



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ДЕПАРТМАН ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ



Јована Плавша

**Идентификација и анализа потенцијалних супстрата и инхибитора
хуманих протеина подфамилије 1С алдо-кето редуктаза (AKR1C)
добијених рекомбинантном експресијом**

- докторска дисертација -

Нови Сад, 2018.

ЗАХВАЛНИЦА

Део резултата која обухвата теза не би постојали да није било сарадње са лабораторијама у Љубљани и Прагу и овим путем се захваљујем колабораторима на дивној сарадњи и великом знању које сам стекла радећи са њима. Поред њих захваљујем се и свим другим колабораторима из иностранства који су нам помогли како саветима и консултацијама тако и слањем својих материјала.

Захваљујем се свим сарадницима са Департмана за хемију, превасходно групи професорице Сакач Марије (Кузминац Ивани, Ајдуковић Јовани, Савић Марини), без чијих једињења не би били установљени нови инхибитори.

Велику захвалност дугујем колегама Стефановић Миломиру, Атлагић Кристини, Башица Бранки и Петровић Јелени који су ми били и још су велика подршка и потпора како у науци тако и приватно.

Захваљујем се руководиоцу пројекта Благојевић Душку, што ме је прихватио прво као стипендисту, а затим и као истраживача на пројекту.

Посебну захвалност дугујем колегама у лабораторији у којој сам радила и мастер и докторат: Бекић Софији и Мариновић Маји на свакодневном заједничком преживљавању и приватних и пословних изазова, Челић Тањи на константној подршци и дивним успоменама са путовања, Узелац Иви и Аврамов Милошу на незаборавним вежбама, Вукашиновић Елвири и Орчић Снежани што су ми биле старије сестре, Блануша Ани на нашим малим разговорима, Поповић Жељку што је био одличан саветник, професорицама Пураћ Јелени, Којић Данијели и Ћелић Анђелки на свакодневној сарадњи и наравно ментору, професору Петри Едварду пре свега што ме је прихватио као докторанта, затим што ми је омогућио да радим на оваквој теми и што сам кроз пројекте имала прилику да упознам дивне и кључне људе у мом животу.

Међутим, ове тезе данас не би било да није било подршке од стране целе моје породице, с тога, мама и тата посебно вам се захваљујем на свим и лепим речима али и расправама, на подршци у свим мојим одлукама које и нису увек биле баш најбоље и што и даље бринете „да ли сам јела и да ли имам довољно пара“. Апсолутно посебну захвалност дугујем сестри Ана Бојани која је успела да ме истрпи и буде подршка и здрав разум у свим мојим фазама, расположењима и стањима. У оквиру овог дела се захваљујем и билатерали са Словенијом, која ми је омогућила да се данас за мотивацију, подстицај, емотивну испуњеност и „борбу да не будем испод црте“ захвалим мом Виду.

Листа илустрација

Слика 1. Редукција карбнилне групе у хидроксилну катализована са АКР протеином уз употребу кофактора NAD(P)H.	2
Слика 2. Приказ структурне организације АКР1С3.	4
Слика 3. Механизам „гурај-повуци“ за кисело-базну катализу код АКР ензима.	5
Слика 4. Приказ каталитичке тетраде активног места АКР1С протеина.	6
Слика 5. Поравнате аминокиселинске секвенце хуманих протеина чланова АКР1С подфамилије: АКР1С1, С2, С3 и С4.	9
Слика 6. Увећани приказ активног места, са приказима подцепова на примеру АКР1С3.	10
Слика 7. Шаблон стероидног једињења са нумерисаним атомима угљеника и обележеним прстеновима.	12
Слика 8. Ензими, њихова ћелијска локација, супстрати и производи у хуманој стероидогенези.	13
Слика 9. Структурна организација Росмановог чвора (лево) и ТИМ бурета (десно).	14
Слика 10. Геномско и негеномско дејство стероидних хормона и њихови сигнални путеви.	16
Слика 11. Структуре главних мушких хормона: тестостерон, дихидротестостерон, андростенедиол.	17
Слика 12. Путеви метаболисања С19 андрогена.	17
Слика 13. Структуре три главна естрогена: естрон, естриол и естрадиол.	18
Слика 14. Главне руте метаболизма естрадиола.	19
Слика 15. Структура прогестерона.	19
Слика 16. Општи приказ зависности концентрације супстрата и брзине реакције са обележеним K_m и V_{max} .	27
Слика 17. Хемијске структуре репрезентативних инхибитора АКР1С3 и њихов инхибиторни потенцијал према АКР1С3 и изоформама С1 и С2.	31
Слика 18. Део путева стероидогенезе у ћелији простете.	34
Слика 19. Структуре абиратерона (Аbi), ензалутамида (ЕНZ) и апалутамида (АРN-509).	35
Слика 20. Структуре инхибитора АКР1С3 са стероидном основом.	36
Слика 21. Структуре нестероидних инхибитора АКР1С3.	37
Слика 22. Структуре једињења из биљака које имају инхибиторни потенцијал према АКР1С3.	38
Слика 23. Структура стилопина, изоквинолног алкалоида.	38
Слика 24. Окупираност лиганд везујућег места у оквиру АКР1С3 протеина са инхибиторима ЕМ1404, биматопрост, флуфенамском киселином и индометацином.	41
Слика 25. Окупираност лиганд везујућег места у оквиру АКР1С3 протеина са NSAID инхибиторима.	42
Слика 26. Поједностављени кораци у молекуларном клонирању.	44
Слика 27. Прекомерна експресија протеина употребом стандардне <i>in vivo</i> технике у односу на протеинску синтезу без ћелија.	45
Слика 28. Лас оперон.	51
Слика 29. рЕТ вектор, систем функционисања и пример вектора са основним елементима.	53
Слика 30. Пример приказа информација за рЕТ-28a(+) плазмид са свим пропратним подацима.	55
Слика 31. Шема и визуелни приказ типичног протокола за усидравање.	60
Слика 32. Упрошћен приказ снимања дифракције X-зрака.	61
Слика 33. Методе за кристализацију протеина, уздужни пресеци бунара.	64
Слика 34. Поставка експеримента за кристализацију у капиларама.	65
Слика 35. Приказ једне плоче са 96 бунара и постепено увећани делови плоче са шаблоном распореда подбунара.	66
Слика 36. Упрошћен приказ апаратуре и процедуре снимања кристала и детекције дифракције, редослед корака у решавању структуре протеина употребом кристалографије.	67
Слика 37. Општи приказ грађе и структуре једног синхротрона.	68
Слика 38. Приказ екрана са снимљеном дифракцијом протеина АКР1С3.	69
Слика 39. Разлика изгледа детаља у структури при различитим резолуцијама.	71
Слика 40. А – структура познатог супстрата за АКР, фенантренеквинон, PQ; Б – структура познатог инхибитора за АКР, ибупрофен, IBU.	75
Слика 41. Анализа плаزمида употребом 1% агарозне електрофорезе.	96
Слика 42. Узорци протеина бактерија након 1, 3 и 18 сати од индукције на 0,6 и 0,8 оптичке густине бактерија.	98
Слика 43. Приказ протеина у узорцима који су индуковани са 0,1 mM IPTG, при 0,6 оптичкој густини, индуковани 18 сати и све то при температурама индукције од 10°C и 23°C.	99

Слика 44. Протеин 17 β HSD1 у различитим фазама индукције и пречишћавања приказано на SDS-PAGE гелу.	99
Слика 45. Пречишћавање AKR1C3 обележеног са GST.	100
Слика 46. Приказ AKR1C3 протеина (37 kDa) кроз различите фазе од неиндуковане бактеријске културе до елуата после никл колоне.	101
Слика 47. Приказ протеина AKR1C3 у различитим фракцијама након гел-филтрационе колоне.	102
Слика 48. Приказ фаза пречишћавања изоформи AKR1C1,2 и 4.	103
Слика 49. Графички приказ оксидативне активности различитих концентрација AKR1C3 у присуству естрадиола.	104
Слика 50. Графички приказ оксидативне активности AKR1C3 са и без додатног етанола у систему.	104
Слика 51. Графички приказ утицаја прединкубације на инхибиторно дејство једињења NSN на активност AKR1C3.	105
Слика 52. Активност AKR1C3 протеина у различитим концентрацијама (mg/ml), приказана променом апсорбанце на 340 nm током времена.	107
Слика 53. Разлика у вредностима промена апсорбанци, мерених на различитим врстама микротитар плоча, са различитим периодима прединкубација, различитим концентрацијама протеина и при различитим температурама одвијања реакције.	108
Слика 54. Разлика у промени апсорбанце у периоду мерења у 10 минута са и без кофактора NADP+ који је био додат пре аликвотирања и замрзавања протеина	109
Слика 55. Разлике у паду криве као одговор на различиту комбинацију концентрација IBU као инхибитора и PQ као супстрата.	110
Слика 56. Графички приказ зависности ензимске активности AKR1C3 од концентрације супстрата (PQ).	111
Слика 57. Упоредни приказ инхибиције ибупрофена у присуству 0.39 и 12.5 μ M концентрације PQ.	111
Слика 58. Некомпетитивна инхибиција активности AKR1C3. Есеј је тестиран са 4 различите концентрације ибупрофена у комбинацији са различитим концентрацијама PQ као супстрата.	112
Слика 59. Приказ (не)промене апсорбанце током времена у случају тестирања активности изоформе C1 у трипликату са PQ (ред А) и IBU (ред В).	113
Слика 60. Разлика у активности између AKR1C1 и AKR1C3 изоформе протеина у присуству кофактора различитих произвођача.	113
Слика 61. Активност AKR1C2 са и без додатног кофактора пре замрзавања.	114
Слика 62. Промена апсорбанце на 340 nm као приказ активности протеина AKR1C4 тестираног са супстратом PQ и инхибитором IBU.	115
Слика 63 Ензимски есеј са AKR1C1 изоформом и различитим једињењима.	116
Слика 64. Промена апсорбанце на 340 nm услед активности AKR1C2 изоформе са лактонима и Ф јединињима (лево) и са пикотил и пикотинилиден (десно).	117
Слика 65. Промена апсорбанце приликом тестирања реакција редукције у присуству три сета модификованих стероида на изоформи AKR1C3.	118
Слика 66. Графички приказ промене апсорбанце (y-оса) као одговора на утицај активности AKR1C3 ензима приликом тестирања са пико и пикотинилиден једињењима, и са једињењима која поседују лактон или отворен D прстен са хидроксилном групом на C3.	119
Слика 67. Графички приказ промене апсорбанце услед утицаја тестираних пико и пикотинилиден деривата са различитим групама на C3 атому на активност AKR1C3 ензима.	120
Слика 68. Графички приказ првог тестирања редукције ензима са екстрактима вирка (<i>A. vulgaris</i>).	121
Слика 68. Графички приказ тестирања редукције ензима AKR1C3 са екстрактима вирка (<i>A. vulgaris</i>), са замрзнутим (Vz) и свеже припремљеним (Vs) чајем.	122
Слика 69. Графички приказ тестирања редукције ензима са екстрактима вирка (<i>A. vulgaris</i>), имеле (<i>V. album</i>) и боровнице (<i>V. myrtillus</i>).	122
Слика 70. Кључне интеракције у везивању андростенедиона (лево, PDB ID 1XF0) и простагландина (десно, PDB ID 1RY0) у активном месту протеина AKR1C3.	124
Слика 71. Приказ структура доксорубина и рубицинола (слика горе). Доле: Положаја доксорубина у односу на андростенедион у активном месту AKR1C3 протеина.	126
Слика 72. Кључне интеракције у везивању ибупрофена у активном месту AKR1C3; PDB ID: 3R8G.	126
Слика 73. Аналитичка гел-филтрација AKR1C3 протеина (црвена линија) са једним врхом на 88,9ml.	133
Слика 74. Чистоћа протеина AKR1C3 припреманог за кристализацију после гел-филтрационе колоне.	134

Слика 75. Приказ хомогеног и нехомогеног узорка протеина AKR1C3 припремљеног за кристализацију и проверено употребом DLS-а.	135
Слика 76. Резултати изналажења кристализације из Morpheus (гопе) и PEGs Suite (доле).	138
Слика 77. Поређење морфологије и квалитета дифракције кристала који су настали у недостатку (лево) и присуству (десно) тромбина у Morpheus условима D1, однос протеина према преципитату у виду капљице 1:1 (a), D4, 1:1 (b), и F1, 1:2 (c).	139
Слика 78. Иницијална мапа електронске густине за AKR1C3.	142
Слика 79. Радна верзија утачњавања комплекса AKR1C3+ NADP ⁺ +AKR-7.	144
Слика 80. Структура инхибитора EM1404 са окружењем у активном месту AKR1C3.	146
Слика 81. Положај једињења 7 и EM1404 (PDB ID 1ZQ5) у везујућем месту AKR1C3 после препоклапања.	146
Слика 82. Радна верзија утачњавања комплекса AKR1C3+ NADP ⁺ +AKR-19.	148
Слика 83. Поређење једињења AKR-19 са EM1404.	149
Слика 84. Преклопљене структуре комплекса протеина AKR1C3 са кофактором NADP ⁺ (сиво-наранџасто) и инхибиторима AKR-7 (зелено) и AKR-19 (жуто).	150

Листа табела

Табела 1. Улога хуманих AKR у болести и здрављу.	11
Табела 2. Структуре протеина AKR1C3 на PDB-у са различитим лигандима.	39
Табела 3. Преглед коришћених плазида и њихове основне карактеристике.	74
Табела 4. Структуре тестираних синтетисаних једињења у есејима са AKR1C ензимима.	76
Табела 5. Тестирана комерцијална једињења 2-нитробензалдехид (2-NBA), р-нитробензалдехид (pNBA) и 1-нитросонафтол (2) (NSN).	75
Табела 6. Вредности нагиба криве која представља ток реакције оксидације у присуству различитих комерцијалних једињења (100 μ M) и проценат инхибиције оксидативне активности AKR1C3 изоформе на основу првих 10 минута..	106
Табела 7. Процент инхибиције активности AKR1C3 ензима у комбинацији различитих концентрација ибупрофена и фенантренеквинона.	112
Табела 8. Инхибиција активности AKR1C3 протеина употребом различитих једињења, изражено у процентима (%).	120
Табела 9. Ефекат инхибиције (%) тестираних пиколит и пиколинилиден једињења на активност AKR1C3.	120
Табела 10. Структуре тестираних једињења која су у есејима са AKR1C3 ензимом показала инхибиторно својство (AKR-22 и NSN у оксидацији, а остали у редукцији).	124
Табела 11. Енергије везивања за једињења са најбољим инхибиторним потенцијалом и њихова оријентација са најмањом енергијом везивања у активном месту AKR1C3 протеина.	127
Табела 12. Приказ вредности кинетичких параметара за неке од најбољих инхибитора.	131
Табела 13. Упоредни приказ различитих вредности из различитих експеримената из литературе и из експеримената у оквиру ове дисертације за најбољих 7 једињења.	132
Табела 14. Хронолошки и упоредни приказ структура на AKR1C3 на PDB, са информацијама о резолуцији, обележивачу, вектору и просторној групи.	136
Табела 15. Едманово секвенцирање AKR1C3 кристала израслих/насталих у присуству тромбина.	140
Табела 16. Статистика сакупљених дифракционих података.	141
Табела 17. Списак тестираних инхибитора у кокристализацији, резолуција структуре и стање у везном месту.	144

Листа скраћеница

Abi	Абиратерон ацетат
AKR	Суперфамилија алдо-кето редуктаза
AKR1C	Подфамилија C, фамилија 1, суперфамилија AKR
SC	Стероидни канал
OX	Оксианјон место
SP1, 2, 3	Подцепови 1, 2 и 3
AR	Андрогени рецептор
bp	Базни парови
GABA	Рецептор А γ аминокбутиричне киселине
DMSO	Диметил сулфоксид
ДНК	Дезоксирибонуклеинска киселина
DHEA	Дехидроепиандростерон
DHT	Дихидротестостерон
DTT	Дитиотреитол
EDTA	Етилендиаминтетрасирћетна киселина
ER β	Естрогени рецептор β
FPLC	Брза протеинска течна хроматографија (<i>енгл.</i> fast protein liquid chromatography)
IPTG	Изопропил- β -Д-тиогалактопиранозид (<i>енгл.</i> isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)
LB	Luria Bertani медијум
MAPK	Протеин киназа активирана митогеном
NAD ⁺	β -никотинамид аденин динуклеотид
NADH	β -никотинамид аденин динуклеотид редуковани
NADP ⁺	β -никотинамид аденин динуклеотид фосфат
NADPH	β -никотинамид аденин динуклеотид фосфат, редуковани
NSAID	Нестероидни антиинфламаторни лекови (<i>енгл.</i> non-steroidal anti-inflammatory drugs)
PCR	Ланчана реакција полимеразе
PDB	Протеинска база података (<i>енгл.</i> The Protein Data Bank)
PGD ₂	Простагландин D2
PGF _{2α}	Простагландин F2 α
PGFS	Простагландин F синтаза
PGH ₂	Простагландин H2
PHK	Рибонуклеинска киселина
PQ	9,10-фенантренеквиноне
SDR	Кратко-ланчане дехидрогеназе/редуктазе
SHBG	Глобулин који везују стероидне хормоне (<i>енгл.</i> steroid hormone-binding globulin)
SAR	Веза структуре и активности (<i>енгл.</i> structure-activity relationship)
TIM буре	Буре триозофосфат изомеразе
HSD	Хидроксистероид дехидрогеназа
CRPC	Канцер простате резистентан на кастрацију
CYP	Цитохром протеини (фамилија монооксигеназа са хемом као кофактором)

САДРЖАЈ

1. УВОДНО РАЗМАТРАЊЕ	1
2. АЛДО-КЕТО РЕДУКТАЗЕ	2
2.1. ОПШТЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ	2
2.2. НОМЕНКЛАТУРА И КЛАСИФИКАЦИЈА	2
2.2.1. Трoдимензионална структура	4
2.2.2. Кинетика и каталитички механизам	4
2.3. ХУМАНИ ПРОТЕИНИ ПОДФАМИЛИЈЕ 1С АЛДО-КЕТО РЕДУКТАЗА (АКR1С)	7
2.3.1. Карактеристике везујућег места	9
3. АКR1С ЕНЗИМИ У МЕТАБОЛИЗМУ	11
3.1. СТЕРОИДОГЕНЕЗА	12
3.1.1. АКR1С у андрoгеном метаболизму	16
3.1.2. АКR1С у естрогеном и прогестеронском метаболизму	18
3.1.3. АКR1С у неуростероидном метаболизму	20
3.1.4. АКR1 у биосинтези жучних киселина	21
3.1.5. АКR1С у метаболизму стероидних конјугата	21
3.1.6. АКR1 у метаболизму синтетичких стероида	21
3.2. АКR1 У КОНТРОЛИ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЛИГАНАДА НУКЛЕАРНИХ РЕЦЕПТОРА	22
3.3. ЕКСПРЕСИЈА АКR1 ГЕНА У ПАТОЛОШКИМ СТАЊИМА	22
3.3.1. АКR1(C3) и канцер простате	22
3.3.2. АКR1 (C3) и канцер дојке	23
3.3.3. АКR1 (C3) и ендометријалне болести	23
3.4. НАСЛЕДНЕ ИЛИ ЈЕДНО-НУКЛЕОТИДНЕ ВАРИЈАНТЕ АКR1 ЕНЗИМА	24
3.5. АКR1С У МЕТАБОЛИЗМУ КСЕНОБИОТИКА	24
4. ЕНЗИМИ КАО МЕТЕ ЗА ЛЕКОВЕ	26
4.1. ЕНЗИМСКИ ЕСЕЛИ И КИНЕТИКА	26
4.2. ИНХИБИЦИЈА ЕНЗИМА	27
4.2.1. Квантитативно поређење инхибиторног потенцијала	28
4.2.2. Откриће и дизајн инхибитора	28
5. ИНХИБИТОРИ АКR1(C3)	30
5.1. ИНХИБИТОРИ АКR1C3	30
5.2. ЗНАЧАЈ ИНХИБИТОРА C3 У КАНЦЕРУ ПРОСТАТЕ	34
5.2.1. Биљни екстракти као инхибитори АКR1(C3)	37
5.3. СТРУКТУРНИ УВИД У СЕЛЕКТИВНУ ИНХИБИЦИЈУ АКR1C3 НА ОСНОВУ ДОСТУПНИХ КРИСТАЛНИХ СТРУКТУРА	39
5.3.1. Карактеристике АКR1C3 везујућег места за супстрат	40
6. ТЕХНИКЕ КОРИШЋЕНЕ У ИСТРАЖИВАЊУ	43
6.1. РЕКОМБИНАНТНА ЕКСПРЕСИЈА ПРОТЕИНА	43
6.1.1. Рекомбинантна технологија	43
6.1.2. Системи за продукцију рекомбинантних протеина	44
6.1.3. Систем за рекомбинантну експресију коришћен у овој тези	50
6.2. СТРУКТУРНА БИОЛОГИЈА: <i>IN SILICO</i> И <i>IN VITRO</i>	56
6.3. <i>IN SILICO</i> : МОЛЕКУЛАРНО УСИДРАВАЊЕ, ИЗНАЛАЖЕЊЕ И ДИЗАЈНИРАЊЕ ЛЕКОВА НА ОСНОВУ СТРУКТУРЕ	58
6.3.1. Дизајнирање лекова на основу структуре	58
6.3.2. Молекуларно усидравање	59
6.4. ПРОТЕИНСКА КРИСТАЛОГРАФИЈА: КРИСТАЛИЗАЦИЈА ПРОТЕИНА, РЕНДГЕНСКА АНАЛИЗА И РЕШАВАЊЕ СТРУКТУРЕ	61
6.4.1. Основни принцип протеинске кристалографије	62
6.4.2. Кристализација протеина - методе	63
6.4.3. Прикупљање података и конструкија модела	67
7. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	72

8. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	74
8.1. БАКТЕРИЈСКИ СОЈЕВИ И ПЛАЗМИДИ	74
8.2. ИСПИТИВАНА ЈЕДИЊЕЊА И БИЉНИ ЕКСТРАКТИ	74
8.2.1. Једињења.....	74
8.2.2. Биљни екстракти.....	78
8.3. ПРИПРЕМА КОМПЕТЕНТНИХ БАКТЕРИЈА.....	78
8.4. ТРАНСФОРМАЦИЈА БАКТЕРИЈА	79
8.5. ИЗОЛАЦИЈА ПЛАЗМИДНЕ ДНК – МИНИПРЕП	80
8.6. ПРОВЕРА МИНИПРЕПА И РЕСТРИКЦИОНЕ ДИГЕСТИЈЕ ПЛАЗМИДА	81
8.7. ИНДУКЦИЈА ЕКСПРЕСИЈЕ РЕКОМБИНАНТНИХ ПРОТЕИНА.....	81
8.8. ПРЕЧИШЋАВАЊЕ ПРОТЕИНА.....	82
8.8.1. Лизирање и соникација	82
8.8.2. Грубо раздвајање.....	82
8.8.3. Афинитетна хроматографија са имобилизованим металом	82
8.8.4. Гел-филтрациона хроматографија.....	83
8.8.5. Течна хроматографија ниског притиска - FPLC.....	84
8.9. КОНЦЕНТРОВАЊЕ И СКЛАДИШТЕЊЕ ПРОТЕИНА.....	85
8.10. ПОЛИАКРИЛАМИД ЕЛЕКТРОФОРЕЗА СА НАТРИЈУМ ДОДЕЦИЛСУЛФАТОМ (SDS-PAGE).....	86
8.11. ЕНЗИМСКИ ЕСЕЈ И КИНЕТИЧКИ ПАРАМЕТАРИ.....	87
8.11.1. Спектрофотометријски приступ.....	87
8.11.2. Флуорометријски приступ.....	87
8.11.3. Кинетички параметри.....	88
8.12. КРИСТАЛИЗАЦИЈА АКР1С3 ПРОТЕИНА	89
8.12.1. Поставка кристализације ручном методом	90
8.12.2. Поставка кристализације употребом робота	90
8.12.3. Динамичко расипање светлости	91
8.12.4. <i>In situ</i> протеолиза у кристализацији	91
8.12.5. <i>N</i> -терминално секвенцирање протеина.....	91
8.12.6. Кокристализација АКР1С3 протеина са инхибиторима.....	92
8.12.7. Сакупљање података дифракције и обрада	92
8.12.8. Решавање структуре на основу дифракционих података	93
8.13. <i>IN SILICO</i>	93
8.13.1. Припрема структурних координата рецептора	93
8.13.2. Припрема структурних координата лиганата	93
8.13.3. Формирање мапа решетки потенцијалне енергије везивања	94
8.13.4. Симулације усидравања	94
9. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	95
9.1. ОПТИМИЗАЦИЈА И АНАЛИЗА РАСТА, ИНДУКЦИЈЕ, ЕКСПРЕСИЈЕ И ПРЕЧИШЋАВАЊЕ ПРОТЕИНА	95
9.1.1. Анализа коришћених плазмида.....	95
9.1.2. Протеин I7βHSD1	97
9.1.3. АКР1С3 обележен са GST.....	100
9.1.4. АКР1С обележени хекса-хистидином на <i>N</i> -терминалном крају.....	101
9.2. ЕНЗИМСКИ ЕСЕЈИ ЗА АКР1С: ОПТИМИЗАЦИЈА ЕСЕЈА И ТЕСТИРАЊЕ ЈЕДИЊЕЊА	104
9.2.1. Оптимизација реакције оксидације.....	104
9.2.2. <i>In vitro</i> анализа ефекта различитих једињења на оксидујућу активност изоформе АКР1С3	105
9.2.3. Оптимизација реакције редукције	106
9.2.4. <i>In vitro</i> анализа ефекта различитих једињења на редукујућу активност АКР1С протеина	115
9.2.5. <i>In vitro</i> анализа ефекта биљних екстраката на редукујућу активност изоформе АКР1С3.	121
9.3. КАРАКТЕРИСТИКЕ УСТАНОВЉЕНИХ ИНХИБИТОРА АКР1С3 ПРОТЕИНА	123
9.3.1. Преглед структура једињења која су показала инхибиторни потенцијал.....	124
9.3.2. <i>In silico</i> анализа усидравања инхибиторних једињења кроз примере са супстратима	125
9.3.3. Кинетичке карактеристике једињења која су показала инхибиторни потенцијал.....	130
9.3.4. Упоредивање резултата са литературним подацима о тестираним једињењима	132
9.4. КРИСТАЛИЗАЦИЈА АКР1С3	133
9.4.1. Чистоћа и хомогеност узорка	133
9.4.2. Хистидински обележивач протеина и <i>in situ</i> протеолиза	136
9.4.3. Утицај <i>in situ</i> протеолизе хистидинског обележивача на морфологију кристала	137

9.4.4. Утицај <i>in situ</i> протеолизе хистидинског обележивача на квалитет дифракције	139
9.4.5. Ефективност <i>in situ</i> тромбинске протеолизе у растворима преципитаната.....	140
9.4.6. Решавање структуре	141
9.5. КОКРИСТАЛИЗАЦИЈА АКR1C3 ПРОТЕИНА СА ИНХИБИТОРИМА	143
9.5.1. Кристална структура комплекса АКR1C3·NADP ⁺ ·AKR-7	144
9.5.2. Кристална структура комплекса АКR1C3·NADP ⁺ ·AKR-19	147
9.5.3. Поређење положаја АКR-19 и АКR-7 у АКR1C3.....	150
10. ЗАКЉУЧЦИ	152
11. ЛИТЕРАТУРА.....	154
12. ПРИЛОЗИ	164

1. УВОДНО РАЗМАТРАЊЕ

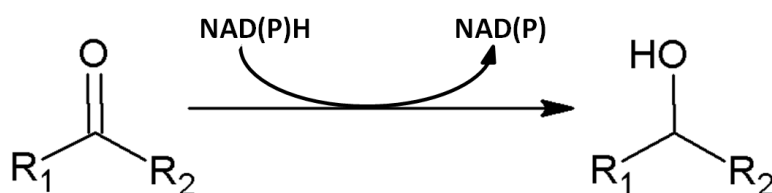
Истраживање има фокус на хуманим ензимима из суперфамилије алдо-кето редуктаза, које имају велики метаболички значај за хомеостатско функционисање организма. Ови ензими имају важну улогу у метаболизму ендогених једињења и ксенобиотика, који поседују алдо или кето групу (Penning, 2015). Неки од чланова подфамилије 1С алдо-кето редуктаза (AKR1C) имају улогу у развоју одређених патолошких стања, као што су леукемија, тумори простате, дојке и ендометријума. AKR1C ензими модификују стероидне хормоне: андрогене, естрогене, прогестерон, као и простагландине, регулишући на тај начин активност нуклеарних рецептора а самим тим и друге ефекте који проистичу из активације нуклеарних рецептора (Velića et al., 2009). Чланови AKR1C фамилије садрже различите изоформе. До сада није регистрован лек који директно утиче на протеине ове групе и самим тим је акценат на изналажењу специфичних лиганата (супстрата, инхибитора), који би могли да имају фармаколошку примену и у случају патолошких стања, као кандидати за потенцијалне лекове, али и због појединачног испитивања постојећих изоформи и њихове структурно-функционалне повезаности. Због свега наведеног протеини AKR1C представљају врло интересантан предмет истраживања.

Да би се истражила ензимска активност протеина са различитим лигандима, неопходно је било да се развије ензимски есеј који је изводљив, брз, поуздан и поновљив. Ово истраживање је подразумевало оптимизацију рада са рекомбинантним хуманим ензимима из групе AKR1C, које је обухватило одржавање и трансформацију бактерија, изолацију плаزمида, индукцију, експресију и пречишћавања рекомбинантних протеина. Изналажење нових лиганата и утврђивање њиховог ефекта на ензимску активност је реализовано на два начина, *in silico* и *in vitro*. *In silico* приступ је обухватио дизајнирање модела протеина и лиганата путем истраживања тродимензионалне структуре и молекуларног усидравања (*енгл.* molecular docking), анализу структурне функционалности ензима и различитих лиганата. *In vitro* приступ је обухватио рад на ензимском есеју, анализу активности ензима и ефекта различитих лиганата на ензимску активност. Поред наведеног, за лиганде који су се показали да поседују инхибиторне карактеристике, рађена је кристализација протеина са датим лигандом да би се установиле тачне молекуларне интеракције комплекса протеин-лиганда и са тим сазнањима указало на потенцијална даља модификовања лиганата у циљу унапређења инхибиторних карактеристика.

2. АЛДО-КЕТО РЕДУКТАЗЕ

2.1. Опште карактеристике

Алдо-кето редуктазе (AKR) представљају суперфамилију NAD(P)(H)-зависних оксидоредуктаза које катализују редукцију алдехида и кетона до примарних и секундарних алкохола (Сл. 1). AKR су присутне у великом броју важних реакција у организму и подељене су у 16 фамилија на основу хомологије секвенце (Penning, 2015). Укључене су у метаболизам великог броја ендогених супстрата, укључујући шећере, липиде, ретинале, стероиде и простагландине, као и у метаболизам ксенобиотика, попут дикарбонила, хемијских канцерогених метаболита, као спољно-срединских загађивача (нпр. полициклични ароматични угљоводоници, акролеин) (Barski, Tipparaju, & Bhatnagar, 2009; Chen, Jin, & Penning, 2015).



Слика 1. Редукција карбонилне групе у хидроксилну катализована са AKR протеином уз употребу кофактора NAD(P)H.

2.2. Номенклатура и класификација

На почетку AKR ензими су прво добијали имена по ензимској активности, међутим због широке супстратне преференције, овакав систем је постао збуњујући. На пример, један ензим AKR је познат и као дихидродиол дехидрогеназа 2, протеин за везивање жучних киселина и 3 α -хидроксистероид дехидрогеназа тип 3 и слично. Затим поред наведеног, настао је проблем због постојања ензима са сличним функцијама из других суперфамилија. Због свега наведеног, 1997. године направљен је номенклатурни систем за AKR суперфамилију, заснован на сличности у аминокиселинској секвенци.

Суперфамилија АКР се састоји од 16 фамилија, које су груписане на основу сличност у секвенци већој од 40%, обележене су арапским бројем одмах иза скраћенице АКР:

- АКР1 – алдехид редуктазе, алдоза редуктазе, хидроксистероид дехидрогеназе и стероид 5 β -редуктазе,
- АКР2 – маноза и ксиолоза редуктазе,
- АКР3 – АКР квасаца,
- АКР4 – халкон и кодеинон редуктазе,
- АКР5 – редуктазе глуконске киселине,
- АКР6 – β -субјединице калцијумом регулисаног јонског канала,
- АКР7 – афлатоксин диалдехид и сукцинат семиалдехид редуктазе,
- АКР8 – пиридоксал редуктазе,
- АКР9 – арил алкохол дехидрогеназе,
- АКР10 – *Streptomyces* АКР,
- АКР11 – *Bacillus* АКР,
- АКР12 – *Streptomyces* шећерно-алдехидна редуктаза,
- АКР13 – хипертермофилна бактеријска редуктаза,
- АКР14 – *Escherichia coli* редуктазе,
- АКР15 – *Mycobacterium* редуктаза,
- АКР16 – *Vibrio cholera* редуктаза.

