reviews*, 18: 281-305
- Persson B., Kallberg Y., Oppermann U., Jörnvall H. 2003. Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chemico-Biological Interactions*, 143-144: 271-278
- Persson B., Kallberg Y., Bray J.E., Bruford E., Dellaporta S.L., Favia A.D., Gonzalez Duarte R., Jörnvall H., Kavanagh K.L., Kedishvili N., Kisiela M., Maser E., Mindnich R., Orchard S., Penning T.M., Thornton J.M., Adamski J., Oppermann U. 2009. The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chemico-Biological Interactions*, 178, 1-3: 94-98

- Rozman D. 1993. Heterologna transformacija in steroidni metabolizem filamentozne glive *Cochliobolus lunatus*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 194 str.
- Steroid nomenclature, 1990. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 37, 1: VII-IX
- Yin S.J., Vagelopoulos N., Lundquist G., Jörnvall H. 1991. Pseudomonas 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, 197, 2: 359-365
- Žakelj-Mavrič M., Kastelic-Suhadolc T., Plemenitaš A., Lanišnik-Rižner T., Belič I. 1995. Steroid hormone signalling system and fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 112, 4: 637-642