

Polski tytuł: „Enzymatyczne przygotowanie nowych odwodornionych pentacyklicznych triterpenów o znaczeniu farmakologicznym„

Angielski tytuł: “Enzymatic preparation of new dehydrogenated pentacyclic triterpenes of pharmacological importance”

Kierownik projektu: dr Agnieszka Wojtkiewicz

Numer projektu: 2024/54/E/ST4/00364

Celem projektu jest opracowanie bakteryjnej 3-ketosteroidowej dehydrogenazy (KstD), enzymu zdolnego do selektywnego odwodorniania steroidów oraz pentacyklicznych triterpenów (PTs) – naturalnych związków pochodzenia roślinnego o znacznym potencjale terapeutycznym. KstD wprowadza wiązanie podwójne pomiędzy atomami węgla C1 i C2 w pierścieniu A, prowadząc do powstania pochodnych $\Delta 1$, które wykazują zwiększoną aktywność biologiczną. Celem projektu jest otrzymanie nowych pochodnych $\Delta 1$, w szczególności $\Delta 1$ -PTs.

Pentacykliczne triterpeny są dobrze znane ze swoich silnych właściwości przeciwzapalnych, przeciwutleniających i regeneracyjnych i są szeroko stosowane w medycynie tradycyjnej. Jednak pochodne $\Delta 1$ -PT występują naturalnie w bardzo ograniczonych ilościach, co utrudniało ich szersze zastosowanie farmakologiczne. Projekt ma na celu przezwycięzenie tego ograniczenia poprzez zastosowanie zaawansowanych metod biotechnologicznych w celu wydajnej syntezy pochodnych $\Delta 1$ -PT.

Centralnym punktem projektu jest enzym KstD. Określony wariant KstD zidentyfikowany we wcześniejszych badaniach jest pierwszym enzymem, który wykazano, że katalizuje odwodornianie PTs. Projekt będzie badał zależność pomiędzy strukturą i funkcją KstD, koncentrując się na jego zdolności do przekształcania PTs i steroidów w pochodne $\Delta 1$. Szczególny nacisk zostanie położony na zrozumienie specyficzności substratowej enzymu oraz jego roli w ramach zróżnicowanej rodziny KstD.

Jednym z kluczowych celów projektu jest wyznaczenie struktury krystalicznej KstD, co stanowi kluczowy krok w powiązaniu cech strukturalnych enzymu z jego funkcją katalityczną. Modelowanie strukturalne zostanie przeprowadzone z wykorzystaniem różnych substratów, co umożliwi identyfikację kluczowych aminokwasów biorących udział w wiązaniu substratu i katalizie. Modele te zostaną uzupełnione obliczeniami energii oddziaływań, co pozwoli na głębsze zrozumienie kompleksu enzym–substrat (E:S) na poziomie molekularnym. Wyniki teoretyczne zostaną zweryfikowane i uzupełnione danymi kinetycznymi.

Warianty KstD o zwiększonej aktywności katalitycznej lub zmienionej specyficzności substratowej zostaną uzyskane metodą ewolucji ukierunkowanej oraz mutagenezy miejscowej. Dla otrzymanych wariantów enzymu zostaną określone parametry kinetyczne dla różnych PTs, z wykorzystaniem metod kinetyki stanu stacjonarnego, stanu przed ustaleniem stanu stacjonarnego oraz technik elektrochemicznych. Dane te, w połączeniu z analizą określonego regionu w pobliżu kieszeni wiążącej substrat, który uznawany jest za kluczowy dla preferencji substratowej, pozwolą na kompleksowe zrozumienie interakcji wariantów enzymu z różnymi substratami.

Drugim głównym celem projektu jest identyfikacja i charakterystyka nowych pochodnych $\Delta 1$ -PT i $\Delta 1$ -steroidów o potencjale terapeutycznym. Związki te będą syntetyzowane enzymatycznie, oczyszczane i poddawane szerokiemu wachlarzowi testów biologicznych. Ich właściwości antyoksydacyjne, przeciwzapalne i regeneracyjne będą oceniane za pomocą testów przeżywalności komórek z wykorzystaniem ludzkich fibroblastów i linii komórek nowotworowych. Dodatkowo zostaną przeprowadzone badania cytotoksyczności w celu określenia wartości IC₅₀, co pozwoli ocenić bezpieczeństwo i skuteczność terapeutyczną tych związków, jak również właściwości przeciwdrobnoustrojowe i przeciwgrzybicze pochodnych $\Delta 1$ wobec patogenów takich jak *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* oraz *A. niger*.

Projekt odegra istotną rolę w rozwoju doktoranta i sześciu członków zespołu, umożliwiając im zdobycie zaawansowanych umiejętności z zakresu biologii molekularnej, inżynierii enzymów oraz technik katalitycznych. Drugi doktorant pogłębi swoją wiedzę w zakresie obliczeń teoretycznych, modelowania molekularnego i bioinformatyki, natomiast dwaj młodzi naukowcy po doktoracie zdobędą doświadczenie w testach biologicznych i ocenie aktywności terapeutycznej. Projekt umożliwi również kierownikowi zdobycie

cennego doświadczenia w prowadzeniu zespołu interdyscyplinarnego oraz zarządzaniu projektem naukowym, a także nawiązanie i rozwój współpracy międzynarodowej. Zostanie pogłębiona współpraca z czołowymi instytucjami, takimi jak Instytut Maxa Plancka w Niemczech i Uniwersytet Queensland w Australii. Dzięki integracji podejścia eksperymentalnego i teoretycznego projekt przyczyni się do lepszego zrozumienia funkcji enzymu KstD i jego potencjału w syntezie biologicznie aktywnych pochodnych $\Delta 1$, które mogą prowadzić do opracowania nowych kandydatów na leki przeciwnowotworowe, przeciwzapalne i neuroprotekcyjne.