Подфамилије се састоје од чланова са сличношћу аминокиселинске секвенце већом од 60%. Према овој дефиницији 9 од 16 фамилија се састоји од бројних подфамилија. У случају постојања већег броја подфамилија у оквиру једне фамилије, припадност подфамилији се обележава великим словом после арапског броја, док се чланови подфамилија обележавају још придодатим арапским бројем после претходно додатог великог слова (интернет страна: "АКР Superfamily"; Penning 2015). Фамилија АКР1 обухвата подфамилије:

А – сисарске алдехид редуктазе,

В – сисарске алдозне редуктазе,

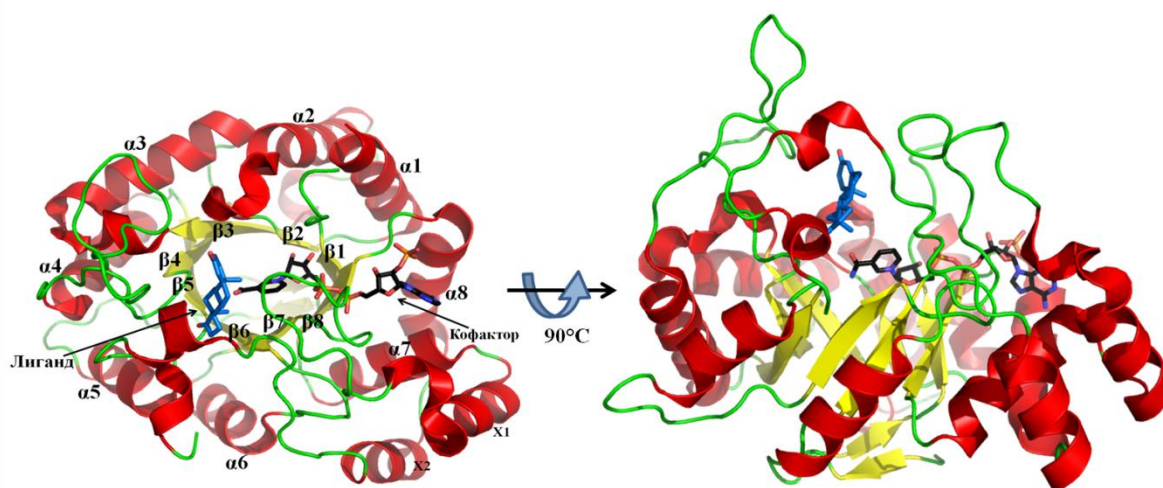
С – хидроксистероид дехидрогеназе (*енгл.* hydroxysteroid dehydrogenases, HSDs) и

Д – Δ^4 -3-кетостероид-5 β -редуктазе (интернет страна: "АКР Superfamily").

Списак свих чланова суперфамилије АКР са додатним појединостима и детаљима је могуће видети на страници <https://www.med.upenn.edu/akr/members.html>.

2.2.1. Тродимензионална структура

Чланови АКР суперфамилије имају велику сличност у аминокиселинској секвенци и због тога имају и прилично сличну структуру. АКР имају молекуларну тежину око 37 kDa (око 320 аминокиселина) и углавном су мономери. Имају карактеристичну очувану тродимензионалну структуру која се састоји од мотива буре- $(\alpha/\beta)_8$, који се званично зове буре триозофосфат изомеразе (*енгл.* triosephosphate isomerase barrel, TIM barrel). Име је добијено по еволутивно очуваном истоименом ензиму. Поред бурета, протеин садржи три велике петље на једној страни бурета које имају круцијалну улогу у препознавању специфичног лиганда, који се везује под правим углом у односу на кофактор и поседују очуван домен за везивање кофактора (Сл. 2.) (Barski et al., 2009).



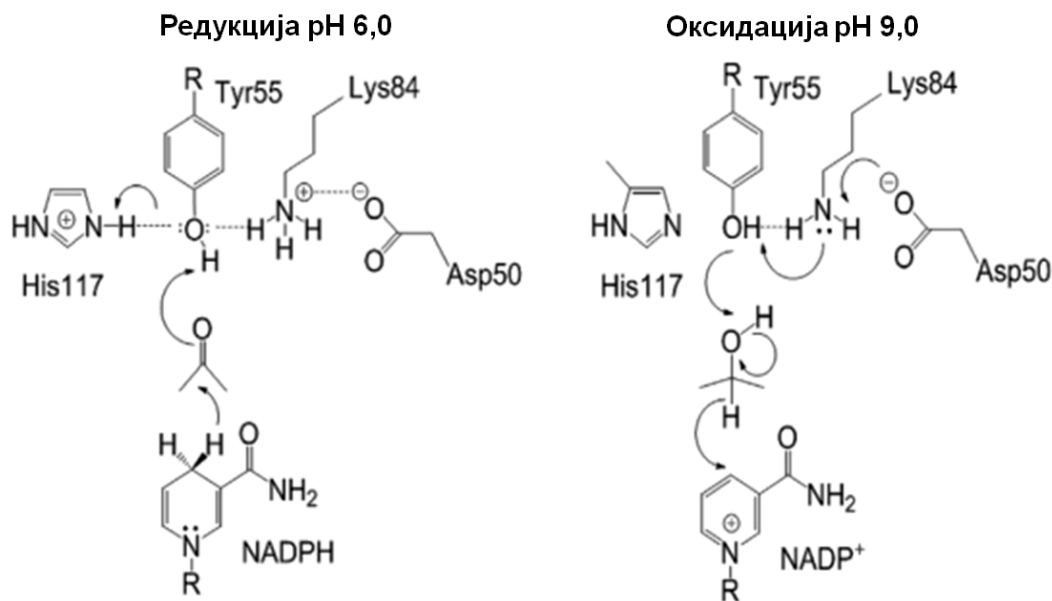
Слика 2. Приказ структурне организације АКР1С3. Основну структуру чини $(\alpha/\beta)_8$ -буре, које се састоји од 8 β -плоча (жуте стрелице) и 8 α -хеликса (црвено). Зеленом бојом су обележене петље, које су посебно изражене на страни бурета на којој се везују лиганд и кофактор (PDB: 1XF0, PyMOL).

2.2.2. Кинетика и каталитички механизам

Постоји функционална очуваност каталитичког механизма код АКР са механизмом код кратко-ланчаних дехидрогеназа/редуктаза (*енгл.* short-chain dehydrogenases/reductases, SDRs) иако поседују другачију тродимензионалну организацију протеина – Росманов чвор (Penning, 2015). АКР катализују реакције оксидације и редукције бројних супстрата уз употребу NAD(P)(H) кофактора. Каталишу по уређеном би-би кинетичком механизму у ком се кофактор везује први, а послењи напушта протеин. Начин везивања кофактора је очуван у оквиру суперфамилије, везује се у издуженој конформацији на С-терминалној страни TIM

бурета, са никотинамидним прстеном у језгру бурета. Контакт између кофактора и супстрата је скоро идентичан код скоро свих познатих АКР структура. Топологија везујућег места за супстрат је варијабилнија, док су делови који су ближи каталитичким резидуама очуванији. Место за везивање супстрата се састоји од оксианјон везујућег места (тирозин 55, хистидин 117 и С-4 никотинамидног прстена), резидуа на рубу активног места (аланин 52, леуцин 54, триптофан 86 и фенилаланин 118) и аминокиселина из петље које формирају део каталитичког места. Сматра се да резидуе које се налазе на рубовима везујућег места имају кључну улогу у разликовању врсте супстрата као и петље које дефинишу облик места.

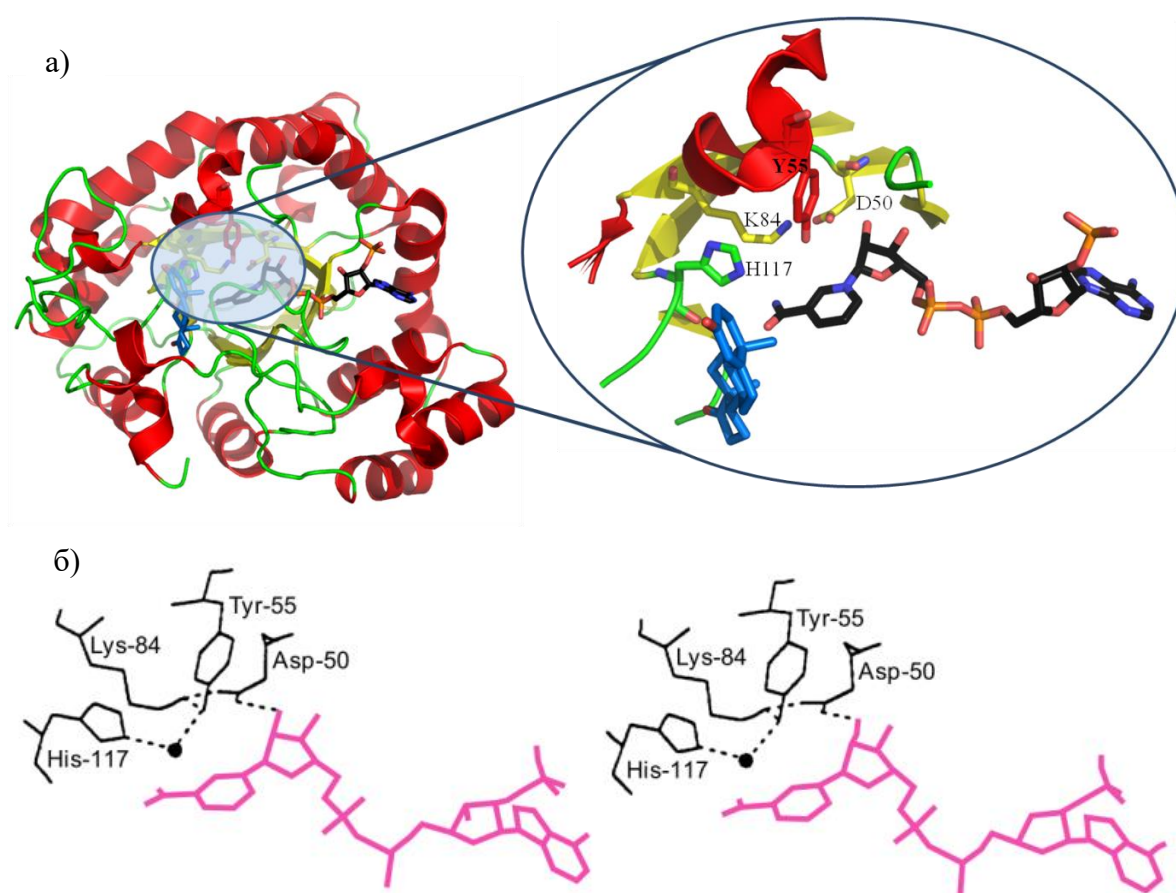
Редукујуће реакције користе трансфер водоника са NAD(P)(H) на карбонилни супстрат и протонацију кисеоника од стране резидуе ензима која се понаша као општа киселина. Обрнуто се дешава у реакцијама оксидације. АКР ензими поседују очувану каталитичку тетраду која се састоји од тирозина 55, аспартата 50, лизина 84 и хистидина 117, бројеви су по АКР1С3 (Сл. 3 и 4.).



Слика 3. Механизам „гурај-повуци“ за кисело-базну катализу код АКР ензима. Лево: редукација карбонила захтева да се тирозин 55 (Tyr55) понаша као општа киселина због блиско постављеног хистидина 117 (His117); десно: оксидација алкохола захтева да се тирозин 55 (Tyr55) понаша као база због блиско постављеног лизина 84 (Lys84) и аспартата 50 (Asp50). Бројеви аминокиселина су по АКР1С3 (Penning, 2015). Скраћене ознаке аминокиселина: Прилог 2.

Поред тога, један молекул воде је конзистентно присутан између тирозина 55, хистидина 117 и С-4 дела кофактора (Сл. 4.), имитирајући на тај начин локацију карбонилне групе супстрата (Burns, Jin, & Penning, 2011; Jez, Bennett, Schlegel, Lewis, & Penning, 1997).

Употребом мутагенезе установљене су прецизније улоге одређених аминокиселина у очуваној тетради. Показало се да аспаратат 50 није круцијалан у катализи али мутацијом ове аминокиселине утиче се на супстратни промет и везивање кофактора. Мутирањем хистидина утицало се у одређеној мери на каталитичку активност, што је указало да ни ова аминокиселина није довор протона. Мутација и тирозина 55 и лизина 84 је изазвала велике утицаје на катализу, а додатним истраживањем је тада установљено да је тирозин 55 тај који се понашао као каталитичка киселина у механизму реакције (Jez et al., 1997; Schlegel, Jez, & Penning, 1998).



Слика 4. Приказ каталитичке тетраде активног места AKR1C протеина. а) Увећан приказ структурног односа очуване каталитичке тетраде (D – аспаратат, Y – тирозин, K – лизин и H – хистидин), лиганда (плаво) и кофактора (црно) у примеру AKR1C3 (PDB 1XF0, PyMOL). б) Трoдимензионална структура свих AKR протеина који поседују сличну просторну организацију између резидуа активног места (аспаратат 50, тирозин 55, лизин 84 и хистидин 117), никотинамидног кофактора (розе) и молекула воде (Jez et al., 1997).

Иако AKR у *in vitro* условима могу да каталишу оксидоредукцију, у *in vivo* најчешће функциошишу као редуктазе. AKR имају наномоларни афинитет према NADP(H) док је микромоларни за NAD(H). Истраживањима и на сисарским ћелијама

потврђена је претпоставка да АКР ензими у хуманом организму функционишу као редуктазе (Penning, 2015).

2.3. Хумани протеини подфамилије 1С алдо-кето редуктаза (AKR1C)

Петнаест чланова АКР је утврђено код људи, од којих већина припада АКР1 фамилији. Хумани АКР функционишу као алдехид редуктазе, алдозо редуктазе, ензими за трансформацију стероида, затим као β -подјединица волтажно-зависног калијум канала и афлатоксин алдехид редуктаза (Chen et al., 2015). Хумани ензими у оквиру АКР1 фамилије катализују биосинтезу стероидних хормона, жучних киселина или неуростероида, и на тај начин њихову активацију или инактивацију, што за резултат као последицу има регулацију активности и акције тих медијатора. Поред наведеног, ови ензими делују на конјуговане и синтетичке стероиде који се употребљавају као терапеутици (Penning, 2011; Rižner & Penning, 2014).

AKR1C ензими (AKR1C1-3) функционишу *in vivo* као 3-, 17- и 20-кетостероид редуктазе да би формирали $3\alpha/\beta$, 17β - и 20α -хидрокси-метаболизите у различитим облицима, што им омогућава да метаболишу широк спектар природних и синтетичких терапеутских стероида. Због различите улоге ензима у метаболизму, постоје различити синоними за исте ензиме (нпр. AKR1C3 је исто што и 17β -хидроксистероид дехидрогеназа 5, 17β -HSD5, затим 3α -хидроксистероид дехидрогеназа 2, 3α -HSD2, као и простагландин F синтаза, PGFS).

Од 15 АКР које постоје код људи, протеини у оквиру АКР1С подфамилије су повезани са развојем малигнитета зависних од стероидних хормона (тумори дојке, простате и ендометриозе), због њихове способности да модификују стероидне хормоне и простагландине (интернет страна: "HUGO Gene Nomenclature Committee (AKR1C3)"; Penning, 2015; Velića et al., 2009).

Ензими у оквиру АКР1С поседују висок проценат сличности у аминокиселинској секвенци који варира од 84% до 98% (Сл. 5). Подфамилија АКР1С броји 35 чланова од којих су само 4 хумана:

- C1 - 20α -HSD (EC 1.1.1.149), DD1 (EC 1.3.1.20),
- C2 - 3α -HSD3 (EC 1.1.1.213), DD2 (EC 1.3.1.20), (везује жучне киселине),
- C3 - 3α -HSD2 (EC 1.1.1.213), DDx (EC 1.3.1.20), 17β -HSD5 (EC 1.1.1.62) и
- C4 - 3α -HSD1 (EC 1.1.1.213), DD4 (EC 1.3.1.20), хлордекон редуктаза (EC 1.1.1.125).

AKR1C1 је код човека експресован у различитим ткивима, превасходно функционише као 20-кетостероид редуктаза, дакле метаболише прогестерон у његов неактивни метаболит 20 α -хидроксипрогестерон. Одржавање нивоа циркулишућег прогестерона је неопходно да би се зауставило превремени порођај и смањило ефекат естрогена у ендометриози и канцеру ендометријума (Penning, 2015).

AKR1C2 је претежно 3-кетостероид редуктаза, присутна је у различитим ткивима, а у највећој мери у простати, затим у материци и мозгу. Укључена је у реакције трансформације 5 α -дихидротестостерона у неактивни андроген 5 α -андостан-3,17 β -диол, као и у метаболизам производње неуроактивног стероида, алопрегнанолон од 5 β -дихидропрогестерона. Алопрегнанолон је алостерични ефектор GABA_A рецептора и недостатак овог неуростероида је повезано са пременструалним синдромом (Penning, 2015).

AKR1C3 је присутан у простати и млечним жлездама, а у мањој мери и у мозгу. Познат као и тип 5 17 β -HSD и простагландин (PG) F_{2 α} синтаза. Као 17 β -HSD укључен је у редукцију Δ^4 -андроген-3,17-диона у тестостерон, редукцију 5 α -андростана-3,17-диона у 5 α -дихидротестостерон и у редукцију естрогена у 17 β -естрадиола. Установљена је прекомерна експресија ове изоформе код канцера дојке и простате. Као (PG) F_{2 α} синтаза, ензим редукује PGH₂ у PGF_{2 α} и PGD₂ у 11 β -PGF_{2 α} . Продукција ових лигананда за простагландински F рецептор може да буде про-пролиферативна преко MAPK сигналинга (Penning, 2015).

AKR1C4 је изоформа која је присутна у јетри. Главна улога у јетри јој је заштита од вишка стероидних хормона у циркулацији (Penning et al., 2000).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AKR1C4      MDPKYQRVELNDGHFMPVLFPGTYAPPEVPRNRRAVEVTKLAI EAGFRHIDSAYLYNNEEQ
AKR1C3      MDSKHQCCKLNDGHFMPVLFPGTYAPPEVPRSKALEVTKLAI EAGFRHIDSAHLYNNEEQ
AKR1C1      MDSKYQCCKLNDGHFMPVLFPGTYAPAEVPSKALEATKLAIEAGFRHIDSAHLYNNEEQ
AKR1C2      MDSKYQCCKLNDGHFMPVLFPGTYAPAEVPSKALEAVKLAIEAGFRHIDSAHVYNNNEEQ
** *:* *:*:***** **::*:*:*****:*****:*****

AKR1C4      VGLAIRSKIADGSVKREDIFYTSKLWCTFFQPMVQPALESSLKKLQLDYVDLYLLHFPM
AKR1C3      VGLAIRSKIADGSVKREDIFYTSKLWSTFHRPELVRPALENSLKKAQLDYVDLYLIHSPM
AKR1C1      VGLAIRSKIADGSVKREDIFYTSKLWNSHRPELVRPALERSLKNLQLDYVDLYLIHFV
AKR1C2      VGLAIRSKIADGSVKREDIFYTSKLWNSHRPELVRPALERSLKNLQLDYVDLYLIHFV
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

AKR1C4      ALKPGETPLPKDENGKVIKFDVTLDSATWEVMEKCKDAGLAKSIGVSNFNCRQLEMILNKP
AKR1C3      SLKPGEELSPTDENGKVIKFDIVDLCTWEAMEKCKDAGLAKSIGVSNFNRRQLEMILNKP
AKR1C1      SVKPGEEVIPKDENGKILFDVTLDCATWEAVEKCKDAGLAKSIGVSNFNRRQLEMILNKP
AKR1C2      SVKPGEEVIPKDENGKILFDVTLDCATWEAMEKCKDAGLAKSIGVSNFNHRLLEMLNKP
::**** *:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

AKR1C4      GLKYKPVCNQVECHPYLNQSKLLDFCKSKDIVLVVHSAALGTQRHKLWVDPNSPVLLEDPV
AKR1C3      GLKYKPVCNQVECHPYFNRSKLLDFCKSKDIVLVVAYSALGSQRDRWVDPNSPVLLEDPV
AKR1C1      GLKYKPVCNQVECHPYFNQRKLLDFCKSKDIVLVVAYSALGSHREEPWVDPNSPVLLEDPV
AKR1C2      GLKYKPVCNQVECHPYFNQRKLLDFCKSKDIVLVVAYSALGSHREEPWVDPNSPVLLEDPV
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

AKR1C4      LCALAKKHKRTPALIALRYQLQRGVVVLAKSYNEQRIRQNVQVFQQLTSEDMKVL DGLN
AKR1C3      LCALAKKHKRTPALIALRYQLQRGVVVLAKSYNEQRIRQNVQVFQQLTAEDMKAIDGLD
AKR1C1      LCALAKKHKRTPALIALRYQLQRGVVVLAKSYNEQRIRQNVQVFQQLTSEEMKAIDGLN
AKR1C2      LCALAKKHKRTPALIALRYQLQRGVVVLAKSYNEQRIRQNVQVFQQLTSEEMKAIDGLN
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

AKR1C4      RNYRYVVMDFLMDHPDYPFSDEY
AKR1C3      RNLHYFNSDSFASHPNYPFSDEY
AKR1C1      RNVRYLTLDIFAGPPNYPFSDEY
AKR1C2      RNVRYLTLDIFAGPPNYPFSDEY

