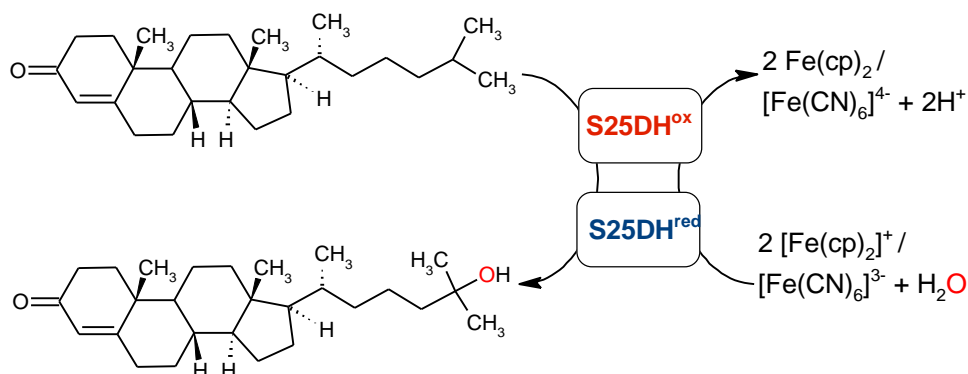


BADANIA NAD STRUKTURĄ I AKTYWNOŚCIĄ KATALITYCZNĄ DEHYDROGENAZY C25 STEROIDOWEJ Z *STEROLIBACTERIUM DENITRIFICANS*

A. Rugor^{*1}, A. Dudzik¹, N. Zawada¹, S. Mordalski², J. Staroń²,
A. Bojarski², M. Szaleniec¹

¹Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera PAN, ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska; ²Instytut Farmakologii PAN, ul. Smętna 12, 31-343 Kraków, Polska.

Dehydrogenaza C-25 steroidowa (S25DH) jest enzymem molibdenowy pochodzącym z denitrującej bakterii *Sterolibacterium denitrificans* Chol-1ST [1]. Katalizuje ona regioselektywną hydroksylację przy węglu C-25 łańcucha alifatycznego cholesterolu i jego pochodnych. Reakcja zachodzi w środowisku beztlenowym, a źródłem tlenu do utlenienia trzeciorzędowego atomu węgla w substracie jest cząsteczka wody. Reakcja katalizowana przez S25DH zachodzi według nieopisanego jak dotąd mechanizmu, chociaż postulowane jest jej podobieństwo do mechanizmu reakcji dehydrogenazy etylobenzenowej [2].



Rys. 1. Schemat reakcji katalizowanej przez S25DH. Enzym hydroksyluje cholest-4-en-3-on przy węglu C25 sam ulegając redukcji. Aktywność katalityczną odzyskuje w wyniku przyłączenia cząsteczki wody oraz re-utlenienia przez zewnętrzny akceptor elektronowy ([Fe(cp)₂]⁺ lub [Fe(CN)₆]³⁻).

Badania eksperymentalne i teoretyczne zmierzające do wyjaśnienia mechanizmu katalitycznego S25DH mają również wymiar aplikacyjny. S25DH jest proponowanym katalizatorem do produkcji 25-hydroksycholesterolu (25-HC), który jest m. in. regulatorem systemu odpornościowego komórek [3]. Enzym został pozyskany z materiału bakteryjnego według opracowanej przez nas uproszczonej procedury oczyszczania i zastosowany w syntezie hydroksylowanych produktów w wodnej mieszaninie reakcyjnej z wykorzystaniem reaktora mieszalnikowego typu fed-batch. Przeprowadzono również porównawcze testy katalityczne dla różnych pochodnych cholesterolu.

W celu przebadania mechanizmu reakcji istotny jest dostęp do struktury molekularnej biokatalizatora. Z uwagi na brak struktury krystalograficznej S25DH, stworzono model homologiczny katalitycznej podjednostki α w oparciu o sekwencję aminokwasową S25DH oraz strukturę przestrzenną dehydrogenazy etylobenzenowej z *Aromaticum aromatileum* EbN1 (2IVF) [4]. Strukturę podjednostki α enzymu

poddano optymalizacji geometrii i symulacjom dynamiki molekularnej. Tak opracowany model pozwolił na zadokowanie znanych substratów do centrum aktywnego i przeanalizowanie oddziaływań molekularnych pomiędzy resztami aminokwasowymi, kofaktorem molibdenowym i zadokowanymi substratami. Badania te miały na celu weryfikację istniejącego modelu homologicznego S25DH oraz stanowiły wstęp do dalszych badań nad mechanizmem katalitycznym reakcji.

Literatura

- [1] J. Dermer, G. Fuchs, J. Biol. Chem. 287 (2012) 36905
- [2] Y. Chiang i inni, Biotechnology 190 (2008) 905
- [3] J. G. McDonald, D. W. Russell J. Leukoc. Biol. 88 (2010) 1071
- [4] M. Szalenic i inni, Biochemisry 46 (2007) 7637

Podziękowania: Autorzy pragną podziękować za finansowanie badań Narodowemu Centrum Badań i Rozwoju (LIDER/33/147/L-3/11/NCBR/2012), Narodowemu Centrum Nauki (SONATA grant UMO-2012/05/D/ST4/00277) oraz za finansowanie w ramach projektu pn. Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „Nauki molekularne dla medycyny” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego - Program Operacyjny Kapitał Ludzki 2007-2013.