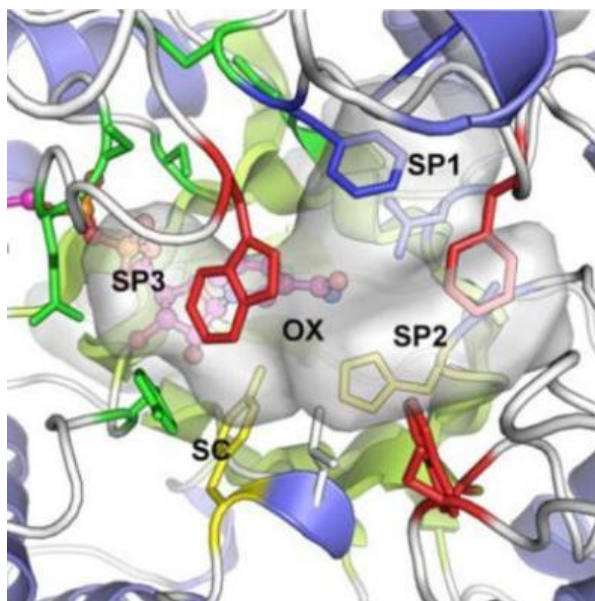
```

Слика 5. Поравнате аминокиселинске секвенце хуманих протеина чланова AKR1C подфамилије: AKR1C1, C2, C3 и C4. Звездица (*) представља апсолутну очуваност аминокиселине код свих секвенци, две тачке (:) указују на присуство аминокиселина сличних по физичко-хемијским карактеристикама, једна тачка (.) представља још мању сличност и одсуство било каквог знака показује да нема аминокиселинске очуваности (Clustal Omega), FASTA секвенце у прилогу (12. поглавље).

Решен је велики број кристалних структура хуманих AKR1C ензима у комплексу са различитим лигандима (65 структура, 29.10.2018.) и налазе се у Протеинској бази података (*енгл.* Protein Data Bank – PDB, (Berman et al., 2000)).

2.3.1. Карактеристике везујућег места

Повећање броја кристалних структура на PDB-у, омогућило је детаљнији увид у везујуће/активно место свих изоформи AKR1C, са мањим или већим одступањима од описаног. Досадашњим анализама је утврђено да се везујуће место може поделити на неколико делова и то на стероидни канал (SC), оксианјон место (OX) и три подцепца SP1, SP2 и SP3 (Сл. 6).



Слика 6. Увећани приказ активног места, са приказима поддепова на примеру AKR1C3. Резидеуе које чине SP1 су обојене плаво, SP2 црвено и SP3 зелено. Резидеуе тирозина и хистидина су приказане жуто (Flanagan et al., 2012).

SP1 је дефинисан серином (118), аспарагином (167), фенилаланинима (306 и 311) и тирозином (319) и окупиран је са малим молекулима лиганда у свим структурама које су публиковане до сада. SP2 је формиран триптофанима (86 и 227), серином (129) и фенилаланином (311) и флексибилном петљом (125 – 139) која није често видљива у кристалним структурама. SP3 је дефинисан са тирозинима (24 и 305), глутаматима (192 и 222), серинима (217 и 221) и фенилаланином (306). Резидеуе триптофана (227), фенилаланина (306 и 311) поседују одређену флексибилност бочног ланца, а различите структурне конформације се попримају у зависности од лиганда. Оксиањон место (OX) обухвата активно место, дакле и резидеуе тирозина (55), хистидина (117) и кофактора, а представља каталитичко место у ком се дешава редукција алдехида или кетона. Стероидни канал је очувана карактеристика свих AKR1C протеина, представља потенцијални канал кроз који лиганд приступа активном месту и његова отвореност је контролисана триптофаном (227) и леуцином/валином (54) (Byrns et al., 2011; Flanagan et al., 2012).

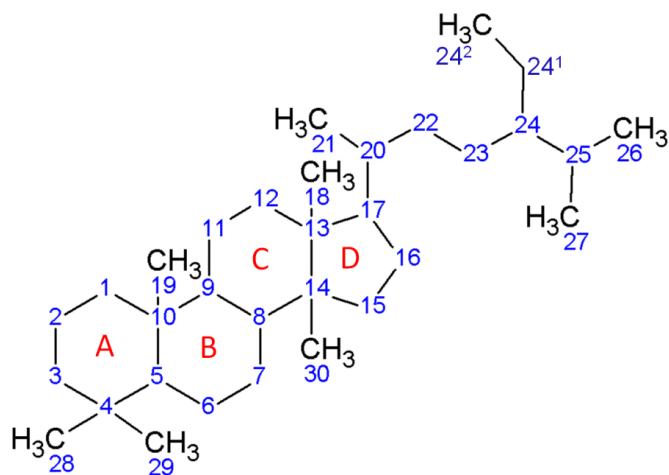
3. AKR1C ЕНЗИМИ У МЕТАБОЛИЗМУ

Неуравнотеженост у биосинтези и инактивацији стероида може довести до развоја болести, укључујући хормон зависне канцере дојки, простате, ендометријума и јајника, као и болести попут бенигне (доброћудне) хиперплазије простате, ендометриозе, холестазае, оштећења неонаталне јетре, неуролошких поремећаја и малформације или диференцијације гениталија (Табела 1). Поред бројних ензима који учествују у метаболизму стероида посебно се истичу и ензими SDR и AKR суперфамилије. Обе суперфамилије утичу на C3, C5, C11, C17 и C20 позиције (C – представља атом угљеника) стероидног језгра и бочних ланаца (Сл. 7). Иако им је структура, стереохемија, хидридни трансфер и кинетички механизам другачији, ипак имају сличан каталитички механизам који је еволутивно остао очуван.

Табела 1. Улога хуманих AKR у болести и здрављу.

AKR	Редукциона реакција	Повезана болест	Селективни инхибитор (К – коришћен у клиници)
AKR1C1	Прогестерон – 20 α хидроксипрогестерон	Превремени порођај, ендометриоза	Салицилат, 3-хлоро-фенилсалицилат
AKR1C2	DHT -3 α -андростанедиол DHP - алопрегнанолон	Недостатак андрогена Пременструални синдром	Урсодексихолат
	Δ^4 -андростене-3,17-дионе - Т 5 α -андростан-3,17-дион – 5 α -DHT	Напредни канцер простате	Индометацин б-медрокси-прогестерон ацетат (К)
AKR1C3	Естрон – 17 β -естрадиол PGH ₂ – PGF _{2α} PGD ₂ – 11 β -PGF _{2α}	Канцер дојке, акутна мијелоидна леукемија	

Хумани ензими из AKR1 фамилије или катализују биосинтезу стероидних хормона, жучних киселина и неуростероида или утичу на њихову активацију или инактивацију и као што је већ напоменуто на овај начин регулишу активност и утицај ових медијатора. Уз то ови ензими утичу на конјуговане и синтетичке стероиде који се користе као терапеутици. Хумани ензими AKR1 фамилије који су укључени у стероидни метаболизам су чланови AKR1C и AKR1D подфамилија. AKR1C ензими (AKR1C1-4) *in vivo* функционишу као 3-, 17- и 20- кетостероид редуктазе и формирају 3 α / β , 17 β - и 20 α -хидрокси метаболите до различитих облика и тиме метаболизују широк спектар природних и синтетичких терапеутских стероида. На основу истраживања везујућег места ензима за стероидне супstrate код свих наведених изоформи разјашњена је структурна основа супстратне специфичности.



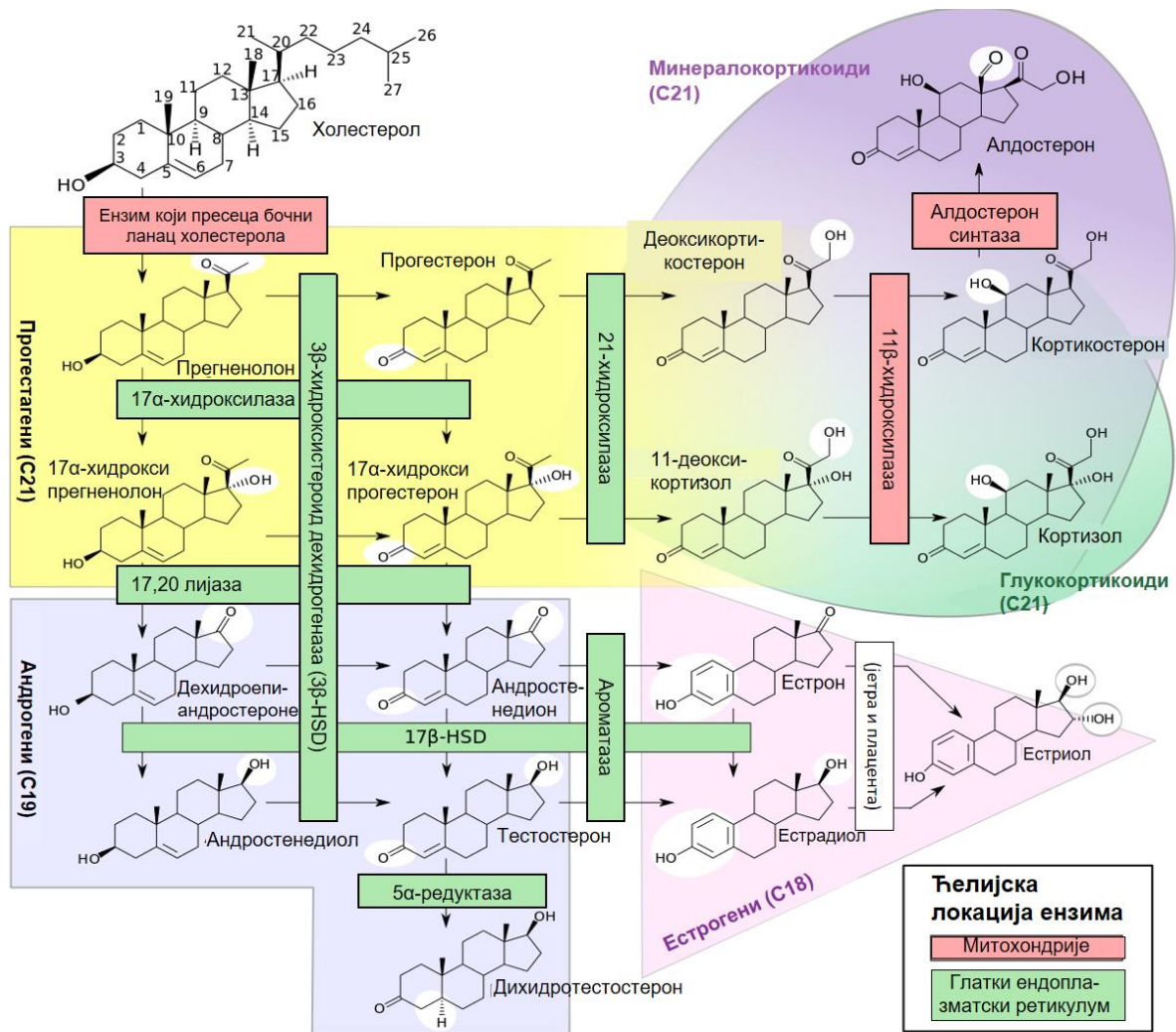
Слика 7.
Шаблон стероидног
једињења са
нумерисаним атомима
угљеника (плави
бројеви) и обележеним
прстеновима
(црвена слова).

3.1. Стероидогенеза

Стероидогенеза представља синтетички процес који почиње са холестеролом као супстратом и који кроз серије ензимских реакција (модификовање бочних ланаца, хидроксилације и ароматизације прстенова) продукује велики број биоактивних међусобно повезаних стероидних сигналних молекула, између осталог и стероидне хормоне (R. Verne, 2004; Hanukoglu, 1992). Стероидни хормони регулишу велики број различитих физиолошких и развојних процеса од феталног периода (од 8. недеље трудноће до порођаја) па све до адултног. Процес стероидогенезе (Сл. 8) се одвија у ткивима надбубрежне жлезде, тестиса, јајника, плаценте и других.

Иако сваки од ткива има своје специфичности у процесима стероидогенезе које су дефинисане типом ћелија у којима се одвија, она ипак може да се представи као један генералан процес који се у ствари модификовано понавља у сваком наведеном ткиву (Miller & Auchus, 2011).

Сви стероидни хормони се синтетишу од холестерола и због тога сви имају релативно сличне структуре засноване на класичном 4-прстеном циклопентанофенантрени (Сл. 7). Потентни андрогени се карактеришу елиминацијом C20 ланца и присуством оксигенисаног угљеника на позицији 17, док је за естрогене карактеристична ароматизација А прстена на андрогени (R. Verne, 2004). Синтетисање свих стероидних једињења је строго контролисано стероидогеним ензимима. Истраживања стероидогенезе 30-тих година 20. века је довело до веома битног открића, а то је да постоји знатно већи број реакција у самој стероидогенези него стероидогених ензима. После овог открића уследио је низ нових, превасходно везаних за карактеризацију врсте ензима, нуклеарних рецептора и њихове функције у стероидогенези (Miller & Auchus, 2011).



Слика 8. Ензими, њихова ћелијска локација, супстрати и продукти у хуманој стероидогенези (Hägglström & Richfield, 2014).

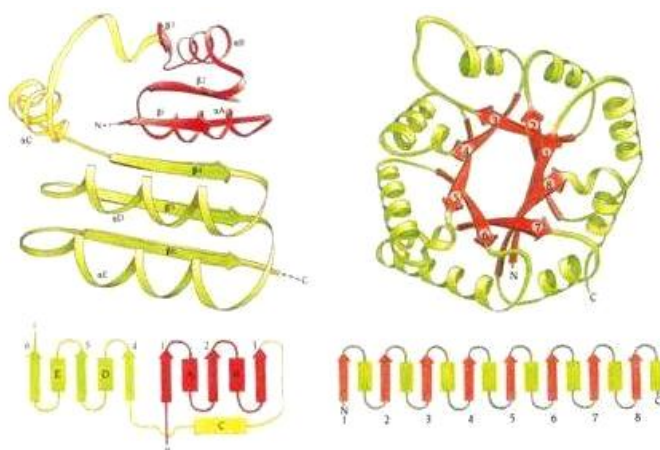
Први и лимитирајући кораци у процесу стероидогенезе су усвајање, а затим складиштење и унутарћелијски транспорт холестерола. Хумана надбубрежна жлезда може синтетисати у малим количинама холестерол *de novo* од ацетил-коензима А, међутим у нормалним условима већина холестерола је пореклом из плазме од липопотеина мале (углавном) и велике густине (*енгл.* low-density lipoproteins – LDL и high-density lipoproteins - HDL) који су формиран у организму од компонената унетих исхраном. Након транспорта холестерола у ћелију путем ендоцитозе, микротубули померају холестерол до цитоплазматске вакуоле унутар које већина холестерола буде естерификована и затим складиштена (R. Verne, 2004).

У процесу формирања стероидних хомона следећи корак је транспорт холестерола у митохондрије у којима се врше даље реакције. Естерификовани холестерол се ослобађа реакцијом хидролизе. Транспорт холестерола на спољну па затим на унутрашњу мембрану митохондрија је комплексан процес који се још увек

истражује. На унутрашњој мембрани митохондрија се налазе ензими неопходни у наредим реакцијама. Већина реакција синтезе активних стероидних хормона од холестерола подразумева учешће ензима цитохрома P-450 (CYP-ови) и хидроксистероид дехидрогеназа (HSD).

Цитохром P-450 обухвата групу ензима оксидаза, који поседују хем групу као кофактор и самим тим представљају хемопротеине (Gonzalez1 & Gelboin1, 1992). Име P-450 (*енгл.* pigment 450) је повезано са чињеницом да сви апсорбују светлост на 450 nm у свом редукованом стању у комплексу са угљеник моноксидом. Шест P-450 ензима је укључено у стероидогенезу. Митохондријски P-450 катализује пресецање бочног ланца холестерола серијом реакција. У митохондријама постоје две изоформе овог ензима (P-450c11 и P-450c11AS) које катализују 11 β -, 18-хидроксилазну и 18-метил оксидазну активност.

Хидроксистероид дехидрогеназе су ензими молекуларне тежине од 37 до 45 kDa, немају хем групу и неопходан им је NAD(P)(H) кофактор да би редуковале или оксидовале стероид. Већина реакција која користи P-450 катализована је са само једном изоформом P-450, док у случају реакција које су катализоване са HSD најчешће су укључене бар још две изоформе. Под HSD које су укључене у ове процесе спадају 3 α - и 3 β -HSD, две 11 β -HSD и серија 17 β -HSD. На основу своје структуре ови ензими се деле у две групе: кратколанчане дехидрогеназе/редуктазе (*енгл.* short-chain dehydrogenase/reductase, SDR) и алдо-кето редуктазе (AKR). Ензими SDR фамилије се састоје од 7 паралелних β -плоча које заједно са α -хеликсима формирају карактеристичан облик – Росманов чвор (*енгл.* Rossmann fold), што је карактеристично за ензими који користе никотинамидни кофактор и укључени су у оксидацију или редукацију. За разлику од ове групе (Carugo & Argos, 1997), AKR поседују TIM буре које је већ описано у поглављу 2.2.1 (Сл. 9).



Слика 9. Структурна организација Росмановог чвора (лево) и TIM бурега (десно) (интернет страна: “Rossmann fold vs TIM barrel”).

У сваком случају обе врсте структура поседују тирозин и лизин као кључне аминокиселине у активном месту. У ове процесе од SDR ензима су укључени 11 β -

HSD тип 1 и 2, као и 17 β -HSD тип 1, 2 и 3, од AKR је 17 β -HSD5 (AKR1C3), који је посебно битан у ванжлезданој активацији андрогених прекурсора (R. Verne, 2004; Miller & Auchus, 2011).

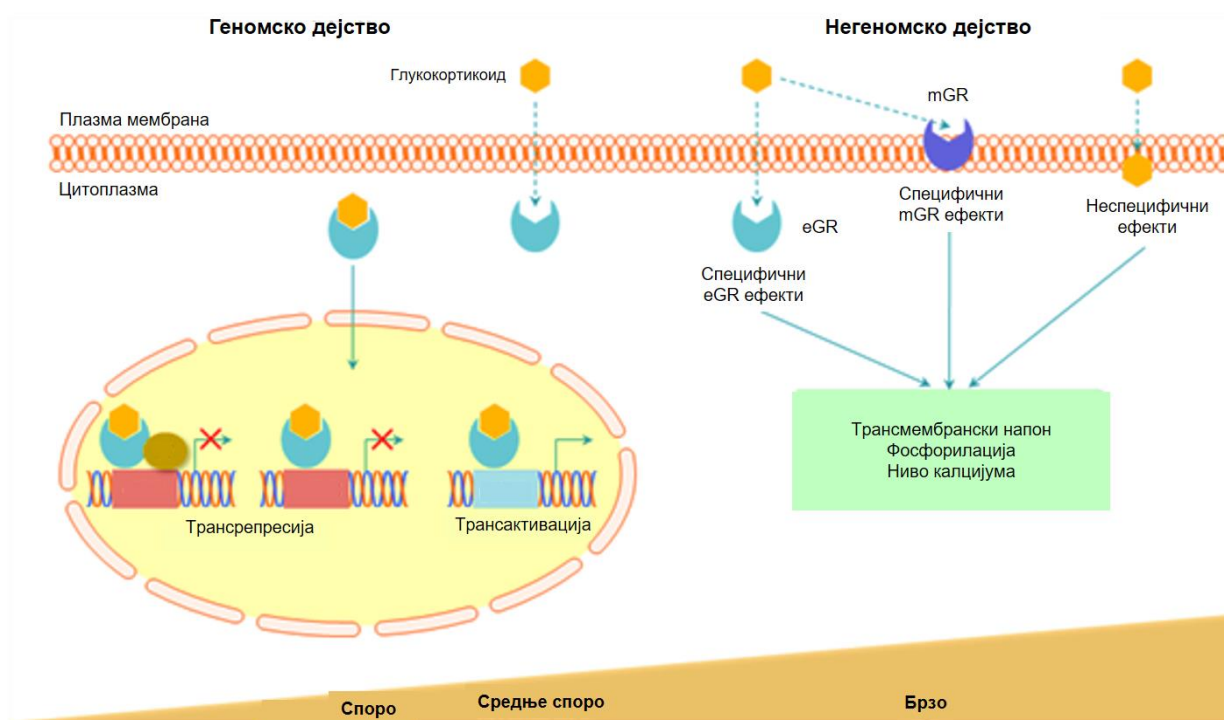
Као резултат каталисаних реакција и са цитохромом P-450 и са HSD у митохондријама настаје Δ^5 -прегненолон, који се затим транспортује у ендоплазматски ретикулум у ком се користи као прекурсор за синтетисање прогестерона. Треба нагласити да даље реакције се у највећој мери одвијају у гонадалном ткиву оба пола. Дакле, прегненолон и прогестерон представљају главне прекурсоре за даљу синтезу полних хормона (Сл. 8). У митохондријама се уклања бочни C20 ланац, као први корак у биосинтези. Након тога остатак биосинтезе се одвија у глатком ендоплазматском ретикулуму. Реакције које следе су реакције модификације C3 и C17 положаја, које су каталисане са HSD ензимима. Главни процес ове серије реакција је оксидација А прстена, где као продукт настају андростенедион и тестостерон. Мала количина тестостерона даље подлеже редукцији уз 5 α -редуктазу до дихидротестостерона. Андрогени су неопходни прекурсори естрогена. Кључни корак у формирању естрогена је ароматизација А прстена, реакција је изразито фаворизирана у јајницима и плаценти. Ензим који је одговоран за ароматизацију је ароматаза или CYP19 (дакле спада у групу цитохром P-450 ензима), који је локализован у ендоплазматском ретикулуму. Естрадиол и естроген су формиран, дакле, од тестостерона и андростенедиона, тим редом. Наведена два естрогена могу међусобно да се конвертују један у други 17 β -HSD ензимима (R. Verne, 2004).

Синтетисани стероидни хормони испољавају своје физиолшко дејство везивањем за рецепторе стероидних хормона и то на геномски и негеномски начин. Наведени рецептори се могу наћи у нуклеусу (једру), цитосолу али такође и на плазма мембрани циљне ћелије, међутим углавном су унутарћелијски. Рецептори стероидних хормона се могу поделити на нуклеарне и друге рецепторе (рецептор спојен са G-протеином, GPCR; јонски канали и SHBG/SHBG-R комплекс).

Стероидни рецептори из фамилије нуклеарних рецептора су уствари транскрипциони фактори. У зависности од типа рецептора могу да буду локализовани у цитосолу и приликом активације да пређу у нуклеус или да су од почетка у нуклеусу где чекају улазак стероидног хормона у нуклеус и тиме активацију.

Геномско дејство стероидног хормона се испољава везивањем хормона за рецептор који се димеризован везује за делове ДНК који контролишу експресију одређеног гена (Novac & Heinzl, 2004) (Сл.10).

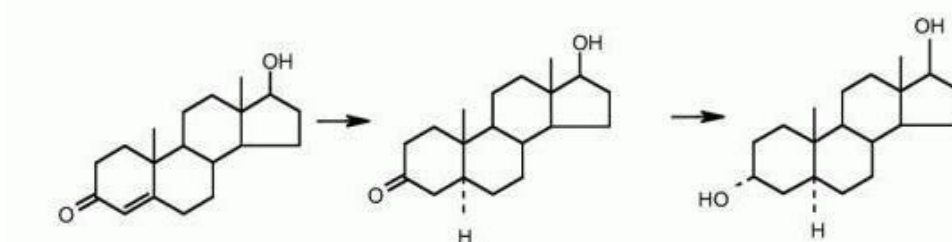
Негеномско дејство се најчешће испољава преко рецептора на ћелијској мембрани, где се потом сигнал преноси преко Akt и фосфоинозитид 3-киназе (Aquila et al., 2004) (Сл.10).



Слика 10. Геномско и негеномско дејство стероидних хормона и њихови сигнални путеви (Berki, Boldizsar, Mariann, Talaber, & Varcza, 2011).

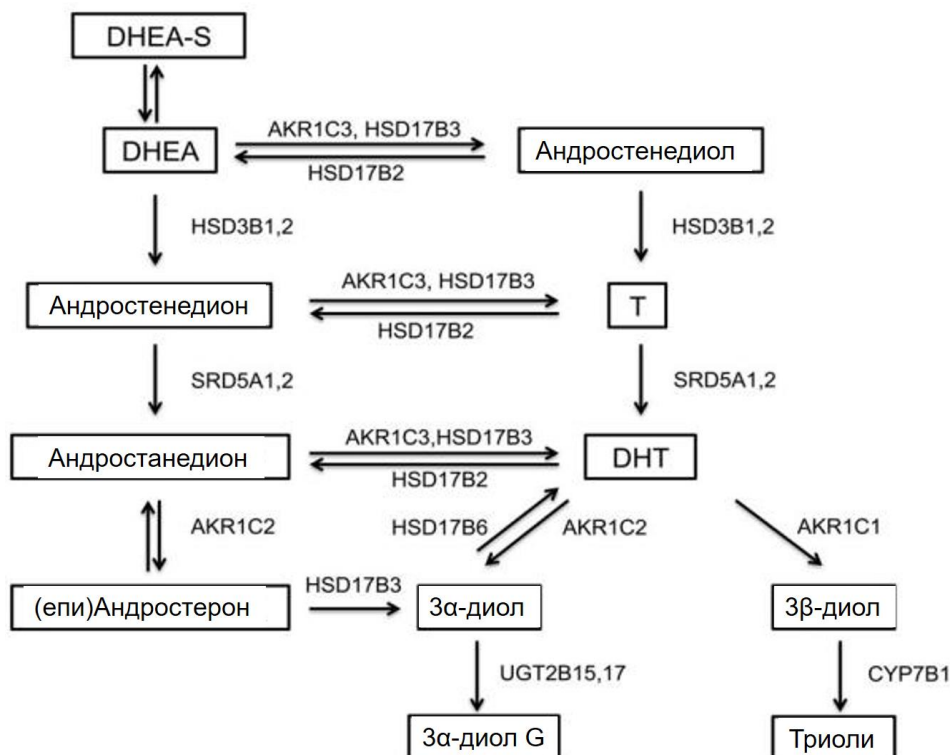
3.1.1. AKRIC у андрогеном метаболизму

Андроген је било који природни или синтетички стероидни хормон који регулише развој и одржавање мушких карактеристика и то везивањем за андрогени рецептор. Ово обухвата ембрионални развој примарних мушких полних органа и развој мушких секундарних полних карактеристика у пубертету. Андрогени се синтетишу у тестисима, јајницима и адреналној жлезди. Главни андроген код мушкараца је тестостерон. Дихидротестостерон (DHT) и андростенедион су од једнаке важности у развоју мушкараца (Сл. 11). DHT *in utero* доводи до диференцијације пениса, скротума и простате. Код одраслих јединки DHT доприноси ћелавости, расту простате и активности знојних жлезда. Жене такође имају андрогене али у нижим концентрацијама које имају улогу у функционисању либида. Поред тога андрогени представљају прекурсоре за естрогене и код жена и код мушкараца (Johnson & Everitt, 2007).



Слика 11. Структуре главних мушких хормона: тестостерон, дихидротестостерон, андростенедиол.

Андрогени метаболизам у свом најширем смислу, подразумева секрецију, транспорт, усвајање од стране ткива, периферну трансформацију (Сл. 12) и екскрецију C19 стероида (андрогена). У периферном ткиву, AKR1C ензими функционишу као 3- и 17-кетостероид редуктазе, које катализују формирање најпотентнијег андрогена 5α -дихидротестостерона (5α -DHT) или његову инактивацију која доводи до формирања инактивних облика андрогена 5α -андростане- $3\alpha,17\beta$ -диола (3α -диол) или 5α -андростане- $3\beta,17\beta$ -диола (3β -диол) (Rižner & Penning, 2014).



Слика 12. Пuteви метаболисања C19 андрогена (Ishizaki et al., 2013).

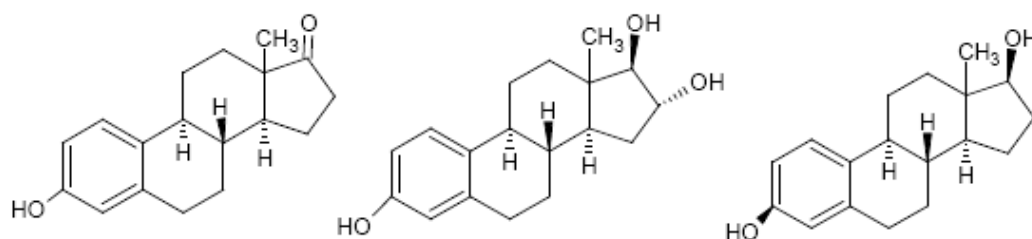
AKR1C3 има активност 17-кетостероид редуктазе и има највшу каталитичку ефикасност од свих AKR1C ензима у редукцији Δ^4 -андроген-3,17-диола у тестостерон. Поред наведеног, ова изоформа редукује 5α -андростане-3,17-дионе у 5α -DHT и на тај начин заобилази тестостерон (познато и као алтернативни пут за синтезу DHT), поред наведеног редукује и андростерон до 3α -диола (алтернативни прекурсор за 5α -DHT).

Дакле формирање свих активних андрогена одвија се преко AKR1C3. AKR1C2 и AKR1C4 формирају прекурсор за андростерон, редукцијом 5α -прегнан-3,20-диона у 3α -хидрокси- 5α -прегнан-20-он (алопрегнанолоне) који је дакле, прекурсор. Дакле, ове две изоформе су битне у индиректној алтернативној синтези андрогена, међутим AKR1C2 је битан и у катализи инактивације 5α -DHT редукцијом до 3α -диола. AKR1C1 углавном формира 3β -диол, потентни агонист естрогеног рецептора β (ER β) који има антипролиферативни ефекат. AKR1C4 који је специфичан за јетру формира 3α -диол. AKR1C3 је знатно мање ефикасан као 3-кетостероид редуктаза и углавном конвертује 5α -DHT у 3α -диол (Rižner & Penning, 2014).

У јетри циркулишући тестостерон се метаболише или преко 5α -редуктазе или преко 5β -редуктазе да би настао 5α -DHT или 5β -DHT. Затим редукција 3-кетостероида путем AKR1C ензима доводи до настанка четири стереоизомерна тетрахидростероида који се даље конјугују ензимима из фазе II метаболизма. Битну улогу у даљем метаболизму има и AKR1D1. Даљу редукцију 5β -DHT до етиохоланона катализују AKR1C ензими и то изоформа C4 као најнефективнија, а затим редом следе изоформе C2, C3 и C1 (Rižner & Penning, 2014).

3.1.2. AKR1C у естрогеном и прогестеронском метаболизму

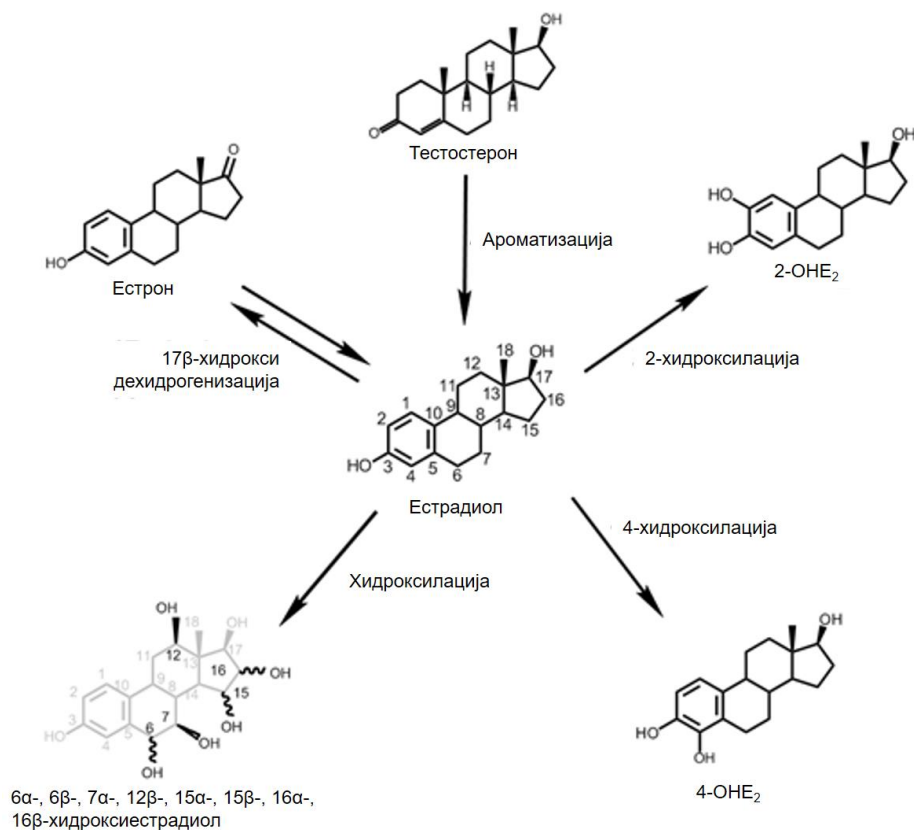
Естрогени или оестрогени су примарни женски полни хормони. Одговорни су за развој и регулацију женског репродуктивног система и секундарних полних карактеристика. Постоје три главна ендогена естрогена код жена који имају естрогену хормонску активност: естрон, естрадиол и естриол (Сл. 13). Естрански стероид естрадиол је најпотентнији.



Слика 13. Структуре три главна естрогена: естрон, естриол и естрадиол.

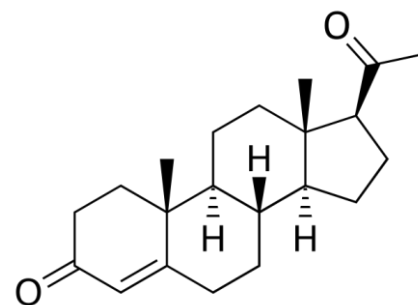
Као и сви стероидни хормони и естрогени дифундују кроз ћелијску мембрану и унутар ћелије се везују за естрогене рецепторе који затим модулишу експресију одређених гена. Естрогени се користе и као лекови, на пример у хормонској терапији у менопаузи и хормонској контроли порођаја.

Естрогени се метаболишу хидроксилацијом каталисаном ензимима цитохром Р450 као што су CYP1A1 и CYP3A4 и путем конјугације естроген сулфотрансферазом и UDP-глукуронилтрансферазом (глукуронидација). Поред тога, естрадиол се дехидрогенизује са 17 β -хидроксистероид дехидрогеназом (Сл. 14) у знатно мање потентан естроген – естрон. Ове реакције се прво дешавају у јетри, али такође и у другим ткивима (Rižner & Penning, 2014).



Слика 14. Главне руте метаболизма естрадиола (интернет страна: Wikipedia "Hydroxylation of estradiol").

Као што је наведено, чланови AKR1C подфамилије у периферним ткивима имају и 17-кетостероид редуказну активност у циљу редукције слабог естрогена - естрона у потентни естроген - 17 β -естрадиол. За спровођење ове реакције најефикаснији је AKR1C3. Истраживањем је показано да AKR1C3 конвертује естрон у естрадиол брже него што катализује конверзију андростенедиона у тестостерон, чак и брже од конверзије прогестерона у хидроксипрегненон. Друге изоформе AKR1C имају знатно мању активност у формирању 17 β -естрадиола.



Слика 15. Структура прогестерона.

Прогестерон је ендогени стероид и прогестеронски хормони су укључени у менструални циклус, трудноћу и ембриогенезу. Припада групи стероидних хормона прогестогена и представља главни прогестоген у телу (Сл. 15). Прогестерон има бројне важне функције у телу, представља и један од круцијалних метаболичких интермедијера у продукцији других ендогених стероида, укључујући полне хормоне и кортикостероиде, и такође има битну улогу у функционисању мозга као неуростероид (Johnson & Everitt, 2007).

Метаболизам прогестерона је брз и обиман и дешава се углавном у јетри, иако су ензими који метаболишу прогестерон такође присутни и у мозгу, кожи и другим ткивима. Прогестерон је веома подложен ензимској редукцији путем редуктаза и хидроксистероид дехидрогеназа због своје двоструке везе на позицији између C4 и C5 атома и због своја два кетона на C3 и C20 позицији (Stanczyk, 2003).

Што се тиче улоге изоформи AKR1C1, 2 и 3 у метаболизму прогестерона, оне имају битну улогу и то катализују редукцију прогестерона у мање потентан прогестаген – 20 α -хидрокси-4-прегнен-3-он. Даље, метаболисање 5 α / β -прегнана (прекурсора прогестерона) се одвија под контролом AKR1C ензима. Показано је да метаболити 5 α -прегнана стимулишу пролиферацију ћелијских линија канцера дојки, док 5 β -прегнани имају утицаја у хуманом порођају (Rizner & Penning, 2014). 5 β -прегнан представља прекурсор прогестерона, прегнанских алкохола, кетона и неколико адренкортикалних хормона.

3.1.3. AKR1C у неуростероидном метаболизму

Неуростероиди, познати као и неуроактивни стероиди, представљају ендогене или егзогене стероиде који брзо мењају неуронску екситабилност путем интеракција са јонским каналима који су контролисани са лигандима или са неким другим рецепторима на површини ћелије (Lan & Gee, 1994). Термин неуроактивни стероиди указује на стероиде који могу бити синтетисани у мозгу или у некој ендокриној жлезди и затим путем крвотока доћи до мозга где имају ефекат на функције мозга (Srivastava et al., 2011). Неки од ових стероида могу да имају и ефекат на експресију гена путем нуклеарних стероидних рецептора.

Метаболити 5 α -прегнана који настају од прогестерона помоћу SRD5A1 ензима потенцирају акцију агониста γ аминобутиричне киселине рецептора А (GABA_A). Уколико нема рецептора, агонисти нису ефикасни, међутим у присуству GABA рецептора могу да иницирају отварање канала за јоне хлора. Алопрегнанолоне је

потентни алостерни модулатор GABA_A, док је 5 α -прегнан-3 α ,20 α -диол мање неуроактиван. Сви AKR1C ензими реагују на 5 α -прегнане. Изоформе AKR1C1, C2 и C4 имају афинитет према редукцији 5 α -DHP, док AKR1C1 претежно формира 20 α -хидрокси-5 α -прегнан-3-он, AKR1C2 претежно алопрегнанолон. Међутим AKR1C1 катализује и редукцију и самим тим и инактивацију алопрегнанолона формирањем 5 α -прегнане-3 α ,20 α -диола. Истраживања указују да у мозгу AKR1C2 формира алопрегнанолон, док AKR1C1 је укључен у његову инактивацију. Такође AKR1C1 може и да регулише концентрацију алопрегнанолона онемогућавање његовог формирања од прогестерона и катализом инактивације (Rižner & Penning, 2014).

3.1.4. AKR1 у биосинтези жучних киселина

Жучне киселине су стероидне киселине превасходно присутне у жучи. Различите молекуларне форме жучних киселина могу да се синтетишу у јетри.

AKR1C4 је претежно експресован у јетри у којој има кључну улогу у биосинтези жучних киселина. Ова изоформа функционише у садејству са AKR1D1 ензимом. AKR1D1 ензим катализује 5 β -редукцију прекурсора жучних киселина, а тако обрађене прекурсоре даље наставља да модификује AKR1C4 редукцијом 3-кето групе (Rižner & Penning, 2014).

3.1.5. AKR1C у метаболизму стероидних конјугата

Конјугација (друга фаза метаболизма) подразумева додавање сулфатне или глукуронидне групе на слободан стероид, естроген или андроген, којим се промовише екскреција из тела (Gomes, Meredith, Snape, & Sephton, 2009). AKR1C ензими катализују редукцију карбонилне у хидроксилну групу на стероидном молекулу (реакције прве фазе метаболизма), којом је затим омогућен следећи корак – конјугација. Накнадно је установљено да ензими AKR1C утичу и на већ конјуговане стероиде, што указује на постојање алтернативног пута у ком су стероиди конјуговани прво на 17 β -позицији, а затим редуктовани на 3-позицији (Rižner & Penning, 2014).

3.1.6. AKR1 у метаболизму синтетичких стероида

Многи синтетички стероиди имају Δ^4 или 3-, 20-кето-стероид структурни мотив и као такви се очекује да буду супстрати за AKR1 ензиме. У прилог овом очекивању иде чињеница да AKR1 јесу ензими који су укључени у метаболизам тиболона и прогеистина, норетинодрела и дидрогестерона, као и синтетичких глукокортикоида.

Триболол је пролек који се користи у третманима симптома пост-менопаузе. Прогестин дидрогестерон се користи у терапијама замене хормона (*енгл.* hormone-replacement therapy), у терапијама ендометриозе, менструалних поремећаја, недостатка жутог тела. Инхалирани синтетички кортикостероиди се користе у антиинфламаторним терапијама (Rižner & Penning, 2014).

3.2. AKR1 у контроли концентрације лиганата нуклеарних рецептора

Хумани AKR1 ензими катализују или конверзију слабих лиганата у потентне лиганде нуклеарних рецептора или су укључени у елиминацију ових лиганата. На овај начин AKR1 ензими контролишу ниво потентних лиганата који могу да окупирају и активирају нуклеарне рецепторе унутар ендокриног циљног ткива. Ови рецептори се везују за одговарајуће елементе ДНК (*енгл.* DNA response elements) у виду хомо или хетеродимера, и на тај начин регрутују или коактиваторе или корепресоре, путем којих се контролише транскрипција гена. Дакле, AKR1 модификацијом стероида, који су лиганди за нуклеарне рецепторе, учествује у контроли андрогених, естрогених и прогестеронских рецептора. Поред тога, такође контролишу биосинтезу неуростероида и модулирају активност GABA рецептора А који функционише као лигандом контролисани јонски канал и као лигандом контролисани и волтажно зависни NMDA рецептор (Rižner & Penning, 2014).

3.3. Експресија AKR1 гена у патолошким стањима

AKR1 ензими имају кључну улогу у регулацији стероида и путем генске експресије и као такви имају улогу у патогенези болести. У оболелом ткиву експресија AKR1 гена и сплајсовање информационе РНК су измењени доводећи до различитих транскрипционих варијанти, протеинских изоформи и самим тим до промене количине протеина и њихове активности. Промењен ниво експресија је установљен код хормон-зависних болести простате, дојки, као и код ендометријалних канцера (Rižner & Penning, 2014).

3.3.1. AKR1(C3) и канцер простате

AKR1C2 и AKR1C3 су у великим количинама експресовани у нормалној простати. Истраживањима је показано да је изоформа AKR1C3 најзаступљенији стероидогени ензим у канцеру простате резистентном на кастрацију (*енгл.* castration-resistant prostate cancer, CRPC) и у метастазама меканих ткива. CRPC представља

фатални облик канцера простате. Такође је детектована повећана експресија и изоформи AKR1C1 и C2 у CRPC у односу на примарни канцер простате, међутим без статистичке значајности. Истраживањима на ћелијским линијама канцера простате (LNCaP, DuCaP, VCaP) установљено је повећање експресије и AKR1C3 и AR. Дакле, сумирано, истраживањима је показано да су транскрипциони нивои AKR1C3 константно прекомерно експресовани у CRPC и да је стимулисано смањењем андрогена тако да је то уствари део адаптивног одговора тумора да прави свој андроген у присуству смањеног нивоа циркулишућег андрогена. Андрогенска зависност опстаје јер тумор покреће адаптивни одговор који одржава и сигналинг андрогеног рецептора. Опција за инхибицију унутартуморске биосинтезе андрогена је употребом инхибитора 17,20-лијазе, што онемогућава конверзију прегненолона у дехидроепиандростерон у жлезди и на тај начин ускраћује тумор од свог извора андрогена. У међувремену је и изоформа C3 постала званична мета за инхибицију у антиканцерогеним терапијама, на пример CRPC-а, дојке, и акутне мијелоидне леукемије (Penning, 2017; Rižner & Penning, 2014).

У завиности од доступности супстрата, ензими AKR1C2-C4 такође имају улоге у алтернативном путу (енгл. "backdoor" pathway) формирања 5 α -DHT, тако да изоформе C2 и C4 катализују редукцију 5 α -дихидропрогестерон до алопрегненолона, а изоформа C3 каталише редукцију андростерона до 3 α -диола, који се затим оксидује до 5 α -DHT и то превасходно са 17 β -HSD6 (Rižner & Penning, 2014).

3.3.2. AKR1 (C3) и канцер дојке

У дојкама људи, AKR1C1 и AKR1C3 су главне експресоване изоформе (Rižner & Penning, 2014). AKR1C3 је прекомерно експресован у каналним карциномима дојки и у корелацији је са експресијом ER α , и са враћањем канцера дојке. Као периферан 17 β -HSD која конвертује андростенедион у тестостерон, AKR1C3 је постао периферни главни извор тестостерона, супстрата за ароматазу која затим може синтетисати 17 β -естрадиол у дојскама. Дакле, инхибитори AKR1C3 имају место у третманима канцера дојки који су ER α позитивни и имају предност над инхибиторима ароматазе блокирајући системски биосинтезу естрогена (Penning, 2017).

3.3.3. AKR1 (C3) и ендометријалне болести

У хуманом утерусу (материци) експресија AKR1C гена је релативно ниска, а AKR1C2 и AKR1C3 су главни експресовани гени те подфамилије. Гени AKR1C су

такође експресовани и у ендометријалном канцеру и у ектопичном ендометријуму пацијената са ендометриозом. Знатно виши нивои информационе РНК AKR1C1 и C2 су детектовани у случајевима оваријалне ендометриозе у односу на нормални ендометријум здраве жене. Виши нивои изоформи C1 и C2 у ткиву ендометријском могу да допринесу појачаном метаболизму заштитног прогестерона у хидроксипрегненон (Rižner & Penning, 2014).

3.4. Наследне или једно-нуклеотидне варијанте AKR1 ензима

Наследне или једно-нуклеотидне алелске варијанте (*енгл.* single nucleotide polymorphisms - SNP) у *AKR1* генима могу да утичу на метаболизам егзогених и ендогених стероида и самим тим на развој патофизиолошких процеса. До сада је установљено неколико наследних мутација код изоформи AKR1C2 и AKR1C4 гена које су повезане са неуређеном полном дисгенезијом (*енгл.* disordered sexual dysgenesis, DSD) (Rižner & Penning, 2014).

3.5. AKR1C у метаболизму ксенобиотика

Ксенобиотици представљају супстанце које нису природно присутне у организму. Специфични ксенобиотици могу да се поделе у две групе и то токсини који природно настају у спољашњој средини (биотоксини) и лекови и слични фармацеутици.

Биотоксин. NNK (4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone) представља један од најјачих нитрозамин канцерогена у дувану. Међу цитосолним ензимима јетре, 40% детоксификације организма од овог канцерогена врше AKR1C1, C2, C4 и 1B10 (Atalla, Breyer-Pfaff, & Maser, 2000).

Фармацеутици. Бројна фармаколошка једињења имају карбонилни део (углавном кетонски) и као такви представљају потенцијалне супstrate или регулаторе активности AKR генерално. Листа потенцијалних супстрата обухвата разне фармацеутике, попут антиканцер лекова, антипсихотика, антидепресива, антагонисте опијата, антиасматике, антидијабетике и антиеметичне лекове. За неке фармацеутике, попут антиканцерогених лекова, на пример орацина, редукција представља деактивацију лека, што подразумева губитак антиканцерогеног ефекта, док за друге редукција путем AKR представља активацију једињења и самим тим је неопходна да би лек постао активан.

Антиканцерогени лекови. Прекомерна продукција AKR1C3 ензима у туморима, због претходно наведеног има велики значај у антиканцерогеним терапијама и третманима. Орацин припада изоквинолној класи једињења и као такав истраживањима се потврдило да подлеже редукацији од стране AKR1C3 и притом настаје дихидроорацин, који више нема терапеутску ефикасност. Поред орацина, AKR1C3 редукује и антиканцер лек доксорубицин у своју неактивну форму, односно хидрокси метаболит доксорубицинол. Међутим, сама инактивација није у тој мери проблем колико нус ефекат неактивне форма јер се сматра да је она одговорна за кардиомиопатије констатоване током хемотерапије доксорубицином (Novotna, Wsol, Xiong, & Maser, 2008).

Дакле, редукација карбонилне групе од стране AKR1C на антиканцерогеним лековима представља један од главних фактора који доприноси развоју отпорности на хемотерапију и кардиотоксичности ових метаболита лекова, тако да је данашњи тренд усмерен у правцу развоја AKR инхибитора у терапији канцера да би се повећала ефикасност лекова и спречила нежељена дејства (Barski et al., 2009).

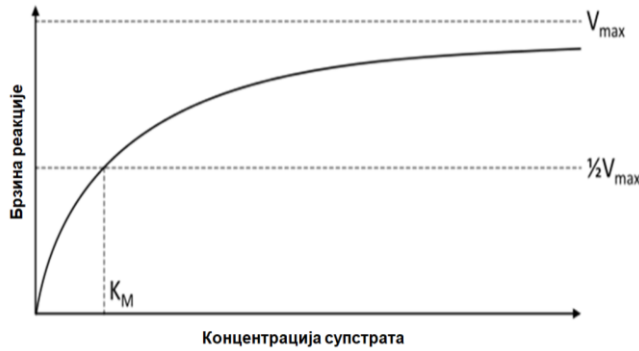
4. ЕНЗИМИ КАО МЕТЕ ЗА ЛЕКОВЕ

Ензими су одличне мете у фармаколошким интервенцијама, захваљујући својим есенцијалним улогама у животним процесима и патофизиологији. Структура активног места ензима и других џепова за везивање лиганда у ензиму су идеални за високо-афинитетне интеракције са инхибиторима посебно у случајевима када је инхибитор по структури сличан леку. Инхибитори ензима данас представљају скоро половину од лекова који су данас у употреби (Copeland, 2005).

Коначан циљ било које претраге за новим леком је да се нађе једињење које ће бити ефективно *in vivo*. Дакле, најбоље поређење једињења је преко концентрације која продукује жељени ефекат у ћелији или у животињи. Међутим, врло је непрактично са више аспеката тестирати сва једињења која потенцијално могу бити инхибитори на ћелијама и животињама па се из тог разлога прве оптимизације и тестирања једињења спроводе *in vitro* у оквиру ензимских есеја. Да би се постигли што веродостојнији резултати, ензимски есеј се дизајнира тако да имитира физиолошке услове што је боље и ближе могуће (Copeland, 2005).

4.1. Ензимски есеји и кинетика

Ензими представљају протеине који убрзавају хемисјке реакције у биолошким системима и из тог разлога се називају и биокатализатори. Убрзавање реакција се постиже снижавањем енергије активације трансформације супстрата у продукт. Ензимски есеј представља лабораторијску процедуру за мерење брзине ензимске реакције. Мерење брзине реакције, односно активности ензима, заправо се своди на праћење промене у концентрацији или супстрата или продукта са временом. Постоје бројне методе за мерење, а најчешће коришћена је спектрофотометријска јер омогућава континуално праћење промене концентрације било производа или реактанта преко промене апсорбанце светлости на одређеној таласној дужини. Већина ензимских истраживања је фокусирана на почетни, линеарни део ензимске реакције, међутим такође је могуће и мерити комплетну реакциону криву и прилагодити (*енгл.* fitting) ове податке у нелинеарну једначину. Главни параметри који се користе за описивање биокатализованих реакција су K_m и V_{max} (Сл. 16).



Слика 16.
Општи приказ
зависности
концентрације
супстрата и брзине
реакције са
обележеним K_m и V_{max}
(слика: Thomas Shafee).

K_m представља концентрацију супстрата при којој се постиже половина максималне брзине реакције, карактеристична је за сваки ензима за дати супстрат и има велики значај у ензимологији јер представља меру афинитета неког ензима за одговарајући супстрат, док V_{max} представља максималну брзину реакције која се постиже при високим концентрацијама супстрата (много већим од вредности K_m) због тога што се тада целокупна количина ензима у реакционој смеши налази у комплексу ензим-супстрат (Petrović, 1998).

4.2. Инхибиција ензима

Ензимски инхибитор је молекул који се везује за ензим и смањује његову активност. Како блокирање активности одређених ензима може да убије патогене или да исправи метаболичку неравнотежу, многи лекови су заправо ензимски инхибитори. Везивање инхибитора може да буде повратно или неповратно. Неповратно везивање инхибитора углавном доводи до формирања ковалентних веза, док повратно везивање је остваривањем нековалентних веза. Повратна инхибиција се дели компетитивну, некомпетитивну, акомпетитивну и мешану. У компетитивној инхибицији, супстрат и инхибитор не могу да се везују у исто време, односно такмиче се за везивање у истом везном месту. Акомпетитивна инхибиција се карактерише тиме да се инхибитор везује само за претходно створен комплекс супстрат-ензим. Некомпетитивна инхибиција смањује активност ензима али не утиче на везивање супстрата (Strelow et al., 2012).

Бројни молекули у виду лекова су инхибитори ензима, тако да њихово откривање и унапређење представља активну област истраживања у биохемији и фармакологији. Ензимски инхибитори који имају медицински потенцијал се углавном процењују на основу њихове специфичности (могућношћу да се са високим афинитетом везују за само један протеин) и њихове потентности (равнотежна константа дисоцијације ензим-инхибитор комплекса). Висока специфичност и

потентности одређеног инхибитора стриктно указује на то да ће лек имати малобројне и слабе нежељене ефекте (нус појаве) и због тога веома ниску токсичност (Strelow et al., 2012).

4.2.1. Квантитативно поређење инхибиторног потенцијала

У претходном делу је описано постојање три врсте повратне инхибиције. Зашто је битно то дефинисати у истраживањима и развоју лекова? Врста инхибиције је битна за квантитативно поређење ефекта различитих једињења на циљни ензим, као и за прављење квантитативног поређења афинитета одређених једињења према различитим циљним ензимима. Познавањем модалитета инхибиције, могуће је радити поређења на рационалној основи употребом ензим-инхибитор дисоцијационе константе, K_i . Релативни инхибиторни потенцијал се често изражава и поређењем процента инхибиције изазване различитим инхибиторима на константној концентрацији ензима, инхибитора и супстрата. Боља квантитативна процена потенцијала инхибитора се постиже мерењем концентрације инхибитора потребне за 50% смањење активности ензима под специфичним сетом реакционих услова, оваква концентрација инхибитора се означава као IC_{50} вредност. Међутим, IC_{50} вредност може да варира са концентрацијом супстрата и самом природом супстрата, у зависности од модалитета инхибиције. На пример, поређење IC_{50} вредности добијене у различитим лабораторијама се тешко може поредити осим уколико нису обе лабораторије користиле идентичне услове, посебно да ли је коришћен исти супстрат и у истој концентрацији, затим концентрација кофактора, рН реакционе смеше, време прединкубације и инкубације итд. Са друге стране константа дисоцијације за инхибитор (K_i) представља термодинамичку константу за дати сет услова у есеју (температура, јонска јачина, рН итд.) и бар када је компетитивна инхибиција у питању, не зависи од идентитета супстрата и концентрације (Copeland, 2005).

4.2.2. Откриће и дизајн инхибитора

Нови лекови су продукти веома дуготрајних процеса развоја. Некада једини начин да се открије нови ензимски инхибитор је био путем „покушаја и грешке“: претраживањем великих библиотека једињења наспрам циљног ензима. Овај начин рада је још увек у оптицају али побољшан употребом комбинаторне хемије која брзо продукује велику количину нових једињења (Korppitz & Eis, 2006). Новији приступ обухвата рационални дизајн лекова уз употребу тродимензионалних структура

активног места ензима за предвиђање који молекули би могли да буду инхибитори (Scapin, 2006). Ова предвиђања се онда тестирају и можда се неки од једињења и покаже као инхибитор. Тај нови инхибитор се затим користи да се добије структура ензима у комплексу са инхибитором да би се утврдило како се молекул везује у активном месту, што даље може да омогући увођење одређених промена на инхибитору ради оптимизације везивања. Ови тестови и циклуси унапређивања се затим понављају док се не продукује довољно потентан инхибитор (Gohlke & Klebe, 2002). Такође су развијене и методе засноване на употреби рачунара за предвиђање афинитета везивања инхибитора за ензим, као што су молекуларно усидравање и механика (Glen & Allen, 2003). Једна од фаза развоја инхибитора је и усмерена (навођена) оптимизација (*енгл.* lead optimization): усмерена оптимизација је цикличан процес дизајнирања и синтетисања структурних аналога најпотентнијег (водећег) једињења, праћен биохемијским и биолошким проценама тих аналога. Циљ овог процеса да се разумеју структурне карактеристике везујућег афинитета циљног једињења кроз истраживање везе структуре и активности (*енгл.* structure-activity relationship, SAR), употребом *in vitro* ензимског есеја. Кроз системске хемијске варијације у структури једињења и биохемијским проценама, SAR анализе се користе за развој хипотетичког модела који се затим у зависности од основних интеракција протеина и лиганда, модификују. Циклични SAR процес је подржан са структурним информацијама од кристалографије X-зрацима, NMR спектроскопијом и/или рачунарским моделовањем (Copeland, 2005).

5. ИНХИБИТОРИ AKR1(C3)

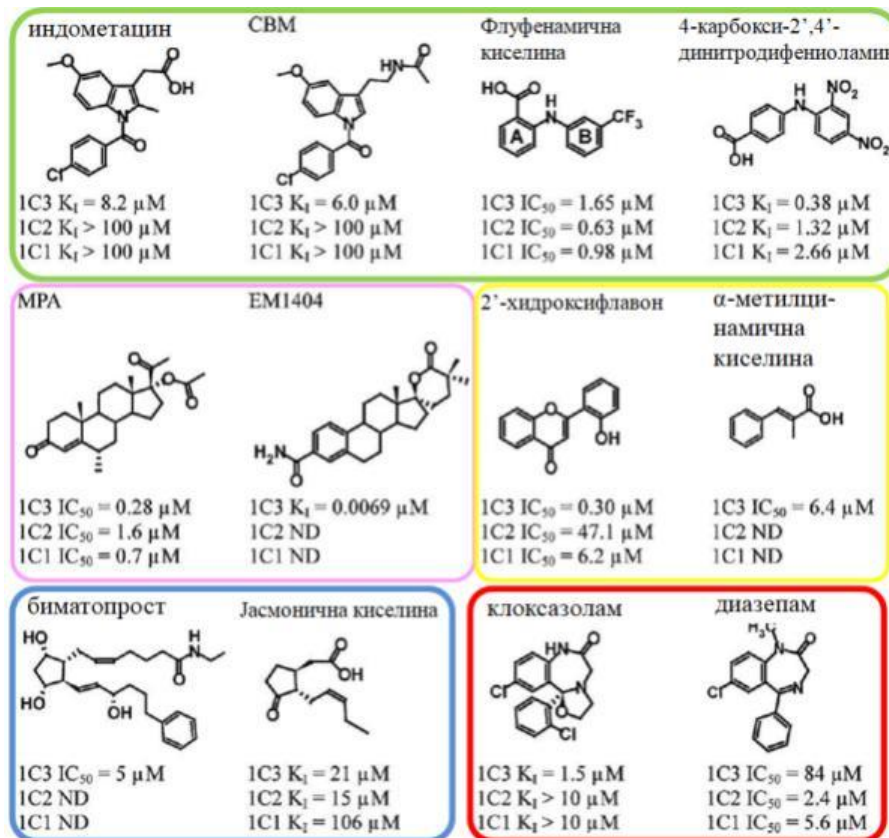
У поглављу о значају AKR1C у метаболизму (поглавље 3.), наведен је разлог и значај постојања инхибитора AKR1C у развоју различитих патолошких стања али и као ензима који деактивира друге лекове, међутим постоји и потреба за специфичним инхибиторима сваке изоформе AKR1C протеина, који би представљали добар алат за боље разумевање сваке изоформе посебно и њен значај у нормалној физиологији и болести. Међутим развој специфичног инхибитора, који ће да буде инхибитор за само једну изоформу представља велики изазов, јер све изоформе AKR1C имају међусобну сличност секвенце већу од 84% и укључени су у метаболизам стероида. AKR1C4 је ткивно специфичан и присутан је у јетри, AKR1C1, AKR1C2 и AKR1C3 су експресоване у различитим ткивима. Пример значаја специфичне инхибиције може да се види у примерима канцера простате који су повезани са прекомерном експресијом AKR1C3, где је циљ да се инхибира само изоформа C3, а не C1 и C2, јер друге две изоформе редукују потентне форме стероида у мање потентне. Инхибицијом активности изоформи C1 и C2 би се промовисао пролиферативни сигналинг у простати. Дакле, применом специфичног инхибитора изоформе C3 би се могла истражити још тачнија улога C3 у нормалном и абнормалном ћелијском сигналингу (Burns et al., 2011).

5.1. Инхибитори AKR1C3

AKR1C3 представља мету за развој инхибитора у малигнитетима који су зависни или независни од хормона јер функционише као главна периферна 17 β -хидроксистероид дехидрогеназа која продукује потентне андрогене, тестостерон и дихидротестостерон, а као простагландин (PG) F синтаза продукује пролиферативне лиганде за PG FP рецептор. Инхибитори AKR1C3 би дакле требали да имају другачије предности од већ постојећих терапеутика за третмане пацијената који имају канцер простате резистентан на кастрацију, канцер дојке и акутну мијелоидну леукемију. Способност AKR1C3 да регулише доступност лиганда за андрогени и естрогени рецептор у туморима поставља ову изоформу као приоритетну у односу на инхибиторе наведених рецептора.

AKR1C3 је могуће инхибирати са неколико структурних класа једињења. Структуре репрезентативних једињења од сваке од тих класа инхибитора се налази на Слици 17, заједно са њиховим потенцијалом према различитим изоформама протеина.

Иако постоји значајна разлика у структурама које инхибирају изоформу C3, ипак свака од њих поседује један или више прстенова и бар једну карбонилну групу. Занимљива је чињеница да је већина једињења која инхибирају изоформу C3 већ била описана као једињења која су ефективна у хемопревенцији канцера, на пример нестероидни антиинфламаторни лекови, медроксипрогестерон ацетат итд. Али и конзумација одређеног воћа и поврћа.



Слика 17. Хемијске структуре репрезентативних инхибитора AKR1C3 и њихов инхибиторни потенцијал према AKR1C3 и изоформама C1 и C2. Зелено – нестероидни антиинфламаторни лекови; розе – стероиди; жуто – флавоноиди и цинамичне киселине; плаво – деривати циклопентана; црвено – бензодиазепими; ND – није детерминисано; K_i – константа дисоцијације за инхибитор (Byrns et al., 2011).

Инхибитори се могу поделити на основу структуре и извора у неколико група: нестероидни антиинфламаторни лекови (*енгл.* non-steroidal anti-inflammatory drugs - NSAIDs), стероиди, флавоноиди и цинаминске киселине (биљни продукти), деривати циклопентана и бензодиазепими.

Нестероидни антиинфламаторни лекови. NSAID се посебно издвајају по свом потенцијалу да селективно инхибишу изоформу C3. Индометацин (Сл.17) испољава јаку селективност према изоформи C3 у односу на C1 и C2, док N-фенилантранилична киселина представља најјачи инхибитор C3. Доступност кристалних структура

изоформе C3 са везаним индометацином или N-фенилантранилинском киселином или флуфенаминском киселином омогућава предвиђање везе између структуре и активности. На основу те везе дизајниран је аналог индометацина, N-(4-хлоробензоил)мелатонин (*енгл.* N-(4-chlorobenzoyl)melatonin, CBM), који инхибира изоформу C3, а не C2 и C1 (Burns et al., 2011).

Стероиди. Као инхибитори изоформе C3 протеина користе се и стероидни инхибитори као аналози супстрата за изоформу C3, као што су МРА (медрокдипрогестерон ацетат) или лактони естрогена (Сл. 17). Међутим иако се МРА показао као инхибитор и рекомбинантне изоформе C3 и C3 који је експресован у ћелијама, ипак не испољава селективност унутар изоформи и везује се за бројне рецепторе стероидних хормона. Дакле, због тога није добар инхибитор за испитивање функције C3 изоформе. У случајевима ендометриозе или ендометријалног канцера, пожељно је да се инхибира изоформа C3 као и активација прогестеронског рецептора, тако да за наведене случајеве МРА има добар потенцијал и може да представља добру основу за даље истраживање. На основу утицаја на инхибицију C3, МРА се тестира у клиничким тестирањима у лечењу акутне мијелоидне леукемије у комбинацији са безафибратом.

Лактони естрогена су најпотентнији инхибитори AKR1C3 тренутно описани (према податку из рада Burns et al., 2011), са бројним једињењима који имају IC₅₀ вредност у nM опсегу. Једна од мана ових једињења је што још нису тестирана на другим изоформама протеина, а величина лактонског прстена врло вероватно може да ограничи инхибицију C1 и C2 изоформе. Већина ових једињења инхибира и 17βHSD ензиме, посебно тип 2 који врши оксидацију тестостерона и естрадиола, односно баш супротан процес од C3. Неколико једињења је описано која инхибирају C3 и испољавају минималну инхибицију 17βHSD типа 2, то су на пример дериват 3-дезоксiestрадиола са диметиллованим спиро-δ-лактоном на позицији 17 (Bydal, Luu-The, Labrie, & Poirier, 2009), као и EM1404, као још једним спиро-δ-лактоном (Qiu et al., 2007).

Флавоноиди и динамичне киселине (биљни продукти). Испитиван је и одређени број биљних једињења и њихових аналога као инхибитора AKR1C3. Једна обећавајућа група фито једињења су флавоноиди. Већина њих није специфична за C3 у односу на друге AKR1C изоформе, међутим 2'-хидроксифлаван има IC₅₀ вредност 300 nM за C3 и показује до 20 и 100 пута селективност над C1 и C2. Поред тога, прекурсори флавоноида – цинаминске киселине, показало се да инхибирају C3 са IC₅₀

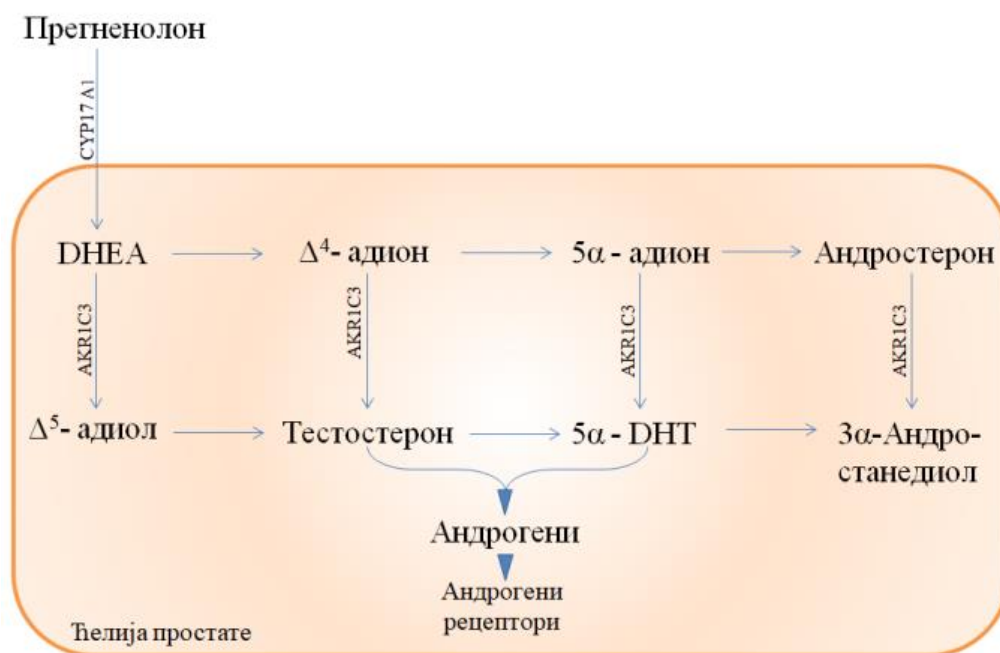
вредностима у μM опсегу. Флавоноиди су фитоестрогени и као такви имају доста циљних мета *in vivo*, што можда и није најбоља опција за развој селективног AKR1C3 лека. Иако је још у фази истраживања биљна једињења која имају својства инхибитора C3 би могла да се користе као терапеутик у хемопревенцији канцера.

Деривати циклопентана. Прстен циклопентана је кључна структурна карактеристика код простагландина, што је била основа за истраживање неколико циклопентана као инхибитора AKR1C3. Једно такво једињење је и биматопрост (Сл. 17) које је антиглауком и везује се за простагландински F2 рецептор да би ослободио окуларни притисак. Биматопрост је структурни аналог продукта AKR1C3 простагландина F_{2 α} са вредношћу IC₅₀ у μM опсегу за C3 изоформу. Још није тестирано на другим изоформама. Јасмонска киселина представља структурни аналог простагландина, пронађена је у биљкама у виду биљних хормона који регулишу биљни развој и одбрану. Јасмонска киселина инхибира C3 са сличним ефектом као и друге изоформе. Генерално гледајући, за сада (Burns et al., 2011) описани циклопентански инхибитори нису се показали као добра основа за даље тестирање селективних C3 инхибитора. Међутим, PGD2 има потенцијал у виду селективности према C3, па се из тог угла сматра да би ова класа могла ипак да има неки селективни инхибитор (Burns et al., 2011).

Бензодијазепини. Бензодијазепини су класа психоактивних лекова код којих основу структуре чини фузија прстена бензена и дијазепина (Shorter, 2005). Још једна група тестираних једињења као инхибитора C3 су и бензодијазепини. Како су AKR1C ензими укључени у биотрансформацију неуростероида и експересовани у мозгу, предложено је да се њиховом инхибицијом може допринети антианксиозним ефектима ове групе лекова. Већина једињења из ове групе, укључујући и дијазепам (Валијум), су се показали као инхибитори свих AKR1C ензима, са већом селективношћу над преостале три изоформе него C3 изоформом. Међутим, показало се да је пролек клоксазолам (*енгл.* clobazolam) релативно потентан инхибитор C3 изоформе који није значајно инхибирао друге изоформе. Клоксазоламни аналози који не подлежу метаболичкој активацији до анксиолитика, могу да представљају занимљиву опцију за истраживање AKR1C3 инхибитора (Burns et al., 2011).

5.2. Значај инхибитора C3 у канцеру простате

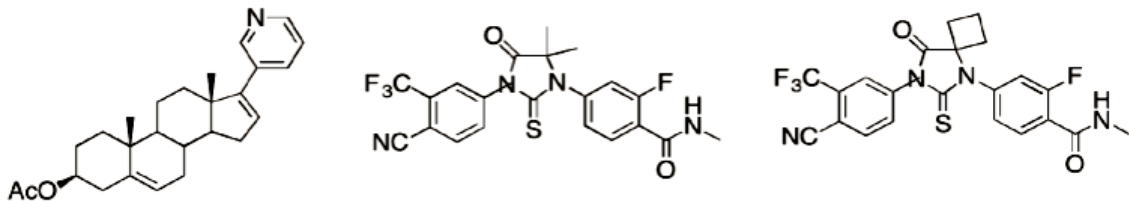
О значају AKR1C3 у развоју канцера простате је већ писано у оквиру поглавља о метаболизму (Поглавље 3.) али ће бити описано и овде. Активација андрогених рецептора (AR) има круцијалну улогу у развоју секундарних полих карактеристика мушкараца укључујучи и развој и раст простате. Поред наведеног, AR сигналинг има улогу и у развоју канцера простате. У оба случаја неопходан је извор андрогена. Према томе, један начин третирања канцера је са инхибиторима AR сигналинга. Главни проблем тренутних терапија је у чињеници да после неког времена ћелије канцера постају резистенте на терапију и због тога се канцер поново појави. Повратна форма канцера се назива канцер простате резистентан на кастрацију (CRPC) и углавном је фаталан. Један од протеина који представља мету у AR сигналингу је 17,20-лијаза (CYP17A1 или P450 17A1). Овај ензим каталише конверзију прегненолона и прогестерона у дехидроепиандростерон (*енгл.* dehydroepiandrosterone, DHEA) и андростенедион (Сл. 18) (Adeniji et al., 2012; Chen et al., 2015; Penning, 2014).



Слика 18. Део путева стероидогенезе у ћелији простате (адаптирано из (Adeniji, Chen, & Penning, 2013; Penning, 2014).

Абиратерон ацетат (Abi, Zytiga®) је инхибитор 17,20-лијазе (CYP17A1) (Сл. 18 и 19), који инхибицијом протеина ограничава тумор од његовог извора андрогена. Овај инхибитор се тренутно налази у клиничким истраживањима и одобрен је од стране америчке агенције за храну и лекове (*енгл.* Food and Drug Agency, FDA). Други приступ укључује инхибицију андрогеног рецептора и за сада најбоље пласирани је инхибитор

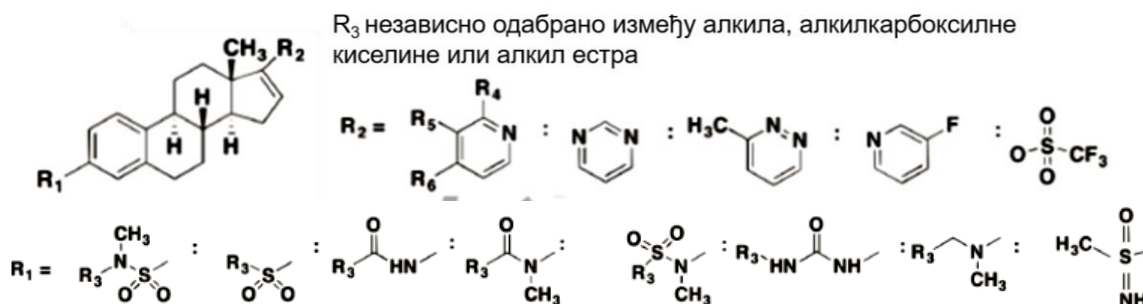
ензалутамид (ENZ), међутим, због нежељених ефеката на централни нервни систем, синтетисана је нова генерација једињења са једињењем AN-509 (Aplutamide) као представником (Сл.19). Ови инхибитори представљају антагонисте андрогеног рецептора али и онемогућавају транслокацију нуклеарног рецептора и његово везивање за хроматин. Мана абиратерона је у томе што он инхибира ране кораке у стероидогенези, што значи да инхибитор не инхибира само синтезу андрогена већ и продукцију физиолошки битних стероида попут глукокортикоида и минералокортикоида. Већи проблем оба инхибитора и абиратерона и ENZ, је у томе што продужавају живот пацијената са канцером простате резистентног на кастрацију за само 3-4 месеца јер се убрзо појави отпорност (резистентност) на лек (Penning, 2014; Yerru et al., 2013).



Слика 19. Структуре абиратерона (Abi), ензалутамида (ENZ) и апалутамида (ARN-509) (Penning, 2017).

Отпорност се јавља због поновне активације AR сигналинга у ћелијама канцера простате, који настаје као одговор на повећану концентрацију андрогена која затим индукује активацију AR (Liu et al., 2016). Затим је истраживањима 2016. године установљено да је прекомерна експресија AKR1C3 та која омогућава отпорност на Abi у канцеру простате, а гашењем његове експресије (*енгл.* knockdown) резистентност на Abi се поново успоставља (Liu et al., 2016). Због свега наведеног је акценат преусмерен на формирање инхибитора AKR1C3, а данашња истраживања покушавају да развију терапије које заправо обухватају комбинацију Abi и инхибитора AKR1C3, као начин да се заустави продукција потентних стероида. Међутим ни то није крај проблема. Поред тога што AKR1C3 продукује андрогене у канцеру простате, исти тај протеин је способан да неке антиканцерогене лекове третира као да су његов супстрат, тако да на тај начин смањује успех у антиканцер третманима (Barski et al., 2009). Напори у развоју AKR1C3 инхибитора су довели до открића стероидних и не-стероидних инхибитора (Сл. 20 и 21) (Adeniji et al., 2013). Већина фармацеутика који су засновани на стероидима су полу-синтетичка једињења која настају спајањем специјалних карактеристика са основном структуром стероида. У литератури таква разматрања су

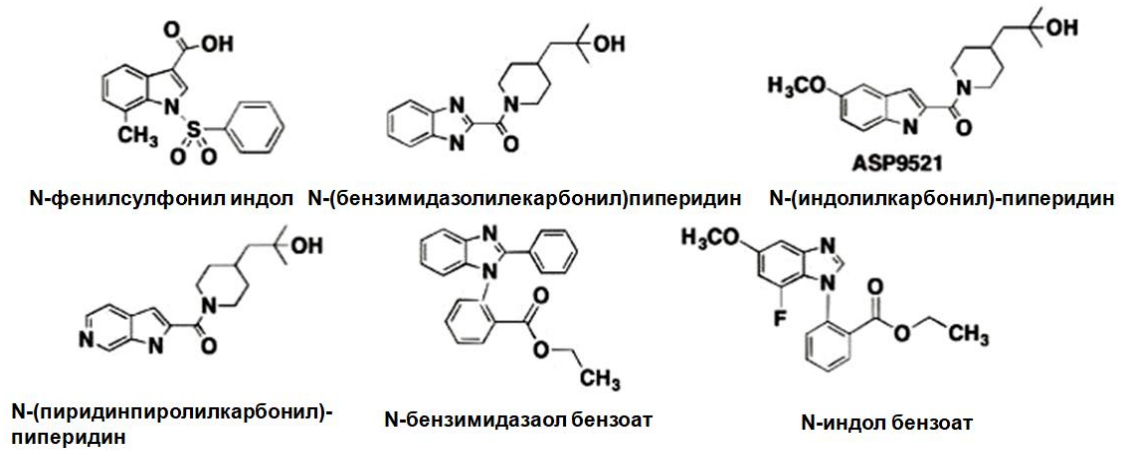
већ узета у обзир због потенцијала таквих једињења за везивање за рецепторе и њихове фармаколошке активности (Ajduković et al., 2015)



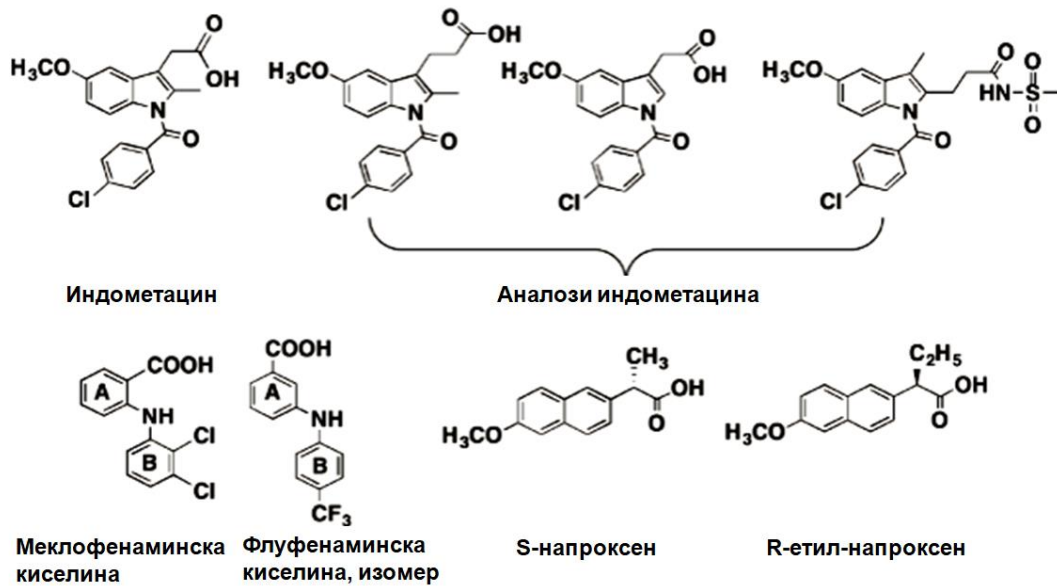
Слика 20. Структуре инхибитора AKR1C3 са стероидном основом (Penning, 2017).

Постоје бројна истраживања која за циљ имају да нађу инхибитор AKR1C3 и одређен део тих једињења је у различитим фазама истраживања. Већина тих инхибитора су монофункционални и делују на низводној путањи сингналинга од Abi. Уколико би такав инхибитор био потврђен он би био супериорнији од инхибитора CYP17 јер му је мета ензим који је укључен у унутартуморску биосинтезу андрогена. Због релативно брзог развоја резистентности, инхибитори AKR1C3 би се давали након третмана пацијената са Abi и/или ENZ, јер након њихове примене дошло би до прекомерне експресије AKR1C3. За сада добар потенцијал у истраживањима показује нестероидни инхибитор индометацин идентификован од стране Бирнса и сарадника (Burns, Steckelbroeck, & Penning, 2008), међутим поред њега доста обећавају и нестероидни бифункционални инхибитори који не само да инхибирају AKR1C3 већ и неку другу компоненту у сингналингу, а најчешће сам андрогени рецептор. Од бифункционалних највише обећавају GTX-560 14, BMT4-158 15, на Слици 21. су приказане структуре свих патентираних и стероидних и нестероидних инхибитора AKR1C3 (Lovering et al., 2004; Penning, 2017).

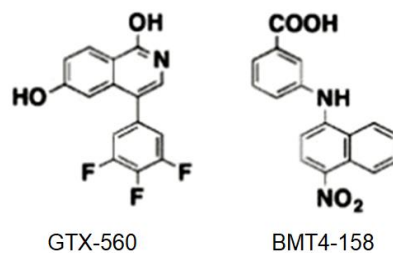
Нестероидни AKR1C3 инхибитори



Адаптирани нестероидни антиинфаматорни инхибитори



Бифункционални AKR1C3 инхибитори

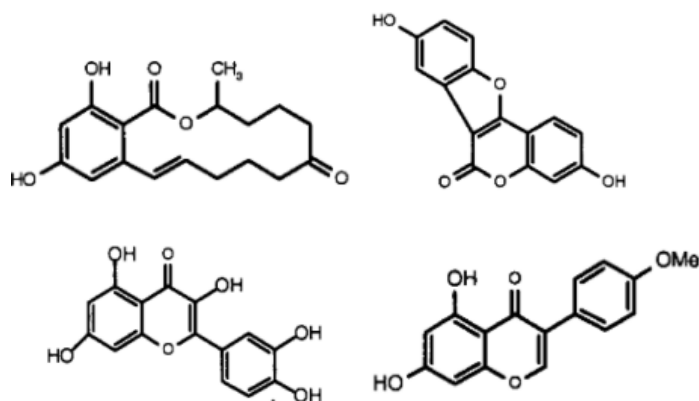


Слика 21. Структуре нестероидних инхибитора AKR1C3 (Penning, 2017).

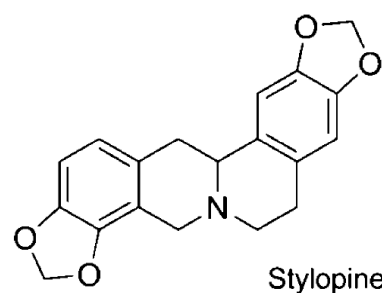
5.2.1. Биљни екстракти као инхибитори AKR1(C3)

Народна употреба природних продуката биљног порекла представља значајни материјал за откриће и развој потенцијалних медицинских агенаса (Sigstedt et al., 2008). Истраживањима је показано да фитохемикалије из исхране могу да буду добра

алтернатива у виду адјуванта за хемотерапије канцера који би могли да потпомогну смањење нежељених ефеката и развоја хеморезистентности, као и свих ефеката који су регулисани активношћу стероидних рецептора (Jung et al., 2017). До сад су установљени инхибиторни ефекти фитоестрогена, флавоноида, алкалоида на АКР (Krazeisen, Breitling, Möller, & Adamski, 2001; Skarydova et al., 2014). Истраживањем Кразајсена и сарадника је установљено да и редукујућа и оксидативна активност ензима AKR1C3 је инхибирана бројним супстанцама из биљака које се користе у исхрани и са биљкама повезаним организмима, посебно зераленоном, коуместриолом, флавоном кверцетином и изофлавоном биоханином А (Сл. 22) (Krazeisen et al., 2001). Године 2014. Скаримова и сарадници су публиковали рад у ком је изоквинолни алкалоид стилопин из *Chelidonium majus* биљке показао као добар инхибитор С3 изоформе (Сл. 23) (Skarydova et al., 2014).



Слика 22. Структуре једињења из биљака које имају инхибиторни потенцијал према AKR1C3. Од лево горе: зераленон, коуместрол, кверцетин и биоханин А (Krazeisen et al., 2001).



Слика 23. Структура стилопина, изоквинолног алкалоида (Skarydova et al., 2014).

У оквиру ове тезе је рађено на екстрактима биљака из Србије. Обзиром на наведени значај биљака као потенцијалних инхибитора АКР, биљке које се налазе на територији Србије због свог великог диверзитета имају огроман потенцијал за даља истраживања, која чак могу да буду и у предности у односу на до сада истажене врсте биљака у другим земљама.

5.3. Структурни увид у селективну инхибицију AKR1C3 на основу доступних кристалних структура

Кристалне структуре четири изоформе хуманог AKR1C ензима се активно истражују од стране неколико истраживачких група. За сада (октобар 2018) у Протеинској бази података (*енгл.* Protein Data Bank, PDB) постоје 45 различите структуре AKR1C3 (Табела 2). Ове структуре омогућавају добру основу за разумевање активности постојећих инхибитора и за рационалан дизајн будућих инхибитора AKR1C3 протеина са бољом селективношћу и потенцијалом.

Табела 2. Структуре протеина AKR1C3 на PDB-у са различитим лигандима.

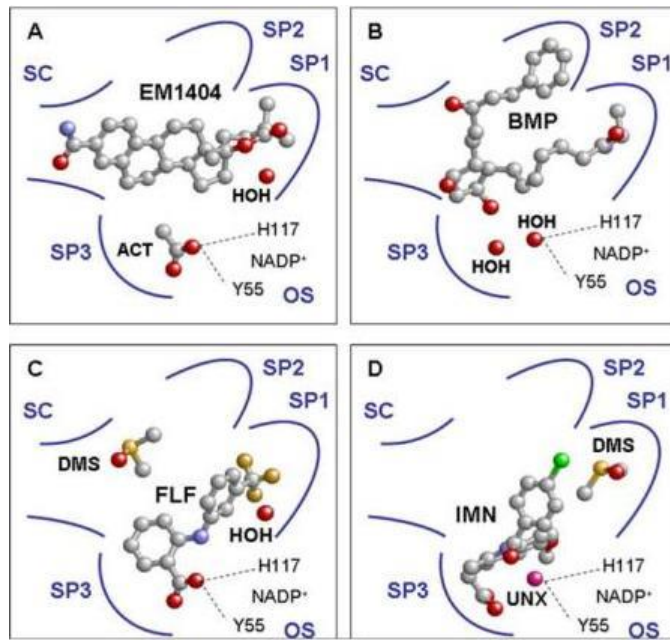
PDB ID	Резолуција (Å)	Лиганд ID	Име лиганда
1RY0	1.69	PG2	prostaglandin d2
1RY8	1.69	RUT, NADPH	rutin
1S1P	1.2	MPD	(4s)-2-methyl-2,4-pentanediol
1S1R	2	MPD	(4s)-2-methyl-2,4-pentanediol
1S2A	1.7	IMN	indomethacin
1S2C	1.8	FLF	2-[[3-(trifluoromethyl)phenyl]amino] benzoic acid
1XF0	2	ASD	4-androstene-3-17-dione
1ZQ5	1.3	E04	3-carboxamido-1,3,5(10)-estratrien-17(r)-spiro-2'(5',5'-dimethyl-'oxo)tetrahydropyran
2F38	2	15M, NAP	(5z)-7-[(1r,2r,3r,5s)-3,5-dihydroxy-2-[(1e,3s)-3-hydroxy-5-phenylpent-1-enyl]cyclopentyl]-n-ethylhept-5-enamide
2FGB	1.35	P6G, NAP	hexaethylene glycol
3R43	2	ID8, NAP	2-[(2,3-dimethylphenyl)amino]benzoic acid
3R6I	1.95	JMS, NAP	2-[(2,6-dichloro-3-methyl-phenyl)amino]benzoic acid
3R7M	2.1	SUZ, NAP	[(1z)-5-fluoro-2-methyl-1-[4-[methylsulfinyl]benzylidene]-1h-inden-3-yl]acetic acid
3R8G	1.8	IZP, NAP	(2r)-2-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanoic acid
3R8H	1.9	ZOM	[5-(4-chlorobenzoyl)-1,4-dimethyl-1h-pyrrol-2-yl]acetic acid
3R94	2.01	FLR	(2r)-2-(3-fluoro-4-phenyl-phenyl)propanoic acid
3UFY	1.9	NPX	(2r)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoic acid
3UG8	1.73	IMN	indomethacin
3UGR	1.65	IMN	indomethacin
3UWE	1.68	CSX	s-oxy cysteine
3UWE	1.68	VJJ	3-phenoxybenzoic acid
4DBS	1.85	0HV	3-[(4-nitronaphthalen-1-yl)amino]benzoic acid
4DBU	2.53	BT9	3-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]amino]benzoic acid
4DBW	1.8	511	[1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-1h-indol-3-yl]acetic acid
4DZ5	1.7	PG4	tetraethylene glycol
4FA3	2.2	OSL	(3r)-1-(naphthalen-2-ylsulfonyl)piperidine-3-carboxylic acid
4FAL	2	OT0	3-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1h)-ylsulfonyl)-n-methylbenzamide
4FAM	2	OSZ	3-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1h)-ylsulfonyl)benzoic acid
4H7C	1.97	10H	1-(4-[[[(2r)-2-methylpiperidin-1-yl]sulfonyl]phenyl]-1,3-dihydro-2h-pyrrol-2-one
4HMN	2.4	16J	[4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl](morpholin-4-yl)methanone
4WDT	1.5	WDT	2-nitro-5-(phenylsulfonyl)phenol
4WDU	1.7	WDU	4-chloro-n-(4-chlorobenzyl)-5-nitro-1h-pyrazole-3-carboxamide
4WDW	1.94	WDW	3,6-dihydropyridin-1(2h)-yl(5-methyl-1h-indol-2-yl)methanone
4WDX	1.64	WDX	[4-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl](5-methyl-1h-indol-2-yl)methanone
4WRH	1.6	YY1	5-methyl-4h-1,2,4-triazole-3-thiol
4XVD	2.81	WDV	4-nitro-2-({4-[3-(trifluoromethyl)phenyl]piperazin-1-yl}methyl)phenol
4XVE	1.55	WDS	3-pentyl-2-[(pyridin-2-ylmethyl)sulfanyl]-7-(pyrrolidin-1-ylcarbonyl)quinazolin-4(3h)-one

Наставак Табеле 2

4YVV	2.3	GBM	5-chloro-n-(2-{4-[(cyclohexylcarbamoyl)sulfamoyl]phenyl}ethyl)-2-methoxybenzamide
4YVX	2.3	GMR	3-ethyl-4-methyl-n-[2-(4-[[cis-4-methylcyclohexyl]carbamoyl]sulfamoyl)phenyl]ethyl]-2-oxo-2,5-dihydro-1h-pyrrole-1-carboxamide
4ZFC	2	GCZ	n-[(3ar,6as)-hexahydrocyclopenta[c]pyrrol-2(1h)-ylcarbamoyl]-4-methylbenzenesulfonamide
5HNT	2	QAP	2-phenylethyl (2e)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoate
5HNU	2	65D	octyl 3,4,5-trihydroxybenzoate
5JM5	1.99	6LG	(1r)-1-{3-[3-(dimethylcarbamoyl)phenoxy]-4-nitrophenyl}ethyl bis[(aziridin-1-yl)]phosphinate
		6NY	3-{2-(hydroxyamino)-5-[(1s)-1-hydroxyethyl]phenoxy}-n,n-dimethylbenzamide
5JM5	1.99	6LG	(1r)-1-{3-[3-(dimethylcarbamoyl)phenoxy]-4-nitrophenyl}ethyl bis[(aziridin-1-yl)]phosphinate
6F2U	1.88	CJ2	3-[(4-methoxyphenyl)methyl]-5-oxidanyl-~{n}-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-1,2,3-triazole-4-carboxamide
6F78	1.3	CVN	4-[[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]amino]-1,2-benzoxazol-3-one

5.3.1. Карактеристике AKR1C3 везујућег места за супстрат

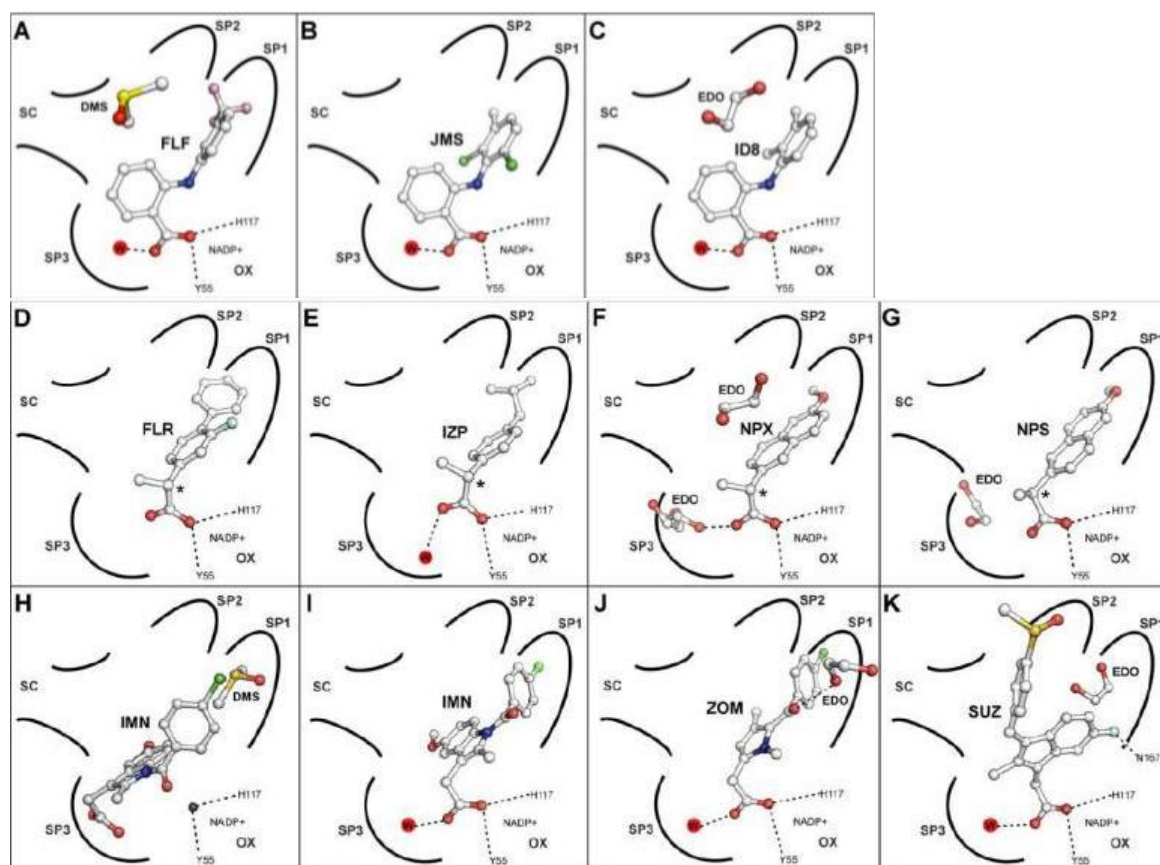
Основне структурне карактеристике активног места су већ описане у оквиру поглавља „Карактеристике везујућег места“, поглавља „Хумани протеини подфамилије 1C алдо-кето редуктаза (AKR1C3)“. Укратко, велико везујуће место може да се подели на неколико региона: стероидни канал (SC), оксианјон место (OS) и три подцепа (SP1, SP2, SP3) (Сл. 6). Оксианјон место обухвата активно место и самим тим представља каталичко место у ком се дешава редукција алдехида и кетона. Стероидни канал је канал кроз који лиганд улази у активно место (Burns et al., 2011; Flanagan et al., 2012). Све структуре имају у себи никотинамидни кофактор, све имају NADP, док PDB 1RY8 има NADPH као кофактор у својој структури. Истраживањима Бирнса и сарадника (Burns et al., 2011), са до тада установљеним кристалним структурама, анализирана је окупираност различитих региона везујућег места (Сл. 24).



Слика 24. Окупираност лиганд везујућег места у оквиру AKR1C3 протеина са инхибиторима EM1404, биматопрост, флуфенамском киселином и индометацином (A-D). SC=стероидни канал; OS=оксианјон место; АСТ=ацетатни јон; HOH=вода; BMP=биматопрост; FLF=флуфенамска киселина; DMSO=диетилсулфоксид; IMN=индометацин; UNX=непознати атом или јон; SP1-3= подцепови 1–3. Лиганди су представљени у виду лоптица и штапића са следећим значењем боја за атоме: С-сиво, О-црвено, N-плаво, F-наранџасто, S-жуто, Cl-зелено, непознато-розе (Burns et al., 2011).

На основу слике 24/A, види се да лиганд EM1404 обухвата SP1 и SC (PDB ID: 1ZQ5), у оквиру B дела слике, види се да је биматопрост такође везан у SP1 док му је други крај у оквиру SP2 (PDB ID: 2F38). На делу слике C, део тог инхибитора је везан у SP1, али је део и усидрен у OS (PDB ID: 1S2C), а на делу D, делови инхибитора се налазе и у SP1 и у SP3 подцепу, док се део молекула позиционирао преко непознатог атома као OS-у (PDB ID: 1S2A) (Burns et al., 2011). Положај и других лиганата може да се види на Слици 25.

Лиганди (без кофактора и малих помоћних молекула) до сада објављених структура веома варирају у величини то у опсегу од 115 до 610 g/mol (податак са PDB сајта, јун 2018). Толика варијабилност у лигандима и у структури и у величини заправо указује на флексибилност везујућег места ензима, док су кључне резидеуе за примање различитих лиганата триптофан 227, фенилаланин 306 и 311. Ове резидеуе могу да заузму различите конформације које резултују „индукованим уклапањем“ (енгл. induced fitting) за различите лиганде. Као закључак наведеног истраживања се навело да доступне кристалне структуре и молекуларна усидравања инхибитора су највише коришћене за објашњење везивања молекула који се већ показао као добар инхибитор. Таква истраживања су указала да је истраживање везивања лиганда у везно место AKR1C3 врло велики изазов због величине самог везног места и постојања многих места који се „индуковано уклапају“, па је тешко тврдити да ће се било који инхибитор везати као у предвиђеном моделу. Али напредак у таквом приступу свакако постоји (Burns et al., 2011).



Слика 25. Окупираност лиганд везујућег места у оквиру АКR1C3 протеина са NSAID инхибиторима. А) флуфенаминска киселина – FLF, В) Меклофенаминска киселина – JMS, С) мефенаминска киселина - ID8, D) (R)-флурипрофен – FLR, Е) (R)-ибупрофен – IZP, F) (R)-напроксен – NPX, G) (S)-напроксен – NPS, H) Индометацин рН 6.0 – IMN, I) Индометацин рН 7.5, J) Зомепирак – ZOM, K) Сулиндак – SUZ. SC=стероидни канал; OS=оксианјон место; АСТ=ацетатни јон; HOH=вода; BMP=биматопрост; FLF=флуфенамска киселина; DMSO=диетилсулфоксид; IMN=индометацин; UNX=непознати атом или јон; SP1-3= подцепови 1–3. Лиганди су представљени у виду лоптица и штапића са следећим значењем боја за атоме: С-сиво, О-црвено, N-плаво, F-наранџасто, S-жуто, Cl-зелено, непознато-розе (Flanagan et al., 2012).

6. ТЕХНИКЕ КОРИШЋЕНЕ У ИСТРАЖИВАЊУ

Како би се што боље разумели биолошки процеси, у науци је био неопходан прелаз на молекуларни ниво истраживања. У оквиру тог нивоа посебно место заузима структурна биологија протеина. Структурна биологија има за циљ не само да истражује структуру већ и да све то објасни и тумачи у ширем биолошком и функционалном контексту. Таква истраживања често захтевају рад на изолованом протеину, што најчешће значи рад са рекомбинантном хетероложном експресијом, који обухвата цео процес од трансформације организма са рекомбинантном ДНК, преко експресије и изоловања чистог протеина, до оптимизације активности протеина. Појам хетерологне експресије указује на то да се експресија гена дешава у организму који по природи нема у себи овај ген (интернет страна: “Heterologous expression - an overview | ScienceDirect Topics”). У оквиру структурне биологије посебно место заузимају методе помоћу којих се директо ради анализа структуре, што је у случају ове дисертације кристализација протеина.

Поред наведених *in vitro* метода, велики значај имају и *in silico* методе, како за предвиђање тако и за разне врсте изналажења (*енгл.* screening), што је у овој дисертацији било коришћено за упоредне анализе структура и моделовање, затим анализе молекуларног усидравања (*енгл.* docking) и изналажења потенцијалних инхибитора.

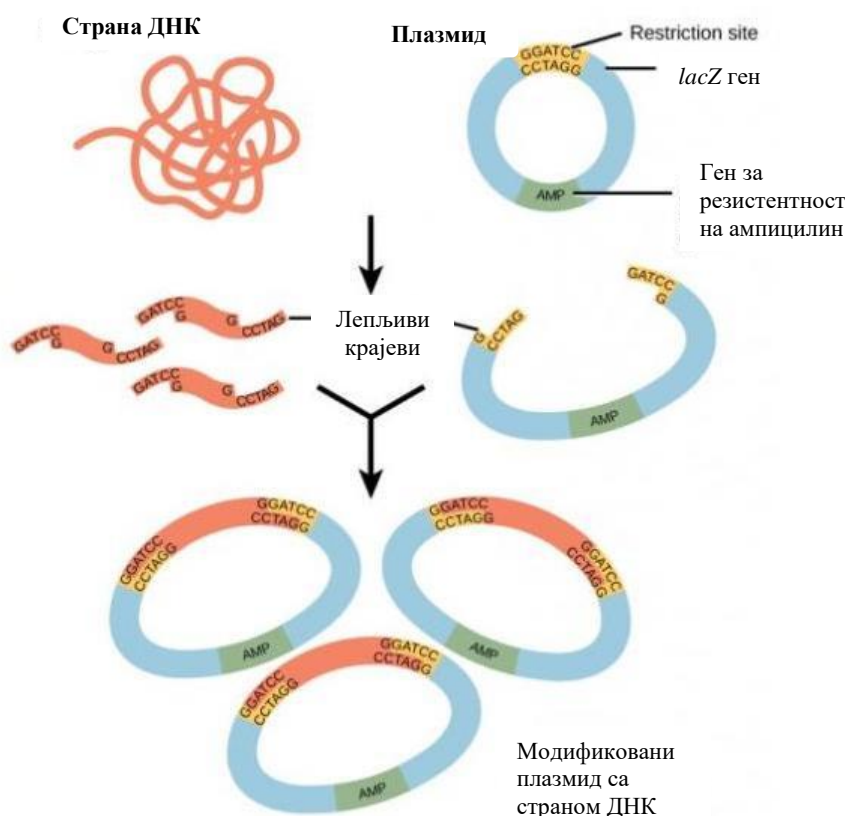
6.1. Рекомбинантна експресија протеина

Продукција рекомбинантних протеина у микробним системима је представила револуцију у биохемији и молекуларној биологији. Пре ове револуције добијање и пречишћавање жељеног протеина је захтевало рад са килограмима животињског и биљног ткива или великим запреминама биолошких течности да би се на крају добиле мале количине жељеног протеина. Данас помоћу рекомбинанте технологије овако обимни експерименти полако прелазе у прошлост (Rosano & Ceccarelli, 2014).

6.1.1. Рекомбинантна технологија

Рекомбинантна технологија или рекомбинантна технологија ДНК молекула, представља технику уз помоћ које се добија рекомбинантни ген. Рекомбинантни ген, представља рекомбинантни ДНК молекул, који је настао уз помоћ лабораторијских метода (као што је молекуларно клонирање, Сл. 26), да би се спојио генетички материјал из различитих извора, стварајући на тај начин секвенцу која као таква не

постоји у геному. Протеини који настају експресијом рекомбинантног гена се називају рекомбинантни (хетерологни) протеини (Glick, Pasternak, & Patten, 2010). Теоретски гледано, протокол за добијање рекомбинантног протеина је врло једноставан и логичан. Ген од интереса се клонира у експресиони вектор, потом трансформише у одабраног домаћина, индукује и затим је протеин спреман за пречишћавање и карактеризацију. У пракси, наравно, велики број ствари може да крене наопако. Лоше умножавање (раст) домаћина, формирање инклузионих тела, неактивност протеина, или чак и недобијање протеина уопште, све ово представља само неке од проблема који могу да се појаве у раду са рекомбинантним протеинима (Rosano & Ceccarelli, 2014).



Слика 26. Поједностављени кораци у молекуларном клонирању. Адаптирано из (Molnar & Gair, n.d.).

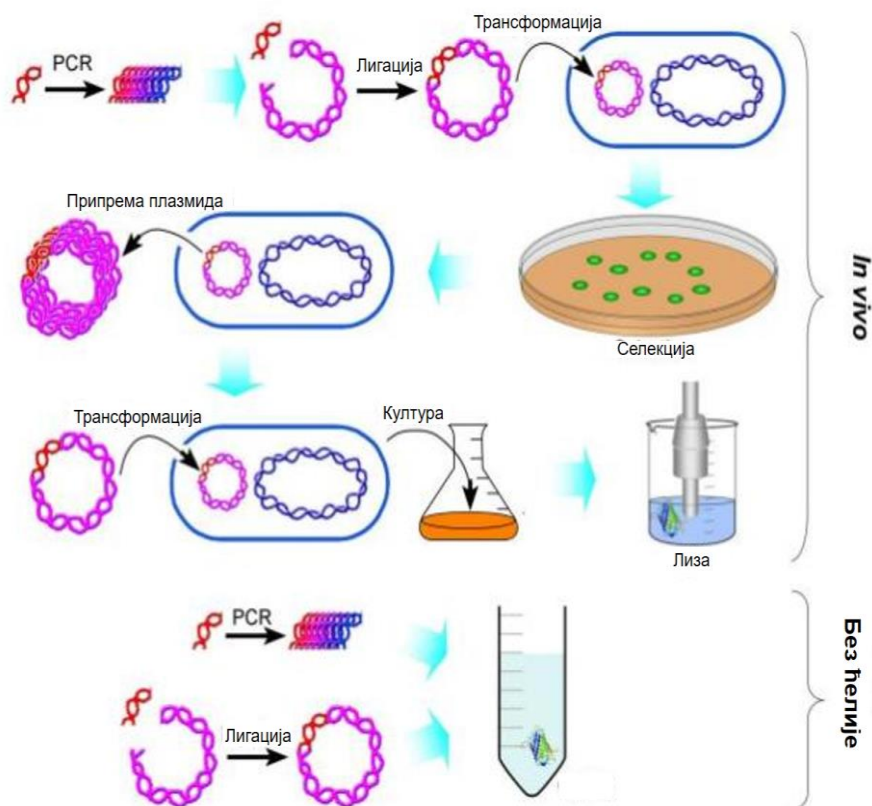
6.1.2. Системи за продукцију рекомбинантних протеина

Продукција протеина представља биотехнолошки процес стварања специфичног протеина. Најчешће се постиже манипулисањем са експресијом гена у организму који може да експресује у великим количинама рекомбинантни ген. Системи за продукцију протеина се користе у бројним лабораторијама. Посебан значај имају у молекуларно-биолошким истраживањима у којима се користе бројни протеини од којих је већина

настала овом техником, посебно значајни су ДНК полимеразе за PCR, реверзна транскриптаза за РНК анализе, рестрикционе ендонуклеазе за клонирање, а посебан зачај има производња протеина – биолошко-медицинских мета на којима се затим изналазе лекови (*енгл.* screened in drug discovery). Примена експресионих система је и у индустријској ферментацији, посебно у биофармацији, а пример је производња хуманог инсулина (Vaneux, 2004; интернет страна: Wikipedia "Protein production"). Системи за продукцију протеина се могу поделити на ћелијске и нећелијске системе, а у оквиру ћелијских система је подела на бактеријски и еукариотски систем.

Нећелијски системи

Продукција протеина ван ћелије се изводи *in vitro*, употребом пречишћене РНК полимеразе, рибозома, транспортне РНК и рибонуклеотида. Ови реагенси могу бити продуковани екстракцијом из ћелије или из експресионих система који је заснован на ћелији. Међутим, због ниског нивоа експресије и високе цене безћелијских система ипак се више користе системи засновани на ћелији (Сл. 27) (Rosenblum & Cooperman, 2013).



Слика 27. Прекомерна експресија протеина употребом стандардне *in vivo* технике у односу на протеинску синтезу без ћелија. Иако обе методе завршавају са ћелијским лизатом који садржи прекомерно експресовани протеин, метода *in vivo* захтева више-степену процедуру док систем без ћелија постиже резултат у једном кораку (Rosenblum & Cooperman, 2013).

Ћелијски системи

Ћелијски експресиони систем је најстарији и најшире употребљаван. Састоји се од експресионог вектора, клонираног ДНК молекула унутар вектора и организма домаћина који обезбеђује страном гену да функционише унутар ћелије, односно да продукује протеин у великим количинама. Дакле, експресиони систем је дефинисан у зависности од врсте домаћина, извора ДНК или/и начина испоручивања генетског материјала који се користи. Најчешћи домаћини су бактерије, квасци или еукариотске ћелијске линије, стандардни извори ДНК и механизми достављања су вируси, плазмиди, вештачки хромозоми и бактериофаги. Сви системи имају и предности и мане, тако да у зависности од циља истраживања бира се врста система за употребу.

Домаћини

Прокариотски - Бактеријски системи

Бактерије су прокариотски организми и као такви поседује одређене карактеристике које треба узети у обзир када се разматрају као организам домаћин. Пре свега као прокариоти нису опремљени са ензимском машинеријом која је неопходна за пост-транслационе модификације или молекуларно савијање протеина. Дакле, експресовани вишедоменски еукариотски протеини у бактеријама најчешће нису функционални. Поред тога, многи протеини постану нерастворљиви и формирају инклузиона тела из којих је тешко повратити протеине у растворљиво стање без разних денатурација и покушаја поновног савијања (*енгл. refolding*). У оквиру бактеријских система најчешће су у употреби *Escherichia coli*, *Corynebacterium* и *Pseudomonas fluorescens*.

E. coli је један од најчешће коришћених експресионих домаћина. ДНК се уноси у бактерију у виду плаزمида као експресионог вектора. Технике за прекомерну експресију у *E. coli* су добро развијене и раде по систему или повећања броја копија гена или повећања јачине промоторског региона који покреће транскрипцију. Предности рада са *E. coli* су следеће: брзорастућа кинетика, односно врло брзо умножавање (око 30 минута за једно дуплирање), лако се долази до веома густих ћелијских култура, имају експоненцијални раст, бактеријски хранљиви медијуми се могу направити од приступачних компоненти и трансформација са егзогеном ДНК је брза и једноставна. Поред наведених предности, треба посебно узети у обзир да постоје

бројни сојеви *E. coli* који још додатно могу допринети квалитету експресије рекомбинантног гена (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Corynebacterium представља непатогену врсту грам позитивних бактерија која се користи за комерцијалну продукцију разних аминокиселина, на пример врста *C. glutamicum* се широко користи за продукцију глутамата и лизина, које се користе и у хуманој и у животињској исхрани као и у фармацеутским производима (Brinkrolf, Schröder, Pühler, & Tauch, 2010). У овој врсти је рађена и експресија епидермалног фактора раста (Date, Itaya, Matsui, & Kikuchi, 2006).

Pseudomonas fluorescens је непатогена, грам негативна бактерија. Користи се за продукцију рекомбинантних протеина, затим за развој биотерапеутика и вакцина (Retallack, Jin, & Chew, 2012).

Еукариотски системи

Главни недостатак бактеријских система је чињеница да су прокариотски организми и као такви немају машинерију за пост-транслационе модификације у случајевима за експресију протеина који захтевају такву модификацију предлаже се да се ради у еукариотским системима. Постоји више врста система који ће у најосновнијим тачкама бити описани у даљем тексту.

Квасци представљају најчешће коришћени и најједноставнији еукариотски систем за експресију. Углавном расту брзо и то у врло приступачним медијумима. Ови системи обезбеђују средину у којој је могућа секреција и пост-транслациона модификација протеина, што је сличније условима код виших еукариота. Најчешће коришћени квасац је *Saccharomyces cerevisiae*, међутим у последње време је почела да се користи и врста *Pichia pastoris* (Daly & Hearn, 2005).

Филаментозне гљиве, посебно *Aspergillus* и *Trichoderma* су развијене у платформе за експресију на којима се налазе и продукују разни индустријски значајни ензими. Највећа предност ових гљива је што имају велику продукцију протеина који се секретују (Nevalainen & Peterson, 2014).

Ћелије заражене бакуловирусом су инсекатске (сојеви Sf9, Sf21, High Five) ћелије које омогућавају продукцију гликозилираних или мембранских протеина који не могу бити експресовани употребом квасца или прокариотских система (Приручник: *Instruction Manual Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Technique*).

Нелитичка експресија у инсекатским ћелијама представља алтернативни систем у односу на претходно споменути. Овај систем има већу продукцију протеина и бржу експресију рекомбинантних гена у односу на ћелије заражене бакуловиром (Olczak & Olczak, 2006).

Leishmania је протозоа, који се као експресиони систем одликује стабилном и дугом продукцијом протеина са виоким приносом. Програмовани протеини испољавају потпуну еукариотску пост-транслациону модификацију, укључујући гликозилацију и формирање дисулфидних мостова (Dortay & Mueller-Roeber, 2010).

Сисарски систем је најбољи систем за експресију ако је протеин од интереса сисарски. Најчешће коришћени сисарски експресиони системи су ћелије јајника кинеског хрчка (*енгл.* chinese hamster ovary – СНО) и бубрега хуманог ембриона (*енгл.* human embryonic kidney – НЕК) (Hayat Khan, 2013).

Клонирајући вектори

Клонирајући вектори представљају мали ДНК молекул, који је узет из вируса, плаزمиде или ћелије вишег организма, и који се као такав може стабилно одржавати у организму, а при том се у наведени молекул ДНК може уметнути страни ДНК фрагмент у сврху клонирања (“Genome Dictionary - Genetics Glossary - Definitions,” n.d.).

Основне карактеристике

Вектори који се користе у молекуларној биологији имају неколико карактеристика неопходних за функционисање које могу да се разликују у зависности коју научну примену имају у експериментима (пример вектора Сл. 29).

Клонирајуће место. Сви клонирајући вектори имају део који омогућава уметање или уклањање гена из вектора. То може да буде у виду вишеструког клонирајућег места (*енгл.* multiple cloning site – MCS) или полилинкера, који садржи пуно јединствених рестрикционих места. Рестрикциона места унутар MCS-а се прво пресецају рестрикционим ензимима, затим се циљни ген дигестује са истим ензимом/има и инсертује (умеће) унутар пресеченог вектора.

Маркери за селекцију омогућавају селекцију позитивно трансформисаних ћелија. Као маркер се често користи антибиотска отпорност, дакле унутар вектора се налази и ген за отпорност на одређени антибиотик, који омогућава успешно

трансформисаној ћелији да опстане у медијуму који поседује одређени антибиотик. Неки вектори могу да поседују и два маркера за селекцију.

Репортер гени се налазе у неким клонирајућим векторима и служе да би олакшали изналажење успешних клонова употребом особине ових гена који омогућавају успешном клону да се лако идентификује. Најпознатији репортер ген је *lacZ α* фрагмент.

Елементи за експресију. Клонирајући вектори морају да поседују и одговарајуће елементе за експресију клонираног циљног гена, као што су промотор и везујуће место за рибозом. Уколико је ген убачен тако да буде под контролом промотора, онда је његова експресија врло добро контролисана и индуцибилна, дакле протеин се у том случају продукује само онда када је потребан. Најпознатији промотори су T7 и *lac* промотор (Clark & Pazdernik, 2013).

Врсте клонирајућих вектора

Постоји велики број врста вектора, а који вектор одабрати зависи од бројних фактора, као што су величина инсерта, број копија и метода клонирања.

Плазмиди су бактеријски самостално реплицирајући циркуларни дволанчани ванхромозомални ДНК молекули. Они су најстандарднији и најчешће употребљавани вектори. У природи плазмиди најчешће поседују гене који омогућавају бактеријама отпорност на антибиотике. За потребе молекуларног клонирања плазмиди су модификовани и то тако да поседују одређене гене и карактеристике. Једна од карактеристика клонирајућих плазида је да могу да приме нови ген и до величине од 15 kb. Често коришћене врсте су pET pGEX, NovaBlue.

Бактериофаги који се најчешће употребљавају за клонирање су λ и M13 фаг. Максимална величина инсерта у овом случају је 53 kb, из тог разлога су сви неесенцијални гени из ДНК фага обрисани.

Козмиди су уствари плазмиди који у себи садрже део ДНК λ бактериофага који омогућава паковање ДНК у λ партикуле (Casali & Preston, 2003).

Вештачки бактеријски хромозом (енгл. bacterial artificial chromosome, BAC) могу да приме инсерт до 350 kb величине. BAC се одржавају само у по једној копији у ћелији *E. coli* (Casali & Preston, 2003).

Вештачки квашчев хромозом (енгл. yeast artificial chromosome, YAC) примају инсерт и до 3000 kb величине.

Вештачки хумани хромозом (енгл. human artificial chromosome, HAC) може да носи веома велики ДНК фрагмент (не постоји горња граница по питању величине), дакле нема проблем капацитета као други вектори, поред тога употребом овог вектора заобиђени су проблеми мутагенезе која настаје приликом виралне инсерција (Kim et al., 2011; Kouprina, Earnshaw, Masumoto, & Larionov, 2013).

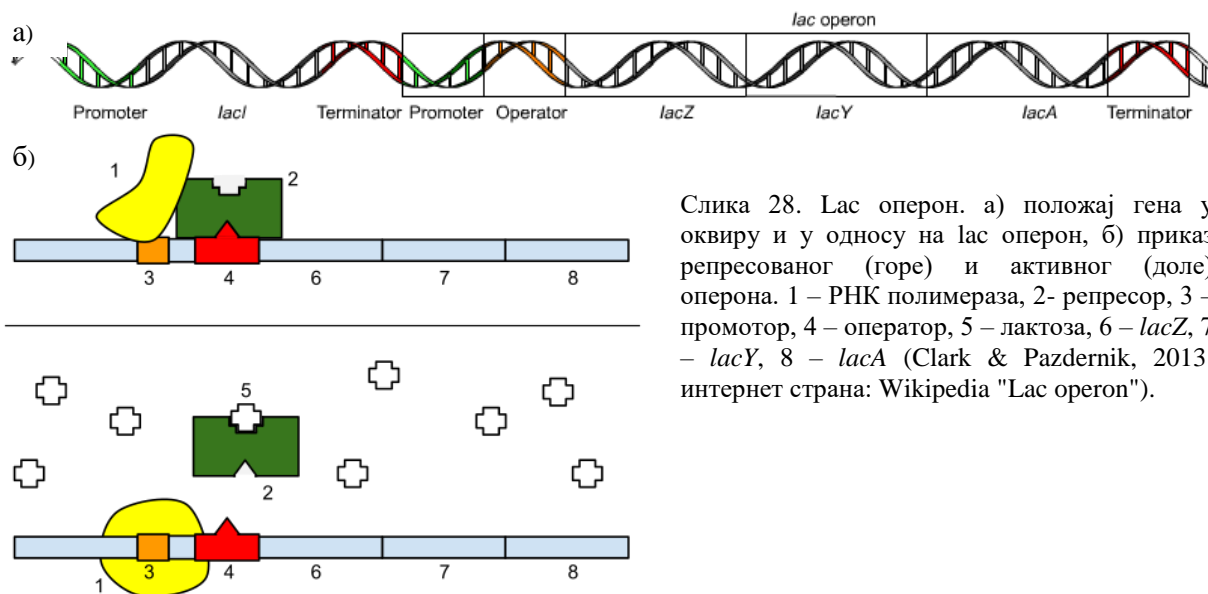
6.1.3. Систем за рекомбинантну експресију коришћен у овој тези

Да би експресија циљног гена и продукција протеина била успешна неопходно је претходно проверити карактеристике вектора и домаћина у који желимо вектор да убацимо. Нису сви вектори и гени на њима компатибилни са свим домаћинима, већ су направљене такве карактеристике да само ако је све добро уклопљено долази до експресије жељеног гена.

Истраживање у оквиру ове дисертације је рађено на прокариотском систему за експресију протеина и то са *E. coli*, односно са два различита соја *E. coli*, DH5 α и BL21(DE3)RIPL. Коришћени плазмиди су pGEX и pET28a(+).

Да би се разумео цео систем неопходно је објаснити одређене чињенице, поједине елементе и концепт функционисања рекомбинантног система.

Оперон, *Lac* оперон. Оперон представља функционалну јединицу геномске ДНК која садржи кластер гена под контролом једног промотора и најчешће је присутна код прокариота. Гени се преписују (транскрибују) заједно у једну информациону РНК и могу да се заједно преводе (транслирају) у цитоплазми или подлежу транс-сплајсингу да би направили моноцистронске информационе РНК које се преводе појединачно. Један од најчешће спомињаних оперона је *lac* оперон (лактозни оперон, Сл. 28) који је неопходан за транспорт и метаболизам лактозе у *E. coli* и у многим другим ентеричним бактеријама. Глукоза јесте преферирани извор угљеника код већине бактерија, међутим *lac* оперон омогућава ефективну дигестију лактозе када глукоза није доступна. Када је лактоза присутна као главни шећер, три гена, *lacZ*, *lacY* и *lacA*, са *lac* оперона се експресују и преводе у три протеина: β -галактозидазу, која пресеца дисахарид лактозу у моносахариде глукозу и галактозу, β -галактозид пермеазу, која омогућава транспорт лактозе у ћелију и β -галактозид трансацетилазу. У одсуству лактозе, *lac* репресор, *lacI*, зауставља продукцију ензима кодираних *lac* опероном, док везивање лактозе за репресор омогућава активацију оперона.



Слика 28. Лас оперон. а) положај гена у оквиру и у односу на *lac* оперон, б) приказ репресованог (горе) и активног (доле) оперона. 1 – РНК полимераза, 2- репресор, 3 – промотор, 4 – оператор, 5 – лактоза, 6 – *lacZ*, 7 – *lacY*, 8 – *lacA* (Clark & Pazdernik, 2013; интернет страна: Wikipedia "Lac operon").

Постојање оваковог система је омогућило научницима да модификују и истражују бројне употребе оперона. Као део таквог истраживања бројни деривати лактозе и њени аналози су описани који могу да се користе у раду са *lac* опероном. Један од најпознатијих и у молекуларној биологији најкориснијих аналога и индукера *lac* оперона је изопропил- β -Д-тиогалактопиранозид (енгл. isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, **IPTG**). IPTG се везује за репресор и инактивира га, али он сам није супстрат за β -галактозидазу. Једна од предности употребе IPTG-а у експериментима је то што му концентрација све време остаје константна и самим тим је и експресија гена који су под контролом *lac* оперона константна, а то све је могуће јер IPTG не може да се метаболише од стране *E. coli* (Hansen, Knudsen, & Sørensen, 1998).

Гени *lac* оперона и њихови деривати могу да се користе као репортер гени у бројним селекционим техникама заснованим на раду са бактеријама као и на контроли експресије одређених гена који се генетичким инжењерингом клонирају унутар оперона.

Бактериофаги. Бактериофаги представљају вирусе који инфицирају бактерије. Бактериофаг Т7 (Т7 фаг) је вирус који напада већину сојева *E. coli*. Секвенца промотора Т7 се широко употребљава у молекуларној биологији због свог изразито високог афинитета за Т7 РНК полимеразу и самим тим високим новоом експресије.

Профаг је геном бактериофага који је убачен и уклопљен у циркуларни бактеријски ДНК хромозом, а може да постоји као и ванхромозомски плазмид.

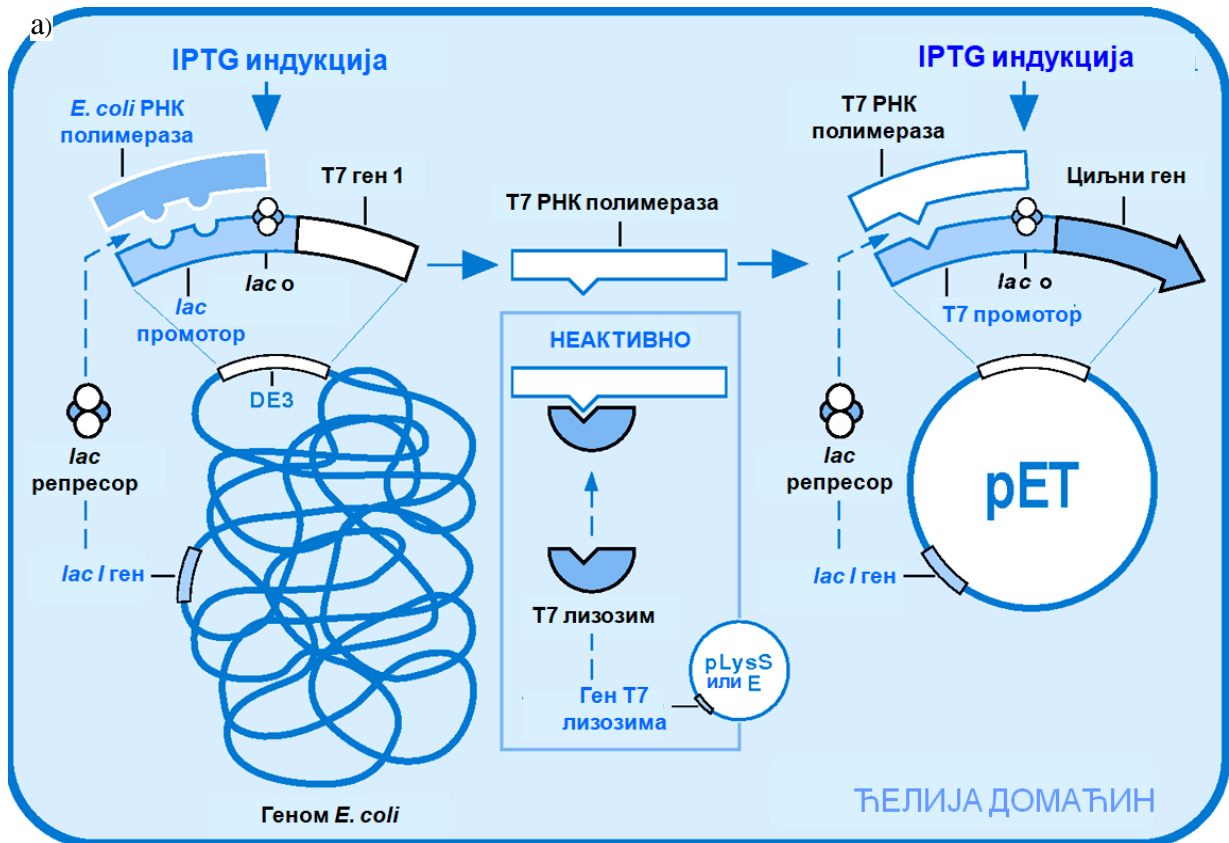
Лизоген је бактеријска ћелија у којој постоји ДНК фага али у успаваном стању.

Ламбда DE3 (λ DE3) представља фагни конструкт који експресује T7 РНК полимеразу под контролом *lacUV5* промотора. Конструкт поред гена за полимеразу и *lacUV5* промотора садржи и *lacI* ген. Овај фрагмент је убачен унутар *int* гена ([UniProt: P03700](#)), који експресује интегразу која је у вирусу кључна за убацивање фага у домаћина као и у комбинацији са ексцизнозом за сечење профага из генома домаћина. Како је конструкт убачен усред гена за интегразу, на тај начин је осигурано да се DE3 убацује или исеца из хромозомског генома без помоћног фага (Приручник: “pET System Manual”).

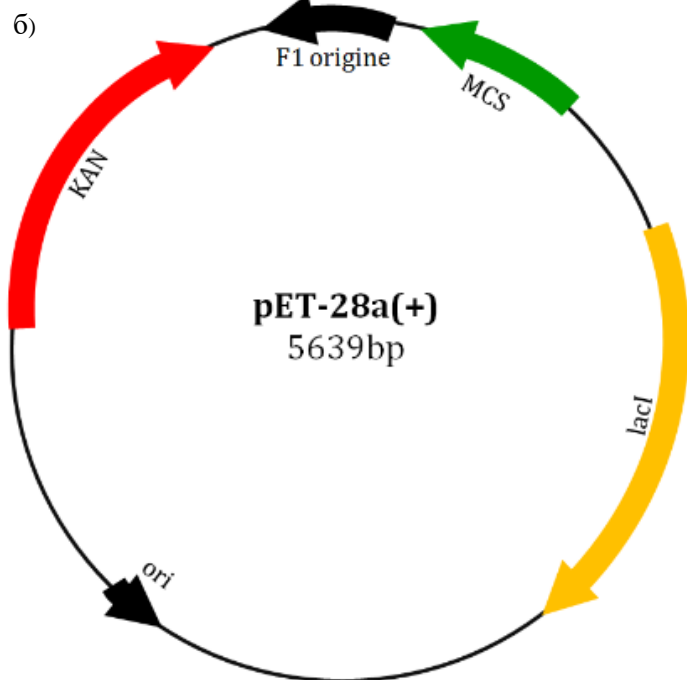
Промотори. У оквиру бактеријског рекомбинантног система присутна су два специјална промотора, *lacUV5* и T7. Да би се постигла експресија гена у оквиру оперона и у присуству глукозе у геном је убачен мутирани *lacUV5* промотор. Овај промотор је присутан у хромозомском ДНК молекулу.

T7 промоторски систем који је присутан у pET векторима је врло популаран у експресији рекомбинантних протеина. У овом систему је жељени ген клониран иза промотора који препознаје фагна T7 РНК полимеразу. Ова високо активна полимеразу је у систему обезбеђена преко неког другог плаزمида или најчешће се налази унутар бактеријског генома у профагу (λ DE3) кодирајући T7 РНК полимеразу под транскрипцијом контролом *lacUV5* промотора. T7 РНК полимеразу је врло селективна и активна у тој мери да се скоро сви ћелијски ресурси користе за експресију циљног гена, који због тога некада може да обухвати и више од 50% од целокупне продукције протеина у ћелији. Дакле, систем може да буде индукован лактозом или са IPTG. Још једна велика предност овог система је у томе што остаје утишан све време трајања неиндукованог стања (Приручник: “pET System Manual”; Rosano & Seccarelli, 2014).

Систем pET (пример Сл. 29) је један од најбољих система развијених за клонирање и експресију рекомбинантног протеина у *E. coli*. Конструисани су од стране Студиера и сарадника 1986. Гени који су клонирани унутар pET плазмида су под контролом транскрипционих и трнаслационих сигнала T7 бактериофага. Сама експресија се индукује уколико је присутна T7 РНК полимеразу унутар ћелије домаћина.



Слика 29. рЕТ вектор, систем функционисања и пример вектора са основним елементима. а) Контролни елементи рЕТ система; (Mierendorf, Yeager, & Novy, 1994); б) Пример рЕТ вектора са основним елементима за експресију: MSC – вишеструко клонирајуће место, KAN – ген за резистентност на канамицин, *lacI* – ген *lac* репресора, F1 origine – зачетак репликације F1.



Постоје две опште категорије рЕТ вектора које су доступне, а то су транскрипциони, који су дизајнирани за експресију тако да жељени ген већ у себи има своје везујуће место прокариотског рибозома и АТГ старт кодон и транслациони који поседују високо ефективна рибозомална везујућа места од протеина капсида фага Т7. Транслациони вектори се разликују од транскрипционих по додатку словног суфикса одмах иза имена, нпр. рЕТ-21а(+), који указује на оквир читања у односу на препознавајућу секвенцу за *Bam*H I клонирајуће место, GGATCC. Дакле, они вектори који имају слово „а“ експресују од GGA триплета, затим слово „b“ указује на експресију од GAT, „c“ од АТC, „d“ је исто као и „c“ али садржи узводно *Nco* I клонирајуће место уместо *Nde* I. Знак + који често прати име вектора указује да вектор садржи f1 зачетак (origin) репликације који омогућава продукцију једноланчане плазмидне ДНК за мутагенезу и примену у секвенцирању.

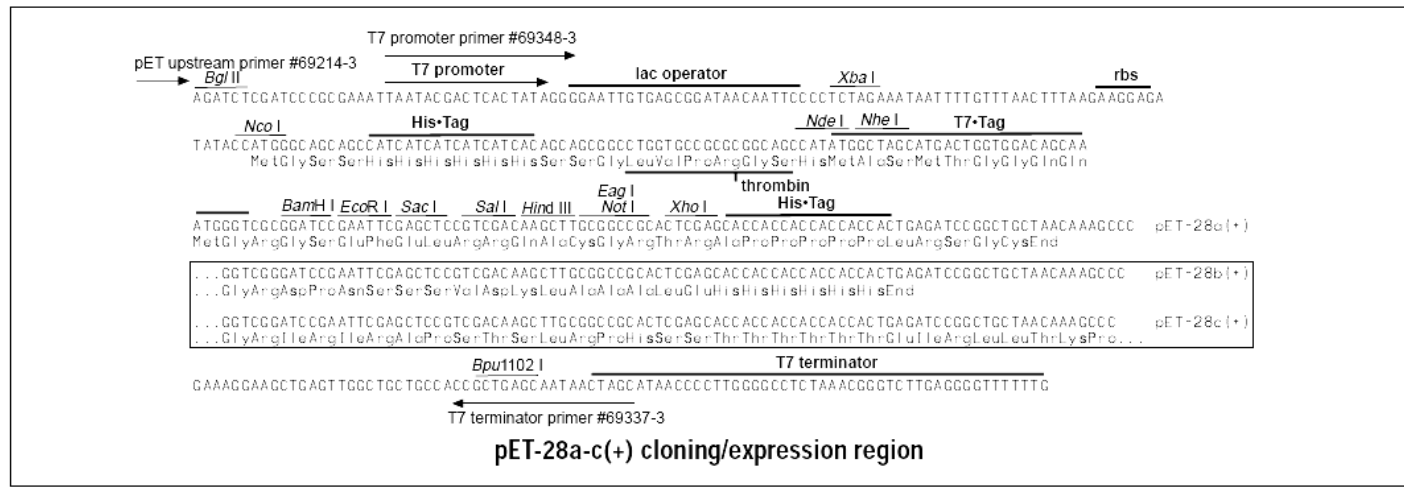
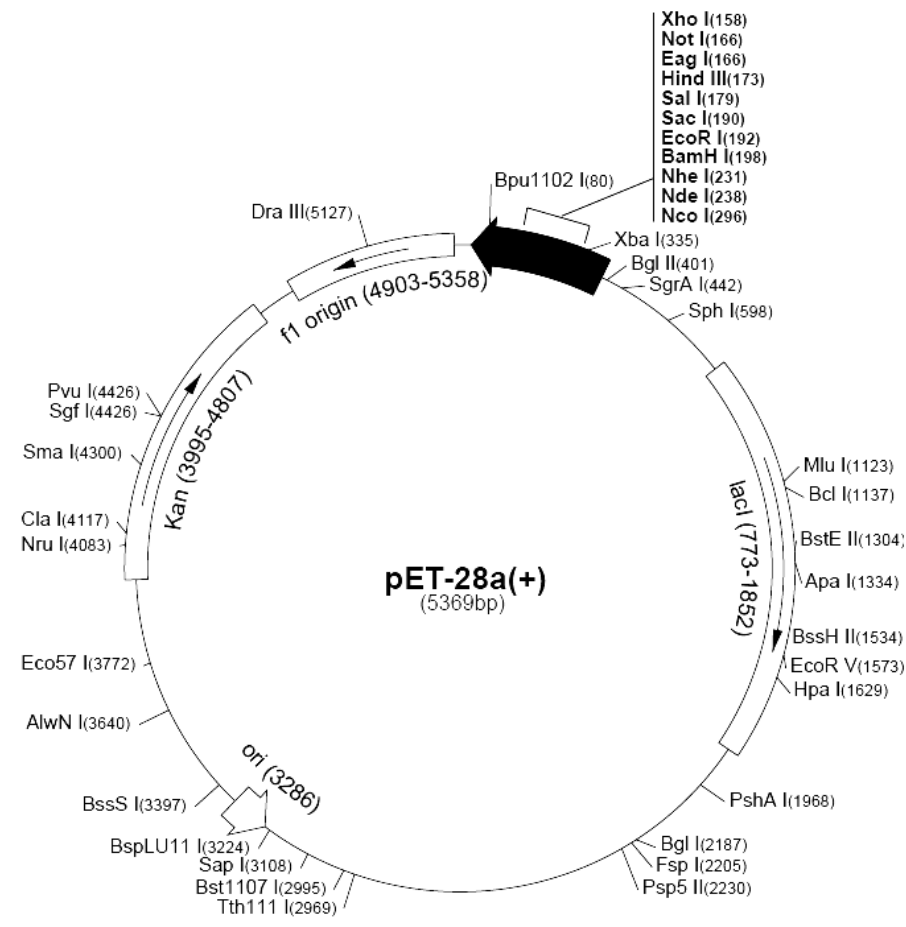
Бројни рЕТ вектори садрже различите секвенце придодате клонирајућем месту које кодирају бројне пептиде под именом „обележивачи“ (*енгл.* tags), који обезбеђују бројне функције када су фузионисане са геном од интереса (циљним протеином). Неки од обележивача олакшавају детекцију и пречишћавање протеина, неки растворљивост и стабилност. Врста обележивача као и место зависе од врсте и идеје експеримента (Приручник: “рЕТ System Manual”).

Плазмид **рЕТ28а(+)** поседује и N- и C-терминални хистидински обележивач, канамицинску отпорност, T7lac, f1 место зачетка репликације и сигналну секвенцу за тромбин (Сл. 30).

pET-28a(+) sequence landmarks

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites	
(<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lac</i> I coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.



Слика 30. Пример приказа информација за pET-28a(+) плазмид са свим пропратним подацима.

DH5 α ћелије представљају сој *E. coli* продуковане тако да се максимизира ефикасност трансформације. Своје име су добиле по америчком биологу Даглас Ханahanу (*енгл.* Douglas Hanahan). Ћелије су дефинисане са три мутације *recA1*, *endA1*, које потпомажу инсерцију плаزمида и са *lacZM15* која омогућава плаво-бели тест (*енгл.* blue-white screening) (интернет страна: “Strain - DH5 α ”). Мутација *recA1* је

мутација једног места која замењује глицин 160 на *gcsA* полипептиду са аспартатском киселином да би се онемогућила активност рекомбиназе и хомологне рекомбинанције. Мутација *endA1* инактивира унутарћелијску ендонуклеазу да би онемогућила деградацију будућег убаченог плаزمида.

У рЕТ систему се претходно наведене ћелије сматрају једним од најпогоднијих сојева домаћина за клонирање, док се за експресију и продукцију рекомбинатног протеина узима сој који садржи копију Т7 РНК полимеразе на хромозому у оквиру DE3 ламбда деривата, који како је наведено садрже ген за полимеразу и промотор *lacUV5* који контролише експресију полимеразе. Промотор се активира (индукује) уз додавање IPTG, затим се експресује полимеразе која се затим везује на Т7 промотор на плазмиду и тако активира експресија клонираног гена. Постоји више различитих сојева, а сој који се најчешће користи за експресију и који је у овом истраживању коришћен је **BL21(DE3)**. Као В сој *E. coli*, BL21 сој нема *lon* протеазу и нема *ompT* спољно-мембранску протеазу која може да деградира протеине током пречишћавања.

У оквиру ове тезе је коришћен и рGEX-2Т вектор са глутатион-S-трансферазом (енгл. glutathione-S-transferase, GST) као обележивачем и ампицилинском отпорношћу. Овакав обележивач је прилично велик, пожељно је његово одвајање са жељеног протеина и из тог разлога између обележивача и протеина се налази рестрикционо место за тромбин. ДНК делови бактериофага М13 су коришћен за конструкцију овог вектора (“pGEX-2T - Addgene Vector Database (Plasmids, Expression Vectors, etc)”).

6.2. Структурна биологија: *in silico* и *in vitro*

Структурна биологија је наука која се бави истраживањем како су биолошки молекули грађени, како задобијају своју структуру коју имају, како њихова структура и промене у њој доприносе њиховој функцији. Ова област има посебно велики значај у биологији јер макромолекули су носиоци већине ћелијских функција и једино њиховим променама у тродимензионалној структури омогућено је да се реализују те функције.

Биомолекули су веома мали да би могли да се виде у детаље чак и са најбољим микроскопом, тако да методе које се користе у структурној биологији често подразумевају како и само прављење и анализу модела на рачунару тако и бројне обимне лабораторијске експерименте. Употребом бројних експеримената који потпомажу визуелизацију на различите начине, омогућено је да се виде молекули у 3 димензије, како су организовани, како функционишу и како интерагују. Оваква врста

истраживања помаже да се разумеју како бројни различити молекули у свакој од наших ћелија раде заједно да учине организам функционалним.

Истраживањем структуре је такође могуће установити молекуле који имају погрешну структуру или облик и који као такви доводе до различитих болести. Због таквих резултата успостављене су и нове терапије за бројне болести као и истраживања и изналажења лекова на основу структурних карактеристика мете за тај лек. Лекови углавном раде тако што или блокирају или активирају активност неког специфичног протеина у телу. И баш употребом приступа који се зове „дизајн лекова заснован на структури“ (*енгл.* structure-based drug design), могуће је направити шаблоне протеина који се затим користе као калупи у стварању нових лекова. Истраживање се започиње са рачунарским моделом структуре протеина који је од интереса за истраживање. Један од најпознатијих примера направљеног лека заснованог на структури јесу неки од антиХИВ лекова, тробинских инхибитора, неуропептидних инхибитора итд. Познавајући структуру ензима, научници су установили врсту молекула која би могла да заустави даље функционисање ХИВ протеазе. Научници су при том користили рачунарске моделе за прецизно подешавање молекула који би могао да заустави производњу вируса. Ово истраживање је довело до производње лекова који се зову инхибитори протеаза (Schlick, 2010; “Structural Biology - National Institute of General Medical Sciences,” 2017).

У оквиру истраживања у области структурне биологије користи се неколико техника визуелизације да би се утврдила структура протеина и других комплексних молекула. Крио-електронском микроскопијом (*енгл.* cryo-EM) је могуће да се „виде“ индивидуални протеини као и веће структуре попут молекуларних комплекса, вируса, органела итд. Кристаграфија X зрацима и спектроскопија нукларном магнетном резонанцом (НМР) такође омогућавају да се протеин „види“. До данас овим методама и још неким другим је решена структура преко 137 000 (23.01.2018.) биолошких макромолекула и структура које су складиштене у оквиру Протеинске Базе Података (*енгл.* The Protein Data Bank - <https://www.rcsb.org/>) (“Structural Biology - National Institute of General Medical Sciences,” 2017).

6.3. *In silico*: молекуларно усидравање, изналажење и дизајнирање лекова на основу структуре

Појам „*in silico*“ представља израз који се употребљава да се укаже да се нешто „изводи на рачунару“ или путем „рачунарских симулација“. Због велике количине података које се сваки дан повећавају од стране био- наука, рачунарска биологија и биоинформатика су биле неопходне као нова гране науке које представљају интердисциплинарне научне области за организацију и обраду велике количине и такве врсте биолошких података.

За потребе истраживања обухваћених овом дисертацијом рачунарска биологија је имала значај у анализи молекуларног усидравања лиганда у протеин.

Методe молекуларног моделовања посебан значај имају у фармацеутским истраживањима где су део различитих програма открића лекова и истраживања биолошких и хемијских система. Спајање рачунарског и експерименталног приступа се показало као одлична стратегија за идентификацију и развој нових једињења. Данас, у дизајнирању лекова на основу структуре, широку примену имају методе молекуларног усидравања (*енгл.* molecular docking) које истражују конформацију и положај лиганда који лиганд задобије приликом везивања за везно место циљног макромолекула. Овај приступ процењује (слободну) енергију везивања лиганда и рецептора преко процењивања кључних феномена укључених у процес интермолекуларног препознавања (Ferreira, Dos Santos, Oliva, & Andricopulo, 2015).

6.3.1. Дизајнирање лекова на основу структуре

Разумевање принципа по ком мали молекули препознају и реагују са макромолекулом представља важан аспект у фармаколошким истраживањима. Дизајнирање лекова на основу структуре представља систематичну употребу структурних података (циљног макромолекула, рецептора) који се углавном добијају експериментално или кроз рачунарско (хомологно) моделовање. Идеја је да се дизајнира лиганд са специфичним електростатичким и стереохемијским карактеристикама да би се постигао високи афинитет за везивање за рецептор. Постојањем доступних тродимензионалних макромолекулских структура омогућено је да се у детаље истраже везна места у протеину, укључујући присуство шупљина, подцепова, електростатичких карактеристика. На основу наведених сазнања могуће је започети са развојем идеја о изгледу лиганда. Процес дизајнирања је цикличан и

најчешће се започиње од познате структуре рецептора и *in silico* методама, а једна од њих је и молекуларно усидравање, којим се идентификују потенцијални лиганди. Затим крећу процеси синтетисања нових или модификовање постојећих једињења да би се на крају спровеле евалуације биолошких карактеристика. Међутим, кроз моделовање је неопходно обратити пажњу на флексибилност циљног протеина која се дешава у реалном систему приликом везивања лиганда за/у протеин. За ту проблематику су врло корисне анализе кроз флексибилно усидравања и молекуларну динамику (Ferreira et al., 2015).

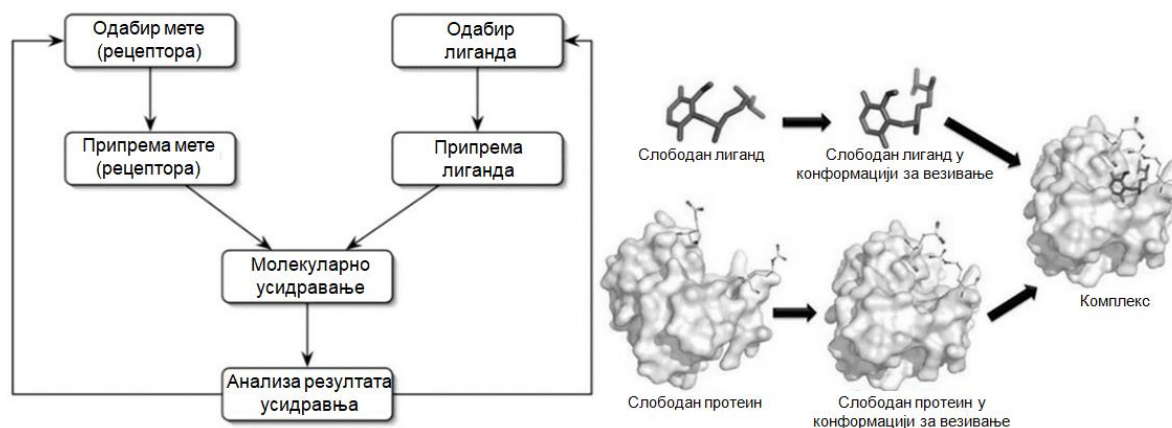
6.3.2. Молекуларно усидравање

Молекуларно усидравање због способности да са приличном тачношћу предвиди конформацију лиганда унутар везујућег места, представља једну од најчешће коришћених метода у дизајнирању лекова на основу структуре (*енгл.* structure based drug design) (Ferreira et al., 2015). Молекуларно усидравање може да се представи као проблем „кључ-брава“, у ком заправо желимо да пронађемо тачну релативну оријентацију „кључа“ која ће да отвори „браву“. У овом случају протеин представља браву, а лиганд „кључ“. Тако да се молекуларно усидравање може дефинисати и као оптимизациони проблем који би се описао најбољом оријентацијом лиганда у протеину од интереса. Међутим, како су и протеин и лиганд флексибилни и како се прилагођавају током везивања, сматра се да је боље поређење као „рукавица и рука“ него „кључ и брава“ (Jorgensen, 1991). Истраживање у оквиру молекуларног усидравања је фокусирано на рачунарске симулације које имају за циљ да оптимизују конформацију и за протеин и за лиганд као и за релативну међусобну оријентацију и то тако да се постигне што мања слободна енергија система.

Најбржи начин изналажења лекова представља виртуелно претраживање, које се карактерише употребом база података и у том смислу постоје два правца један је претраживање база података малих молекула на основу једне протеинске мете, док је други обрнут, дакле претраживање протеинских мета наспрам малог молекула познате структуре (Сл. 31).

Само тестирање интеракција рецептора и лиганда се најчешће не обавља на целом протеину (рецептору), већ се употребом података из литературе или различитим методама идентификације везујућег места, тестирање сузи на одређени део рецептора (Hetényi & Spoel, 2011). Моделовање интеракција два молекула је врло сложен и комплексан процес, пре свега јер су молекули динамичне структуре које као такве су

склоне формирању различитих типова веза, попут водничних, Van der Waals-ових, електростатичких, хидрофобних и „stacking” интеракција ароматичних прстенова. Процес усидравања заправо покушава да имитира систем како изгледа у природи, а то значи комплекс треба да представља термостабилно стање и то тако да конформација која се задобија приликом везивања треба да представља глобални минимум слободне енергије система (Totrov & Abagyan, 2001).



Слика 31. Шема и визуелни приказ типичног протокола за усидравање. Кључни кораци обухватају одабир структуре макромолекула и малих молекула, затим њихову припрему и на крају иде анализа резултата уз консултацију литературе (Kitanović, 2015).

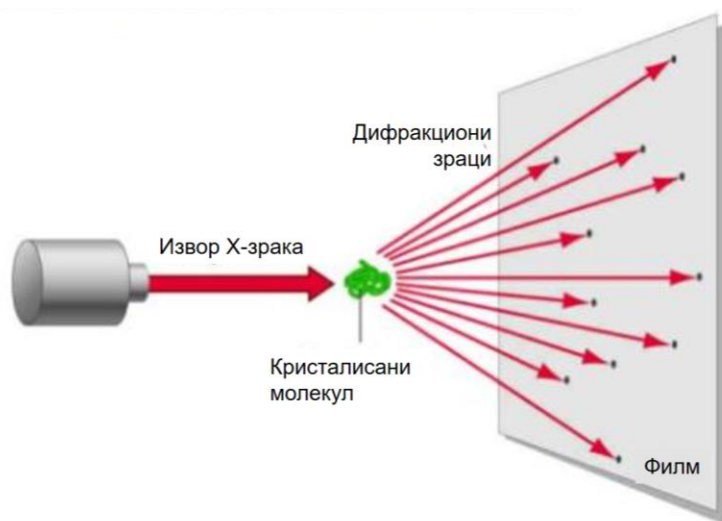
Анализа усидравања молекула у протеин, заправо обухвата анализу различитих оријентација и конформација лиганда у везном месту протеина као и мерење афинитета везивања сваке позе. Односно, програми који се користе за анализе се састоје од две главне компоненте а то су алгоритми претраге и функције за вредновање афинитета. Алгоритми претраге предвиђају геометрију потенцијалног комплекса, односно могућности ротације молекула у x , y и z осама, утицај средине и слично. Функције за вредновање афинитета представљају скуп математичких метода које на крају предвиђају јачину интеракције. Груба подела метода молекуларног усидравања би могла да се сведе на: усидравање ригидних конформација, усидравање флексибилних конформација и молекуларно усидравање применом симулација. Усидравање ригидних конформација представља прве алгоритме који су се користили и заснована је на најједноставнијем комплексу у ком се сви делови молекула посматрају као ригидне структуре. Друга метода је врло комплекса из разлога што је врло незгодно предвидети флексибилност целокупног макромолекула као што је протеин, тако да се данас најчешће користе методе у ком се лиганд третира као да је флексибилан, а протеин ригидан или одређене аминокиселине да су флексибилне.

Што се тиче алгоритма углавном се користе три алгоритма и то алгоритми комплементарности облика, систематичне претраге и сохастички.

6.4. Протеинска кристалографија: кристализација протеина, рендгенска анализа и решавање структуре

У свим техникама микроскопије количина детља или резолуција су лимитирани употребљаваном таласном дужином електро-магнетног зрачења. У оквиру светлосне микроскопије најкраћа таласна дужина која се користи је 300 nm и са њом је могуће видети појединачне ћелије и неке од органела унутар ћелије. Електронска микроскопија користи таласне дужине испод 10 nm и са њом је могуће видети у детаље ћелијску грађу и облик неких већих протеинских молекула. Међутим за потребе визуелизације протеина на атомском нивоу, неопходно је да се ради са електро-магнетним таласима таласне дужине око 0,1 nm, односно 1 Å, другим речима са X-зрацима. Међутим док је у свим облицима микроскопије могуће дифрактоване зраке фокусирати да би се добила увећана слика објекта, то у случају X-зрака није могуће, већ се за те потребе користе математички и рачунарски приступи (интернет страна: “Summary of Protein Crystallography”).

Укратко кристалографија X зрацима баца сноп X зрака кроз танак кристал који је направљен од бројних (број у трилионима) идентичних протеинских молекула. Кристал расејава X зрак на електронски детектор, затим рачунар мери интензитета расејаних X зрака да би то приписао позицији сваког атома у кристализованом молекулу. Коначан резултат је тродимензионална дигитална слика. Овом методом је решено више од 85% познатих структура (Сл. 32) (“Structural Biology - National Institute of General Medical Sciences,” 2017).



Слика 32. Упрошћен приказ снимања дифракције X зрака. X зрак се усмери на протеински кристал, који расипа X зрак у виду одређеног шаблона тачака у зависности од структуре кристалне решетке (“Guide to Understanding X-ray Crystallography,” n.d.).

Кристализација протеина представља процес формирања протеинских кристала, који се користе затим у научне или индустријске сврхе и то најчешће за истраживање путем X зрака. Као и већина других молекула и протеини могу да формирају кристале када раствор у ком су растворени постане презасићен. Под тим условима, појединачни протеински молекули могу да се пакују у понављајуће јединице, међусобно повезане нековалентним везама. Овако упаковани кристали онда могу да се користе у структурној биологији за истраживање молекуларне структуре протеина или за разне индустријске или биотехнолошке сврхе (Rhodes, 2006; Sands, 1988).

Кристализација протеинских молекула је позната више од 150 година (McPherson & Gavrira, 2014). Године 1934. Џон Дезмон Бернал (*енгл.* John Desmond Bernal) и његова студенткиња Дороти Ходџкин (*енгл.* Dorothy Hodgkin) су открили да протеински кристали који су окружени са својом течностима за кристализацију дају бољу дифракцију него суви кристали (Tulinsky, 1996). Прва публикована структура је била структура миоглобина решена помоћу кристалографије X зрацима 1958. године од стране Џона Кендруја (*енгл.* John Kendrew) који је због тога 1962. године добио Нобелову награду коју је делио са Максом Перуцом (*енгл.* Max Perutz) за ово откриће.

6.4.1. Основни принцип протеинске кристалографије

Растворљивост молекула протеина је условљена са много фактора, посебно са интеракцијама са другим компонентама раствора. Већина протеина је растворљива у физиолошким условима међутим са повећањем концентрације соли протеин постаје мање растворљив и почиње да формира или кристале или преципитате. Овај феномен се зове исољавање (*енгл.* salting out). Међутим, растворљивост протеина се смањује и са смањењем концентрације соли. Дакле у условима са ниском концентрацијом соли растворљивост се може повећати повећањем концентрације соли, тај феномен се зове усљавање (*енгл.* salting in).

Циљ кристализације је да се направи добро организовани кристал који нема контаминанте, а и да је довољно велик да обезбеди дифракциони шаблон када се изложи X зрацима. Овај дифракциони шаблон се затим анализира да би се распознала терцијерна структура протеина. Протеинска кристалографија је у суштини прилично тешка и због крхе природе протеинских кристала. Протеини имају неуређену површину, што омогућава формирање великих канала унутар било ког протеинског кристала. Дакле, нековалентне везе које држе решетку морају често бити формиране кроз неколико слојева молекула растварача (Rhodes, 2006). Да би се превазишли

проблеми крхости кристала и додатни спољносредински фактори морају бити адекватни. Бројни фактори утичу на вероватноћу настанка кристала у протеинском раствору. Неки од ових фактора су чистоћа протеина, рН, концентрација протеина, температура, преципитанти и адитиви. Што је протеински раствор хомогенији већа је вероватноћа да ће кристалисати. рН раствора може да буде веома важна и у неким случајевима може да доведе и до различите оријентације паковања протеина. Преципитанти, као што је амонијум сулфат или полиетилен гликол (PEG) се често користе да потпомогну формирање протеинских кристала (Rhodes, 2006).

6.4.2. Кристализација протеина - методе

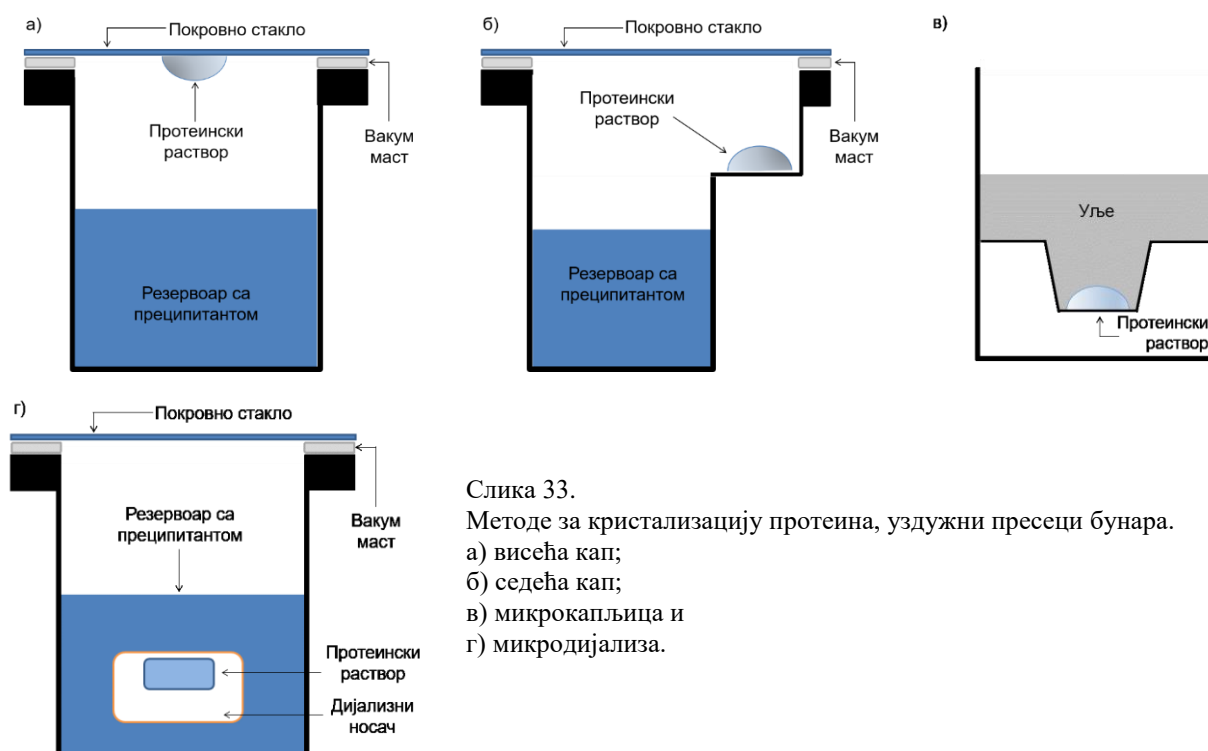
Свим методама које помажу кристализацију протеина претходи оптимизација експресије протеина као и његово пречишћавање, тек са добро пречишћеним протеином је могуће покушати кристализацију.

Дифузија испаравањем (енгл. vapor diffusion). Ова метода је најчешће коришћена у протеинској кристализацији. У овој методи кап која садржи пречишћен протеин, пуфер и преципитант се еквилибрише са великим резервоаром који садржи сличан пуфер и преципитант као и кап, али у већој концентрацији. На почетку кап протеинског раствора садржи знатно мању концентрацију преципитанта и протеина, али како се полако кап и резервоар еквилибришу тако се преципитант и протеин концентрују у капи. Уколико је коришћен одговарајући раствор за кристализацију за дати протеин, зачеци кристала ће се појавити у капи. Ова метода се користи јер омогућава нежне и постепене промене у концентрацији протеина и преципитанта што додатно поспешује раст великих и добро организованих кристала (Rupp, 2009). У оквиру ове методе постоје две технике за њено спровођење: висећа кап и седећа кап (Сл. 33). Принцип функционисања висеће капи је да се кап протеинског раствора постави на преврнути „поклопац“ који се као такав налази изнад резервоара (Сл. 33/а). Седећа кап функционише тако што се кап протеинског раствора стави на постоље које је одвојено од резервоара (Сл. 33/б). Обе ове методе захтевају да буду изоловане од спољносрединских услова „лепљењем“ поклопца (употребом вакум масти или поклопаца са завртњима), да би дошло до еквилибрације између капи и резервоара (Rhodes, 2006; Rupp, 2009).

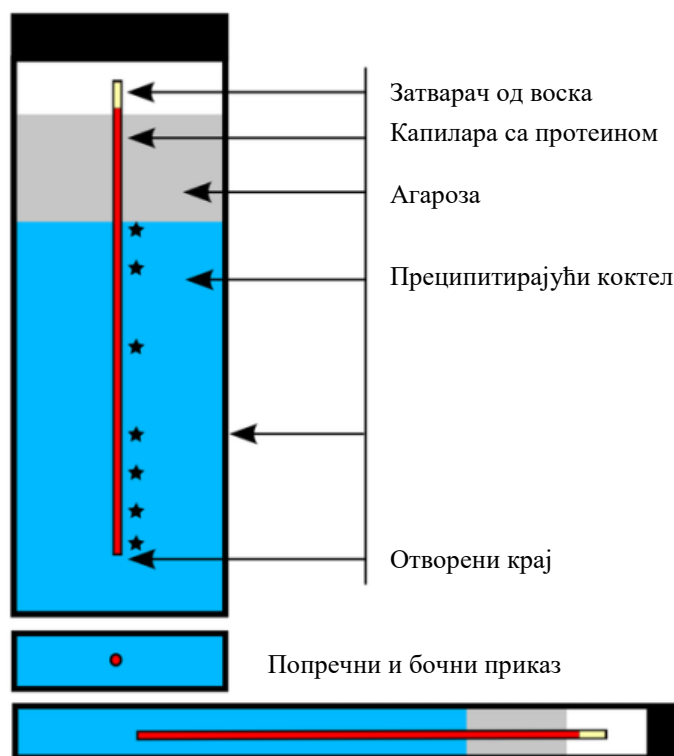
Микрогомила (микрокапљица) (енгл. microbatch). Метода подразумева урањање веома мале запремине протеинске капи (око 1 μ l) у уље (Сл. 33/в). Уље је неходно да би успорило евапорацију у воденој средини тако мале запремине

протеинског раствора. Најчешће употребљавана уља су парафинско (Chayen, Shaw Stewart, Maeder, & Blow, 1990) и силиконско (D'Arcy, Elmore, Stihle, & Johnston, 1996). Предности ове методе су поред употребе веома мале запремине узорка и чињеница да су узорци заштићени од ваздушних контаминаната јер никада нису изложени ваздуху током експеримента.

Микродијализа. Микродијализа користи особину полупропустљиве мембране, кроз коју могу мали молекули и јони да прођу, док протеини и већи полимери не могу. Успостављањем градијента концентрације кроз мембрану и кретање система према еквилибријуму, систем може полако да дође до презасићења, где се у том моменту могу формирати кристали. Микродијализа може да подукује кристале одсољавањем и ређе усољавањем (Сл. 33/г).



Дифузија преко слободне површине. Ова метода се најчешће изводи у капиларама (малим каналима). Овом техником се раствор протеина и преципитата спајају без претходног мешања и то тако што се наносе на различите стране канала омогућавајући на тај начин еквилибрацију преко дифузије. Крајеви се затварају, агарозом, воском или слично (Сл. 34) (интернет страна: “Hampton Research”; Rupp, 2009).



Слика 34. Поставка експеримента за кристализацију у капиларама (Oberthuer et al., 2012).

Специјалне технике кристализације протеина. Неки протеини представљају прави изазов за кристализацију. Такви протеини су на пример мембрански, који честа захтевају присуство детерџента за изолацију и кристализацију и имају тенденцију формирања малих и слабих кристала. Једна од познатијих техника је „течно кубична фаза“ (*енгл.* lipidic cubic phase) (Wallace, Dranow, Laible, Christensen, & Nollert, 2011). Затим протеини који формирају влакна морају бити стабилизовани у мономерној форми. Мали протеини могу да имају слабу растворљивост у води и да захтевају посебне технике кристализације.

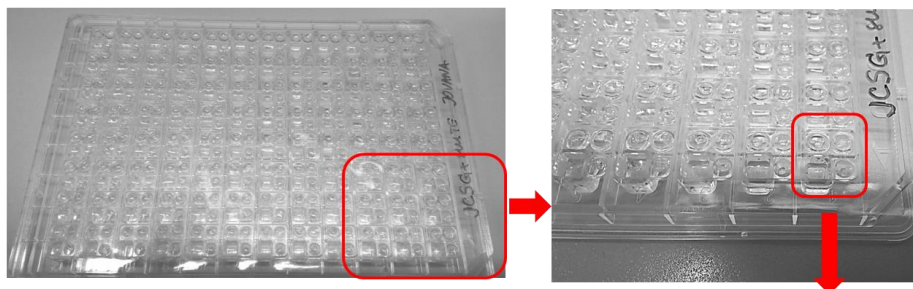
Технике које потпомажу кристализацију протеина:

1. Изналажење услова кристализације у великом обиму (*енгл.* high through-put crystallization screening). Методе великог обима служе да потпомогну да се рационализују бројни експерименти који захтевају да се истраже бројни различити услови који су неопходни за успешан настанак и раст кристала. Постоје бројни комерцијални комплети који у себи садрже различите растворе који су се показали као успешни за раст различитих кристала, па је на овај начин могуће истражити велики број различитих услова за раст кристала за кратко време.

У оваквим експериментима, где са ради са великим бројем услова велику помоћ пружају роботи (*енгл.* liquid handling robots) који постављају и аутоматизују одређене

корак у кристализацији који би другачије били врло спори и са потенцијалним људским грешкама које се заобилазе са оваквим аутоматизованим процесима. Роботизовани кристалizacionи систем ради са истим компонентама које су већ споменуте, међутим сваки корак се реализује брже и са великим бројем копија истовремено. Такође употребом робота је и смањена запремина потребног узорка по услову који се тестира, што повећава изналажење у једном кораку, а смањује потребу за додатним пречишћавањем протеина. Сваки експеримент се често надгледа камерама које детектују појаву кристала али и ручно на бинокуларној лупи (интернет страна: “The crystal robot”).

Приликом ручне поставке сета услова за кристализацију, то се најчешће ради на плочама са 24 бунара, док се приликом рада са роботима користе плоче са 96 и 324 бунара. Бунари које користи робот су знатно мање запремине, међутим сваки од тих бунара у оквиру своје јединице може да има и додатна три бунара (подбунара) где се у случају једног услова у резервоару могу испитати различити односи у протеинском раствору. Под тим се мисли на односе протеин:смеша из резервоара да буду рецимо 1:1, 1:2 или 2:1 (Сл. 35). Метода која се овде користи је најчешће седећа кап. Плоче се на крају прекрију провидном лепљивом траком.



Слика 35. Приказ једне плоче са 96 бунара и постепено увећани делови плоче са шаблоном распореда подбунара. На шаблону је приказан и запремски однос меше раствореног протеина и преципитанта који је коришћен за ову тезу.



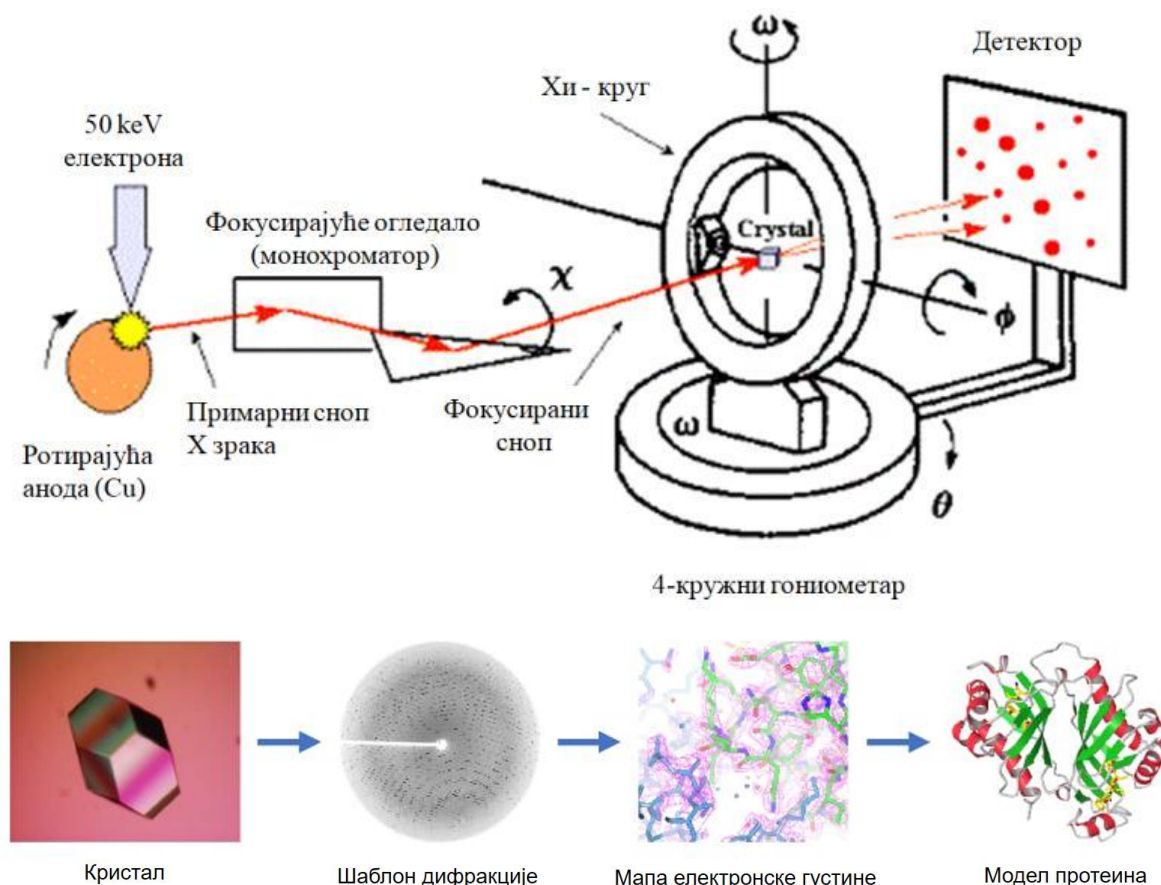
2. Протеински инжењеринг. Технике молекуларне биологије, посебно молекуларно клонирање, експресија рекомбинантних протеина и одређене мутагенезе могу бити искоришћене да измене одређене делове протеина који могу потпомоћи како пречишћавање тако и саму кристализацију. Повремено проблем могу да праве резиде

цистеина које путем набројаних метода могу бити измењене у аланин и на тај начин се могу превазићи проблеми стварања дисулфидних мостова који омогућавају настајак агрегата. Наравно и друге резидуе у зависности од концепта експеримената и истраживања могу бити мутиране (Forest & Schutt, 1992).

У оквиру ове тезе је коришћена висећа и седећа кап као метода. Рађено је и ручно и са роботима.

6.4.3. Прикупљање података и конструкција модела

Добијени кристал се вади (пеца) из капљице у којој је настао и то малом најлонском петљом, уколико је потребно кристал се меша и са криопротектантом. Тако може да се складишти у течном азоту или одмах постави на гониометар, помоћу ког је могуће подешавање положаја кристала у односу на Х зрак и ротирање кристала, где се затим снима дифракција (Сл. 36).



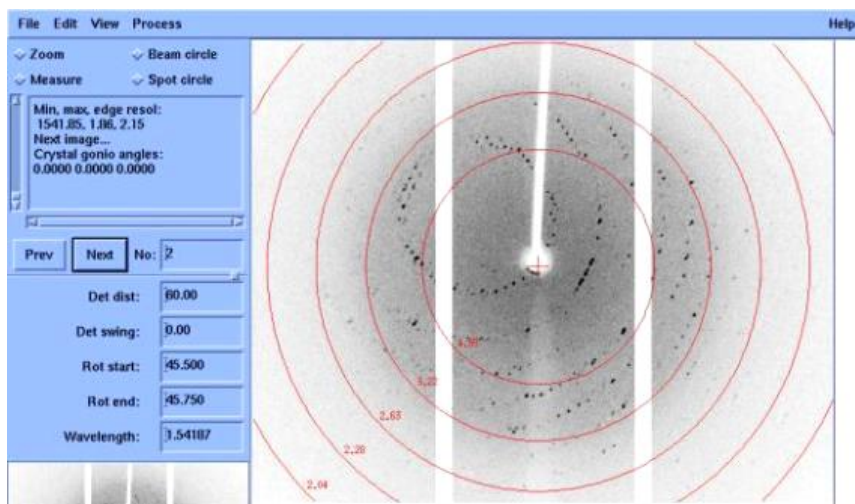
Слика 36. Упростићен приказ апаратуре и процедуре снимања кристала и детекције дифракције (горње), редослед корака у решавању структуре протеина употребом кристалографије (доле) (интернет стране: "X-Ray Crystallography - Crystal Production"; "X-ray Diffraction").

Снимање дифракције може да се ради на малом постројењу X зрака унутар лабораторије (у радовима често навођен као in-house извор) или на синхротрону. Синхротрон представља веома моћан извор X-зрака (Сл. 37). Ти зраци настају од електрона високе енергије који као такви настају током њиховог кружења унутар синхротрона. Односно, када се електрону који је у покрету промени правац кретања, он емитује енергију, а синхротрон постоји да би убрзао електроне до веома високих енергија и да би им затим повремено мењао правац кретања, као резултат емитују се X-зраци. Дакле, синхротрон представља посебан тип цикличног акцелератора (убрзивача) честица (интернет страна: “What is a synchrotron?”).



Слика 37. Општи приказ грађе и структуре једног синхротрона (интернет страна: “What is a synchrotron?”)

Када се кристал постави и изложи интензивном X зраку, он расипа X зрак у шаблон тачака односно рефлексију која се детектује на детектору који се налази иза кристала (Сл. 38). Међутим излагање кристала X зрацима уништава кристал тако да је неопходно да се добро испланира време излагања и количина података коју желимо да сакупимо. Однос интензитета ових тачака даје информацију којом се утврђује распоред и оријентација молекула унутар кристала на нивоу атома. Интензитет ових рефлексија се снима на фотографском филму, детектору или ЦЦД камери. Рефлексије под малим углом одговарају ниској резолуцији, док оне које су под великим углом представљају високу резолуцију, дакле горња граница евентуалне резолуције структуре може да се установи већ из првих неколико слика дифракције. Једна слика добијених тачака је недовољна да би могао да се реконструише цео кристал, дакле неопходно је да се кристал у одређеном опсегу ротира приликом снимања.



Слика 38.
Приказ екрана са снимљеном дифракцијом протеина AKR1C3. Црвени кругови представљају вредност резолуције у зависности до које линије дођу црне тачке, које представљају детектовану дифракцију тестираног кристала.

Након детектовања рефлексије даља обрада података и коначно решавање структуре се врши на рачунару. Цела процедура на рачунару се може поделити на индексовање, интеграцију, скалирање, решавање фазног проблема, грађење, утачњавање и валидацију (и публикавање).

Две информације је могуће добити од рефлексија са слике дифракција. Прва информација се добија од геометријског распореда рефлексија која нам даје све информације о кристалној решетки и симетрији кристала, односно информације о јединичној или елементарној ћелији (*енгл.* unit cell). Друга информација се добија од интензитета рефлексије, што даје део информације о садржају решетки. Међутим, друга информација, постоји само делимично јер су неопходне **фазе** да би се она у потпуности решила. Током **индексовања**, треба да се пронађу све тачке, које се затим именује (индексује) са целим бројевима (који се обележавају h , k и l) и треба да се геометрија кристала прецизно реши тако да интеграција може да буде тачна. **Интеграција** обухвата детерминацију интензитета рефлексија која се огледа у утврђивању вредност интензитета (I) и позадине (σI). Током **скалирања** интегришу вредности других слика добијених у дифракционим експериментима и комбинују се у један сет структурних фактора и нормализују према симетрији.

Фазни проблем је велики проблем у кристалографији. Детектор X-зрака може да детектује само интензитета али не и електро-магнетне таласе. Свака рефлексија дифракционог шаблона или структурни фактор одговарају једном таласу који се састоји од амплитуде и фазе. Амплитуда се лако рачуна израчунавајући корен интензитета, међутим фаза се изгуби током сакупљања података. Фаза садржи кључне информације за детерминацију дистрибуције електронске густине у кристалу. Постоји неколико начина како се може доћи до иницијалне фазе.

1. Директни метод. Користи се само за мале молекуле, који се своди на „погађање“ фаза структурних фактора.

2. Молекуларна замена (*енгл.* molecular replacement, MR). Уколико је позната структура хомологног протеина са сличношћу секвенце барем око 40%, онда се та структура може користити за одређивање приближне фазе структурног фактора.

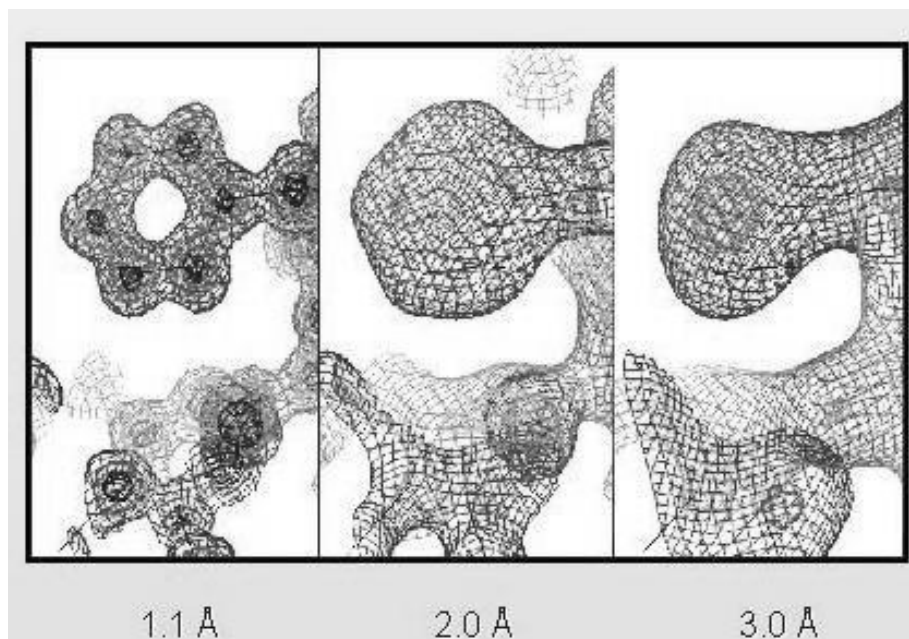
3. Изоморфна замена (*енгл.* isomorphous replacement, SIR, MIR). Идеја ове методе је да се кристал урони у раствор тешког метала и да се потом дифракциони шаблон оваквог кристала пореди са дифракционим шаблоном нативног кристала. Тешки метали који се налазе у структури имају велики допринос у дифракцији што омогућава да се њихова дифракција лако детектује и разлика у дифракционом шаблону може да се израчуна.

4. Аномална дисперзија (*енгл.* anomalous dispersion, SAD, MAD). Метода је врло слична претходној, само што се у овом случају прати аномалија дисперзије настале услед транзиције зрака између различитих енергетских нивоа атома тешког метала.

5. Комбинација метода. Најчешће се комбинују изоморфна замена са аномалном дисперзијом.

Грађење је резултат тачног детерминисања структурних фактора у мапи електронске густине. Атомски модел структуре мора да се угради у поменуту мапу. Тачно грађење структуре се касније користи током утачњавања да би се поправила фаза која је раније установљена. Након иницијалног решавања проблема фазе и грађења, модел протеина је и даље далеко од савршеног, из тог разлога се користе методе **утачњавања** да би се поспешиле фазе и интерпретација мапе електронске густине. Утачњавање се постиже кроз статистичка прилагођавања координата атома тако да се укопе још боље у дифракционе податке. Фактор R се користи као мера уклапања.

Модел остаје модел чак и при високој резолуцији (Сл. 39) и добром уклапању електронске густине. Постоје многи разлози за постојање потенцијалних грешака током процеса решавања структуре. Методе **валидације** детектују несталност у коначном моделу засновану на информацијама које нису коришћене током процеса утачњавања. Тако да се овак корак може сматрати и додатним кораком у утачњавању (интернет страна: “X-Ray Crystallography - Crystal Production”).



Слика 39. Разлика изгледа детаља у структури при различитим резолуцијама.
<http://www.bmsc.washington.edu/people/verlinde/experiment.html>

Публиковање. Структуре протеина се углавном складиште у протеинску базу података (PDB) по захтеву научних часописа. Информације се складиште у два дела, координате атома и мапу електронске густине. Постоји више база података и програма за визуелизацију молекула.

7. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Суперфамилија АКR се састоји од неколико ензима, који су укључени у катализу редокс трансформација у биосинтези, интермедијарном метаболизму и детоксификацији великог броја различитих супстрата. Због своје широке специфичности, АКR имају битну улогу у детоксификацији великог броја фармацеутика, лекова и ксенобиотика. Иако се доста зна о супстратној специфичности и ткивној дистрибуцији АКR1C ензима, њихова физиолошка улога још увек у потпуности није разјашњена. Ензими ове фамилије деле висок степен сличности и каталитичких карактеристика, дакле битно је сазнати до које мере и са којим супстратима ови ензими могу да замене један другог. Развој специфичних инхибитора и супстрата могу бити битни за испитивање улоге појединачних изоформи АКR1C фамилије, међутим и као добри кандидати за потенцијалне будуће лекове (Barski et al., 2009). За неке чланове АКR1C фамилије је установљено да чак инактивирају одређене лекове који су укључени у антиканцерогене терапије, па као такви представљају мету за инхибицију приликом примене те терапије, међутим због постојања различитих изоформи АКR1C, инхибитори морају да буду високо специфични (Novotna et al., 2008).

AKR1C нема у потпуности дефинисану улогу у ћелијској биологији. Иако је потврђен њихов значај у развоју одређених патолошких стања, још увек нема регистрованог лека који директно утиче на протеин, тако да се тек сада откривају нови супстрати и инхибитори и њихова улога на постојећу активност ензима.

Због свега наведеног постоји дугорочан интерес за истраживањем алдо-кето редуктаза и због тога изолован и активан протеин је неопходан за оптимизацију ензимског есеја у оквиру ког ће се истражити и идентификовати нови лиганди који се могу везати за одређене ензиме из АКR1C подфамилије. Добијени резултати ће се користити за тестирање модела и усидравање, затим за предвиђање структурно-функционалне повезаности, истраживање специфичности, као и утицаја испитиваних лиганата на ензимску активност.

Циљ овог истраживања је оптимизација ензимског есеја и испитивање потенцијалних лиганата и њиховог ефекта на ензимску активност одређених хуманих АКR1C ензима. Да би се реализовао општи циљ, неопходна је оптимизација целог процеса од трансформације бактерија са одређеним плазмидом до добијања успешно пречишћеног и активног ензима на крају процеса са којим се даље истражују ефекти

различитих лиганада на активност ензима. Поред наведеног, циљ истраживања је и испитивање везе између структуре и функције тестираних једињења (лиганада) према ензиму, и то кроз експерименте протеинске кристалографије.

8. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

8.1. Бактеријски сојеви и плазмиди

Сојеви бактерија који су коришћени у овој тези су DH5 α , BL21(DE3).

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације су обухватила рад са неколико различитих плазида са различитим инсертом (секвенцом протеина од инетреса) који су приказани у Табели 3.

Табела 3. Преглед коришћених плазида и њихове основне карактеристике

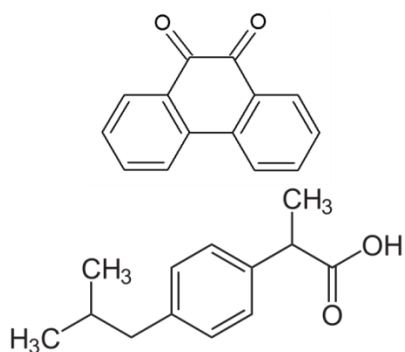
Плазмид	Протеин	Обележивач	Резистентност	Величина	Порекло вектора
1. pGEX-2T	AKR1C3	GST	Ампицилин	37+23 = 63 kDa	Jerzy Adamski (Gabriele Möller) München, Germany
2. pET28a(+)	17 β HSD1	N-His x 6	Канамицин	35+4,2 = 39,2 kDa	Chi-Ching Hwang, Kaohsiung Medical University, Taiwan
3. pET28b(+)	AKR1C1	N-His x 6	Канамицин	~37 kDa	Chris Bunce (University of Birginham), UK
4. pET28b(+)	AKR1C2	N-His x 6	Канамицин	~37 kDa	Chris Bunce (University of Birginham), UK
5. pET28b(+)	AKR1C3	N-His x 6	Канамицин	~37 kDa	Cris Bunce (University of Birginham), UK
6. pET28b(+)	AKR1C4	N-His x 6	Канамицин	~37 kDa	Cris Bunce (University of Birginham), UK

8.2. Испитивана једињења и биљни екстракти

У оквиру ензимских есеја је тестиран одређени број једињења од којих већи део представљају синтетисана једињења са стероидним језгром, затим, тестирано је и неколико комерцијалних хемикалија (једињења). Поред једињења тестирани су и биљни екстракти.

8.2.1. Једињења

Синтетичка једињења чине једињења која су синтетисана у оквиру Лабораторије за органску хемију на Департману за хемију, биохемију и заштиту животне средине. Сва синтетичка једињења имају стероидну основу са различитим модификацијама на различитим прстеновима. У Табели 4 су приказане структуре синтетисаних једињења која су тестирана. Једињења која су коришћена као познате контроле су фенантренекинон, као супстрат и ибупрофен као инхибитор (Сл. 40).



Слика 40.

А – структура познатог супстрата за АКР, фенантренеквинон (енгл. 9,10-phenanthrenequinone, PQ);

Б – структура познатог инхибитора за АКР, ибупрофен (енгл. ibuprofen, IBU).

Поред синтетисаних једињења коришћена и одређена комерцијална једињења, до којих се дошло додатним *in silico* истраживањима употребом програма idTarget (Savić et al., 2013). Тестирана једињења су 2-нитробензалдехид (2-NBA), *p*-нитробензалдехид (pNBA) и 1-нитросонафтол (2) (NSN). Једињења су приказана у Табели 5.

Табела 5. Тестирана комерцијална једињења 2-нитробензалдехид (2-NBA), *p*-нитробензалдехид (pNBA) и 1-нитросонафтол (2) (NSN).

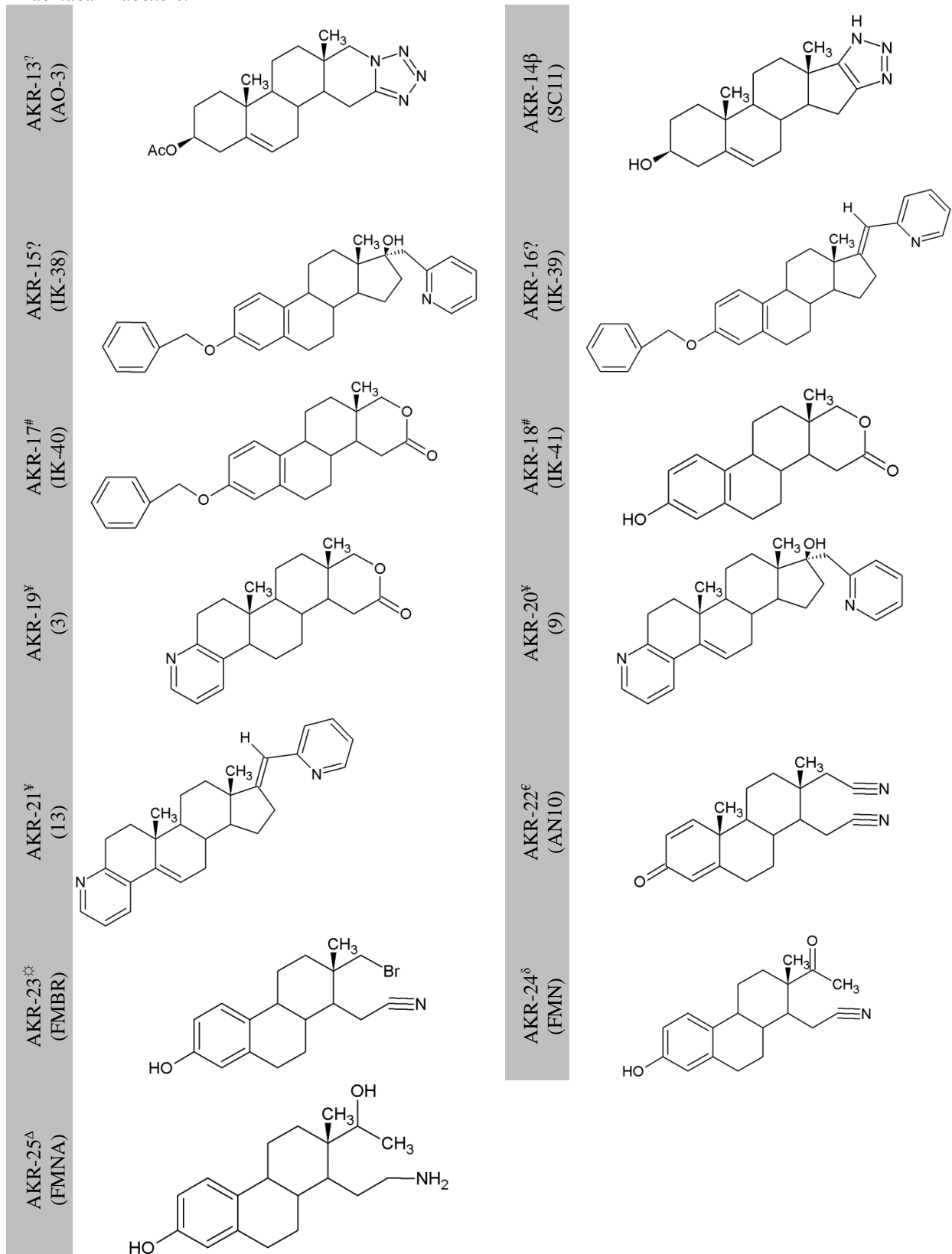
2-NBA		pNBA	
NSN			

Табела 4. Структуре тестираних синтетисаних једињења у есејима са AKR1C ензимима.

AKR-1*		AKR-2*	
AKR-3**		AKR-4+	
AKR-5 ^t		AKR-6 ^t	
AKR-7 ^s		AKR-8 ^s	
AKR-9* (AJ-1)		AKR-10? (AJ-14)	
AKR-11 ^{&} (h-6)		AKR-12 ^{&} (h-8)	

Наставак Табеле 4 на наредној страни

Наставак Табеле 4.



* (Penov-Gaši et al., 2007); ** (Djurendić et al., 2012); + (Djurendić et al., 2009); † (Ajduković et al., 2013); ‡ (Ajduković et al., 2015); ‡ (Savić et al., 2013); ? (Penov-Gaši et al., 2013); # (Jovanović-Šanta et al., 2015); † (Savić et al., 2018); ‡ (Nikolić et al., 2015); † (Jovanović-Šanta et al., 2003); ‡ (Penov-Gaši et al., 2001); † (Sakač et al., 2005); † (Jevrić et al., 2017); ? - новосинтетисана једињења.

8.2.2. Биљни екстракти

Коришћене биљке за ово истраживање су сакупљене у мају 2017. године на Копаонику у месту Брзеће и у Новом Сад. Ваучер од сваке биљне врсте је складиштен у Хербару БУНС на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду. Тестиране су следеће биљке и њихови делови:

- Вирак (*Alchemilla vulgaris*, L.) – цела биљка (Копаоник, 43.266400, 20.859271),
- Имела (*Viscum album*, L.) – листови, (Нови Сад, 45.245520, 19.854779)
- Боровница (*Vaccinium myrtillus*, L.) – листови, (Копаоник, 43.284967, 20.887171).

Припрема биљних екстраката. Екстракти наведених биљака су припремани као чајеви и то како је у народној медицини препоручено, превасходно водећи се рецептима чајева „Јосиф Панчић“ за дату биљку. У случајеви да су постојали различити рецепти испробане су различите опције. Како је за сваку биљку у рецептури мера кашика (1 - 2 g) чаја на 250 ml воде, одлучено је да експеримент буде припреман са 1 g на 25 ml воде, што је 10x концентрованије од рецепта, а поред ове мере тестирани су и 4x разблажени екстракти.

За припрему чаја (екстракта) од вирка коришћен је осушени биљни материјал од целе биљке који је преливен са 25 ml прокључале воде, остављен да се прохлади и затим је процеђен.

За припрему чаја (екстракта) од имеле су коришћени осушени листов имеле. Чај је прављен на два различита начина. У првом случају листови се преливају хладном водом и тако оставе преко ноћи, док је други начин да се листови прелију врућом водом и оставе 20 минута. Чај из обе опције је после процеђене.

Чаја од боровнице је припреман од осушених листова боровнице, који су преливени хладном водом и остављени преко ноћи. Ујутро је чај стављен да прокључа, након чега је остављен да се охлади и затим процеђен.

Поред екстраката насталих припремом биљке у виду чаја тестирани су и водени екстракти, направљени од старне колега са Департмана за хемију.

8.3. Припрема компетентних бактерија

Припрема свих компетентних бактерија *Escherichia coli* је рађена употребом CaCl₂. Сви коришћени медијуми за гајење бактерија су стерилисани аутоклавирањем. Прављена су два различита соја компетентних бактерије DH5α и BL21.

За припрему компетентних ћелија, прво су бактерије засејане на свежу LB агар подлогу (1% триптон, 1% NaCl, 0,5% екстракт квасца, 1,5% агар) и остављене преко ноћи у инкубатору на 37°C. Следећи дан је једна колонија са агар подлоге засејана у 5 ml LB медијума (Luria-Bertani, 1% триптон, 0,5% NaCl, 0,5% екстракт квасца) и остављена преко ноћи у инкубатору са тресилицом на 37°C. Следећи дан је 500 µL ове културе пребачено у 50 mL свежег LB медијума. Бактерије су гајене на 37°C у инкубатору са тресилицом до постизања оптичке густине (*енгл.* optical density, OD) 0,25-0,3, која је праћена на спектрофотометру на 595 nm. После достизања оптичке густине, бактерије су исталожене центрифугирањем (5 min на 13 400 g, подељено у тубе од по 2 mL). Након одливања супернатанта, талог бактерија је растворен у 1,5 mL 0,1 M CaCl₂ по туби и остављен на леду 30 min. Затим су бактерије исталожене центрифугирањем 5 min на 6000 g и растворене у 300 µL пуфера (0,1 M CaCl₂, 15% глицерол). Овако припремљене бактерије су аликвотиране и чуване на -80°C.

8.4. Трансформација бактерија

Све трансформације бактерија са различитим плазмидима су рађене истим протоколом (температурни шок, *енгл.* heat-shock) осим разлике у једном кораку у зависности са којим бактеријским сојем се ради. Разлика ће бити наведена на хронолошки адекватном месту у наставку текста. Одабир бактеријског соја је зависио од потреба самог експеримента. Бактерије DH5α су коришћене за умножавање плазида, а BL21 су коришћене за експресију протеина. Коришћени вектори имају различите антибиотске резистентности (отпорности) (Табела 3).

Компетенте бактерије (100 µL) су извађене са -80°C и стављене на лед да се отопи. У међувремену у стерилну и на леду охлађену тубицу се стави 1 µL плазмидне ДНК и затим 50-100 µL отопљених компетентних бактерије, тубица се благо протресе и остави на леду 15-45 min. Затим следи температурни шок, тубица се стави у водено купатило загрејано на 42°C, и то 30 s за BL21 и 45 s за DH5α. Потом се тубица врати на лед на 2 min. Затим се у тубицу дода претходно загрејани LB медијум (500-900 µL), благо се неколико пута инвертује и стави на инкубацију на 37°C око 1h. После инкубације се трансформисане бактерије засеју на чврсте (LB агар) подлоге које у себи садрже одговарајуће концентрације антибиотика (канамицин: 50 µg/mL, ампицилин: 100 µg/mL) и оставе преко ноћи на 37°C у инкубатор. Колоније које се следећег дана виде на плочи предствљају трансформисане бактерије које у себи носе ген на отпорност на антибиотик који се налази у медијуму.

8.5. Изолација плазмидне ДНК – минипреп

Минипреп је рађен модификованом методом алкалне хидролизе и то на два начина, један је употребом QIAGEN колона, а други без употребе колона (помоћу силика гела). Пречишћавање са QIAGEN колонама је рађено по званичном протоколу који та компанија препоручује. У наставку ће детаљније бити објашњен протокол за протокол без употребе колоне.

Једна колонија трансформисаних бактерија са чврсте подлоге је пребачена у 50 mL LB медијума и у зависности који плазмид је у питању у медијуму се налази и одређени антибиотик (ампицили, канамицин, хлорамфеникол). Медијум са трансформисаним бактеријама је остављен преко ноћи (16-18 h) у инкубатор са тресилицом на 37°C, 160 rpm. Следећег јутра је садржај из ерленмајера исталожен центрифугирањем (9300 g, 5 min) 2-5 mL по туби. После одбаченог супернатанта бактеријски талог је ресуспендован у P1 пуферу (50 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8,0; 100 µg/mL RNAza A). Следећи корак је лиза ћелија, додато је 250 µL P2 пуфера (200 mM NaOH, 1% SDS) и измешано инвертовањем тубице 6 пута. Затим следи неутрализација, додато је 350 µL N3 пуфера (4,2 M Gu-HCl, 0,9 M K-acetat pH 4,8), измешано инвертовањем тубице, као резултат формира се бео преципитат. Садржај туба је центрифугиран 10 min, 9300 g на 4°C. Супернатан који се одвоји после центрифуге је пипетом пренет у нову стерилну тубу, тако да се талог не поремети. У пренети супернатант је додато 30 µL силика гела (100 mg/mL) и мешано је инвертовањем 5 min. Након мешања, центрифугирано је 1 min, 9300 g и након тога је одливен супернатант, а у талогу остаје силика гел са везаном плазмидном ДНК. Следећи корак је испирање, на талог се дода 500 µL PE пуфера (10 mM Tris HCl pH 7,5; 80% EtOH). Тубица је затим инвертована неколико пута и опет центрифугирана 1 min, 9300 g. Затим је поновљен претходни корак, одливен је супернатант и поново додато 500 µL PE пуфера и затим центрифугирано. Тубица је остављена да се осуши након одливања супернатанта. После сушења, у тубицу на талог је додато 50 µL EB пуфера (10 mM Tris-HCl, pH 7,5) и стављено у водено купатило (65°C) на 5 min. Потом је стављено на центрифугу (1 min, 9300 g), после чега је супернатант, који предстаља пречишћену плазмидну ДНК пипетом пребачен у стерилну тубицу и складиштен на -20°C.

8.6. Провера минипрепа и рестрикционе дигестије плазида

Агарозном електрофорезом је проверен квалитет и квантитет минипрепа и успешност рестрикционе дигестије плазида. У оба случаја је прављен 1% агарозни гел. За анализу минипрепа на гел су нанети узорци плазида (Табела 3) са различитим генима од интереса прешишћени и са QIAGEN колоном и методом без колоне.

Рестрикционом дигестијом је проверено постојање рестрикционих места на основу наведене секвенце за дати плазмид и присуство и величина инсерта (гена од интереса). Рестрикциона дигестија са свим детаљима је публикована у оквиру мастер рада Мартине Глушчевић (Gluščević, 2014).

8.7. Индукција експресије рекомбинантних протеина

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације су обухватила рад са неколико различитих рекомбинантних протеина: 17 β HSD1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 (17 β HSD5) и AKR1C4 (Табела 3). У сваком случају индукција експресије протеина је рађена употребом IPTG-а (изопропил β -D-1-тиогалактопиранозид, *енгл.* isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Оптимизације рада са 17 β -HSD1 и AKR1C3 који је обележен са GST су описане у оквиру мастер радова рађених у нашој лабораторији (Gluščević, 2014; Kitanović, 2015).

Оптимизован протокол за индукцију експресије AKR1C3 са N-терминалним His₆ обележивачем. Први дан се започиње са преконоћном бактеријском културом, која се састоји од 10 mL LB медијума, 10 μ l канамицина (финална концентрација канамицина 50 μ g/ml) и од трансформисане BL21(DE3) бактерије из глицеролског штока са -80°C. Култура се поставља у инкубатор са тресилицом на 37°C, 180 rpm. Други дан, после 18 сати од започете преконоћне културе, култура се разблажити. Разблажено је тако што се 350 μ l преконоћне културе (инокулума) стави у 100 ml (x2, укупно 200 ml) медијума са антибиотиком, затим се разблажена култура стави у инкубатор са тресилицом у исте услове од претходног дана. Размножавање (раст) бактерија се прати променом оптичке густине (*енгл.* optical density, OD) културе, која се прати на таласној дужини од 595 nm. Када вредност OD достигне 0,6, културе се ставе на лед, да би се спустила температура у инкубатору (просторији) на око 20°C, у међувремену у културе се додаје IPTG у финалној концентрацији 0,5 mM и затим се култура врати на тресилицу. Културе се остављају наредних 18 сати на тресилици. Трећи дан после 18 сати индукције експресије, културе

се центрифугирају 10 min, 5000 g, 4°C, супернатант се одбацује, а талог (бактерије са протеином од интереса) се ресуспендује у пуферу (25 mM Na-фосфат, 150 mM NaCl, рН 8) тако да се талог од 200 ml културе раствори у 20 ml пуфера) и замрзава на -80°C.

За AKR1C1, -2, и -4 протокол за индукцију експресије је исти као и за AKR1C3, међутим са различитим приносом (видети поглавље Резултати).

8.8. Пречишћавање протеина

Пречишћавање протеина представља процедуру од неколико корака који ће у даљем тексту хронолошким редоследом бити наведени и објашњени.

8.8.1. Лизирање и соникација

Бактерије које су после индукције и експресије центрифугиране, ресуспендоване у пуферу и затим замрзнуте, извађене су из замрзивача и стављене на лед да се отапају. Када је почело отапање додат је лизозим у коначној концентрацији 1 mg/mL. Од тог момента је туба у којој су бактерије и лизозим, повремено инвертована и враћана на лед у трајању до 1 h. Садржај тубе је постајао гушћи, вискознији услед ослобађања ДНК из ћелија. После комплетног топљења, разградња преосталих ћелија и ДНК молекула је настављена на соникатору. У зависности од случаја до случаја соникација је понављана више пута по 30 s уз паузе од по исто толико у којима је туба враћана на лед. Уочавање разбистравања и смањења вискозности означавало крај соникације.

8.8.2. Грубо раздвајање

После лизирања и соникације, садржај тубе је центрифугира на 4°C, 45 min, 11100 g. Након центрифуге, очекује се да је протеин у супернатанту, тако да су сакупљени сви супернатанти у једну тубу, а талози сачувани у случају да протеин није растворљив и да је формирао агрегације и инклузиона тела, која ће се у том случају налазити у талогу.

8.8.3. Афинитетна хроматографија са имобилизованим металом

После грубог раздавања, супернатант је нанет на колону (запремина колоне је 1 ml) са имобилизованим металом - никлом (Ni) (GE Healthcare Life Sciences, HiTrap IMAC HP, 17-0920-03). Колона је коришћена према званичном протоколу компаније.

Принцип рада ове колоне се огледа у афинитету хистидинског обележивача рекомбинантног протеина према јонима никла, што резултује формирањем координатне ковалентне везе. Дакле, приликом проласка супернатанта кроз колону за сам гел колоне ће се везати протеин који је обележен са хистидинима. Везани протеини се елуирају помоћу компетитивног молекула - имидазола који има јачи афинитет за никл од самих хистидина. Протеин се сакупља у пет елуција од по 1 ml (јер се колона испира са 5 ml 0,5 М имидазола).

Пречишћавање рекомбинантног протеина AKR1C3 се започиње испирањем колоне са 5 ml дестиловане воде, затим еквилибрисањем са 5 ml пуфера (25 mM Na-фосфатни пуфер, 150 mM NaCl, pH 8). Након припреме колоне, наноси се цео супернатант уз сакупљање проточне фракције. Колона са везаним протеином од инетерса се испира прво са 5 ml пуфера, а затим са 5 ml 40 mM имидазола (направљен у наведеном пуферу). Протеин се скида (елуира) са колоне са 5 ml 500 mM имидазола, елуирање се сакупља у 5 тубица по 1 ml и тубице се стављају у лед. Колона се пере прво са 5-10 ml дестиловане воде, а затим са 5 ml 20% етанола, који се оставља у колони. После последњег корака, колона се у усправном положају враћа у фрижидер.

Пре даљег рада са узорцима, прво се проверава у којим елуатима се налази протеин, тако што је узет 1 μ l од сваког елуата и помешан са по 100 μ l Брадфордовог реагенса у различитим бунарима микротитар плоче. Број бунара (обележавају се према броју елуата) који промени боју у плаво, указује на број тубе елуата који се узимају за даљи рад. Најчешће се споје прва три елуата и тако спојена даље користе.

8.8.4. Гел-филтрациона хроматографија

Колона која је коришћена за гел-филтрацију је ручно прављена. Туба за колону је марке Carl ROTH (1516.1). Према протоколу на сајту компаније израчунато је да за запремину узорка од 3 ml потребно је 6 ml матрикса. За матрикс је коришћен гел са величином пора у које могу да уђу молекули од 15000 до 20000 Da молекуларне тежине (BIO-RAD, Bio Gel P-10), за потребе овог експеримента израчунато је да је потребно 0,8 g гела. Гел је остављен два дана да хидратише у дестилованој води. Пре наношења хидратисаног гела у тубу, прво је постављен филтер папир навлажен са дестилованом водом и затим је у затворену тубу нанет гел. Тако припремљена колона је остављена извесно време да све слегне и затим је колона испрана са 20% етанолом и остављена у етанолу до употребе.

Принцип рада ове колоне се огледа у чињеници да мањи молекули улазе у поре гела у матриксу, а самим тим већи молекули први изађу из колоне. Поред овог додатног корака пречишћавања, у случају експеримената обухваћених овом тезом, колона је служила и за замену пуфера у ком се узорак налазио, из пуфера са имидазолом у пуфер који је адекватан за даље потребе.

Колона се држи затвореном док се било која течност наноси у њу и затим отвори све док менискус нанете течности не дође до гела када се поново колона затвара. Овај поступак се понавља после сваке течности која се додаје. Колона се прво отвори док менискус етанола (у ком се колона чува) не дође до гела. Колона се припрема за употребу наношењем 3 запремине колоне (*енгл.* column volume, CV; $3 \times 3 \text{ ml} = 9 \text{ ml}$) дестиловане воде. Након испирања колоне за рад, нанесе се 3 CV пуфера (за ензимски есеј: 25 mM Na-фосфат, 150 mM NaCl, 10% глицерол, pH 8; за кристализацију протеина: 10 mM K-фосфат, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7). Узорак (спојени елуати) се наноси пипетом (начин наношења: 2 ml пустити да уђу у гел па онда додати преостали 1 ml). Затим се нанесе 3 CV пуфера и започне са сакупљањем 8-9 фракција по 1 ml, које се одмах стављају на лед. После употребе колона се испира са 3 CV пуфера, затим са 3 CV дестиловане воде и на крају са 20% етанолом у ком се колона и остави.

После колоне прво је проверено које фракције садрже протеин тако што је узет 1 μl од сваке фракције и помешано са по 100 μl Брадфордовог реагенса у различитим бунарима микротитар плоче. Бунари у којима је боја прешла у плаво представљају фракције које садрже протеин. Те фракције су спојене. У спојене фракције је додат кофактор NADP⁺ у финалној концентрацији 1,2 mM, који повећава стабилност протеина.

8.8.5. Течна хроматографија ниског притиска - FPLC

FPLC (*енгл.* fast protein liquid chromatography) је вид течне хроматографије који се користи за анализу или пречишћавање протеина. Мобилна фаза је течни раствор (пуфер), чија се брзина протока контролише пумпом и углавном је константна, док се садржај пуфера контролише увлачењем различитих течности у различитим пропорцијама из два или више резервоара.

Пречишћавање FPLC-ом за тестирање активности протеина. Део протеина са којим је рађено на Факултету за хемију и хемијску технологију у Љубљани је пречишћаван и са овом методом. У овим експериментима је коришћен протеин са GST

обележивачем, тако да је систем коришћен за елуцију узорка са GST колоне (GE Healthcare Life Sciences, GST-HiTrap 1 ml) са пуфером за елуцију (50 mM Tris, 10 mM редуковани глутатион, pH 8.0) и за додатно пречишћавање гел-филтрационом колоном Superdex 200 pg са пуфером 20 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7.4, употребом FPLC система Äkta (Amersham, сада GE Healthcare, САД).

Пречишћавање FPLC-ом за протеинску кристализацију. Узорци протеина са којима је рађено на Институту у Прагу су пречишћени у Србији, а затим додатно и употребом FPLC у пуферу (10 mM К-фосфат pH 7,0; 1 mM EDTA, 1 mM DTT) на гел филтрационој HiLoad 16/600 Superdex 200 pg колони, употребом FPLC система Äkta Basic (GE Healthcare, САД).

8.9. Концентровање и складиштење протеина

У претходном кораку спојене су само фракције које садрже протеин, међутим после гел-филтрационе колоне узорак је разблажен па је неопходно концентровање. Пре самог концентровања концентрација протеина је измерена на нанодропу (BioSpectropano, Shimadzu Biotech, A115748). Подаци који су унети у софтвер нанодропа је молекуларна тежина - 39016,56 Da и екстикциони коефицијент - 37360 M⁻¹cm⁻¹.

Подаци су добијени уношењем секвенце протеина на ProtParamTool (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Спојене фракције које су измешане са кофактором су пренете у Amicon тубе за концентровање протеина (Amicon ultra, Merck). Запремина је спуштана до различитих вредности у зависности са којом концентрацијом је започето. У колико је туба у потпуности нова прво се мембрана унутар ње испира са дестилованом водом пар минута, окретањем тубе и са пипетом, после се садржај декантује, затим се мембрана испира са пуфером (истим у ком је узорак) и затим кратко исцентрифугира и одстрани садржај. Када се нанесе узорак туба се стави на центрифугирање (ако је туба од 4 ml онда 7500 g ако је фиксни ротор, а 4000 g ако није; ако је туба од 15 ml, 5000 g ако је фиксни ротор и на нефиксоном ротору на 4000 g или 3500 g ако је узорак вискозан). Центрифугирање се прекида на по пар минута и пипетом благо ресуспендује преостали садржај унутар мембране. Центрифугира се све док се не дође до жељене запремине унутар мембране. На крају садржај између мембрана се преноси у стерилну 1,5-2 ml тубицу. Тубица се затим центрифугира на 14 000 g, 1 min, супернатант се преноси у нову тубу. Туба за концентровање се затим чисти испирањем са 2-3 ml дестиловане воде 5-10 минута, ресуспендовањем и затим декантовање садржаја, потом се

центрифугира на 5000 g и добро испере са дестилованом водом, опет центрифугира и декантује. Туба се оставља у 20% етанолу. Складиштење:

1. За кристализацију: узорак је после концентровања аликвотиран у запремине од по 50 μ l и замрзнут на -80°C . Део узорака је остављан уколико се настављало одмах са постављањем протеина за кристализацију.
2. За ензимски есеј: у смешу протеинског раствора и кофактора се дода глицерол у финалној концентрацији од 50%.

8.10. Полиакриламид електрофореза са натријум додецилсулфатом (SDS-PAGE)

SDS-PAGE је коришћена за контролу присуства и чистоће протеина од интереса у сваком кораку у пречишћавању протеина. Коришћен је 12,5% гел, као и опрема од Bio-Rad, Miniprotean II и III. Неиндуковани узорак (NI) и сви који су узимани до краја индукције (+1, +3, +18 итд.) су узимани по 1 ml, центрифугирани и талог сачуван и замрзнут на -20°C . Остали узорци, лизат (L), супернатант (SN) и сви елуати (E1-E5) и фракције (F0-Fx, x - број последње фракције) су узимани по 10 μ l директно из узорка и као такви замрзавани, док је талог (T) који је остао од супернатанта замрзнут као такав. Пре саме електрофорезе, је уследила припрема узорака. Узорци батерија пре и после индукције који су центрифугирани (NI, +1, +3, +18) су растворени у по 100 μ l дестиловане воде и 10 μ l је узето за гел, друга група узорака (L, SN, E, F) је пре електрофорезе само кратко центрифугирана, а талог (T) је ресуспендован у запремини дестиловане воде коју је узорак има пре центрофуге и опет је узето 10 μ l. Сваки од узорака је помешан са по 10 μ l мастер микса, који се састојао од 5x пуфера за узорке, β -меркаптоетанола и дестиловане воде. Тако припремљени узорци су стављени у термоблок на 95°C , 5 минута, затим кратко центрифугирани и наносени на гел. Електрофореза је пуштена на 150 V првих 15 минута, а затим је волтажа повећана на 180 V. Када је фронт боје дошао до краја гела, електрофореза је заустављена, гелови су извађени и на сат времена остављани у боји (Coomassie Brilliant Blue R-250), а након тога су пребачени у раствор за обезбојавање у ком су остављени преко ноћи и сутрадан сликан у комори за сликање гелова.

8.11. Ензимски есеј и кинетички параметари

За анализу активности ензима коришћени су ензимски есеји, код којих се активност пратила употребом оптичких метода: спектрофотометрије и флуориметрије. Ензимски есеји су оптимизовани комбиновањем литературе и консултовањем са ауторима публикованих радова (Möller et al., 2009; Schuster et al., 2011; Velića et al., 2009).

8.11.1. Спектрофотометријски приступ

Ензимска активност AKR1C1-4 (обележеном са 6xHis на N-терминалном крају) протеина је мерена спектрофотометријски (Multiscan GO, Thermo Scientific, САД) и то праћењем промене вредности апсорбанце на 340 nm услед оксидације кофактора NADPH. Као познати супстрат је коришћен 9,10-фенантрениквинон (*енгл.* 9,10-phenanthrenequinone, PQ) (Velića et al., 2009). Реакциона смеша која се састојала од 200 μM кофактора NADPH и 40 $\mu\text{g/ml}$ рекомбинантног протеина AKR1C1-4 је инкубирана са или без тестираних једињења (6,25 μM финална концентрација, растворени у 100% DMSO, а у реакционој смеси до 4%) или са AKR1C3 инхибитором ибупрофеном (*енгл.* ibuprofen, IBU, 6,25 μM) као контролом. PQ и IBU су коришћени за тестирање активности свих изоформи (Burgs et al., 2008). Све заједно се налазило у 75 μl 50 mM Na_2PO_4 пуфера (pH 6,5) по бунару и прединкубирано је 15 минута на 37°C. Реакција је започета додавањем PQ у концентрацији од 0,39 μM , на температури од 30°C. Реакција је праћена падом у вредности апсорбанце на 340 nm кофактора NADPH ($\epsilon=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Вредност апсорбанце је бележена у одређеним интервалима, укупно око 30 минута. Сва мерења су изведена у трипликату.

8.11.2. Флуорометријски приступ

Оксидација супстрата катализована са AKR1C3 (обележеним са GST) протеином је мерена на флуорометру (Perkin Elmer LS55 Luminescence Fluorescence Spectrometer), праћењем формирања NADPH путем пораста емисије на 465 nm услед екситације на 340 nm. Све реакције су отпочињале додатком ензима и одвијале се на 37°C (протокол је настао уз консултације са Др Габриеле Мулер, Gabriele Möller). Есеј је рађен у киветама, у укупној запремини од 300 μl и праћен од 30 до 60 минута. Реакциона смеша се састојала од 100 mM Tris-HCl, pH 9 пуфера, 200 μM NADP⁺ кофактора и 100 μM естрадиола као контроле и одређен број различитих испитиваних једињења у 100 μM концентрацији (Табела 5 и AKR-22 из Табеле 4), сви лиганди су

растворени у етанолу. Протеин концентрације 1,717 mg/ml је додаван у три различите запремине: 30; 15 и 7,5 μ l, које одговарају концентрацијама 0,2; 0,1 и 0,05 mg/ml.

Процент инхибиције активности AKR1C3 је рачунат на основу вредности нагиба праве настале због промене концентрације редуковане форме кофактора за првих 10 минута тока реакције употребом линеарне регресије GraphPad Prism верзија 6.01 (GraphPad Software, Сан Дијего, Калифорнија, САД, www.graphpad.com). Да би се израчунао проценат инхибиције, прво је рачунат проценат активности, тако да је вредност нагиба за PQ представљала 100% активност и пропорцијом су израчунати проценти активности за друга тестирана једињења на основу њихових вредности нагиба. Дакле, проценат инхибиције је рачунат као разлика 100% активности и добијеног процента активности за дато једињење. Коефицијент варијабилности (CV) је рачунат као средња вредност нагиба подељена стандардном девијацијом и помножено са 100.

8.11.3. Кинетички параметри

Ензимска кинетика је описана Михаелис-Ментеновом једначином из које су рачунати параметри K_m и V_{max} употребом формуле: $V_0 = (V_{max}[S])/(K_m+[S])$. Вредности за све кинетичке параметре су израчунате преко програма GraphPad Prism, верзија 6.01. K_m је добијен уклапањем („фитовањем“) криве зависности ензимске активности (ЕА) наспрам различитих концентрација супстрата. За анализу вредности K_m , варирана је концентрација PQ у опсегу од 0 до 200 μ M (0; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 и 200 μ M). Ензимска активност (ЕА) је израчунавана преко формуле: $EA = (A_0 - A_{10}) / 10_{min} / 3,37124$, у којој број 3,37124 представља производ екстинкционог коефицијента за кофактор NADPH ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и дужине пута $l = 0,542 \text{ cm}$, а A_0 и A_{10} представљају вредности апсорбанци у 0 и 10. минути. Није рачуната специфична ензимска активност јер узорак представља пречишћен протеин и из тог разлога очекује се да је сва детектована активност настала само због активности пречишћеног протеина.

За сва мерења инхибиције, протеин је са кофактором и инхибитором прединкубиран 15 минута на 37°C. Непосредно пре мерења је додаван супстрат PQ.

K_i је рачунат цртањем графика ензимске активности настале у поменутом опсегу концентрација супстрата без и у присуству различитих концентрација инхибитора, графици су цртани и кинетички параметри рачунати употребом програма

GraphPad Prism, верзија 6.01. Врста инхибиције је одређена најбољим уклапањем положаја крива са добијеним тачкама на графику. Уклапањем криве и тачака показало се да се модел расподеле најбоље уклапа у модел за некопетитивну инхибицију. Вредност K_i за некопетитивну инхибицију је добијена рачунањем преко формуле: $V_0 = V_{\max}[S]/(K_m + \alpha'[S])$, где је $\alpha' = 1 + [I]/K'_i$, а одатле се рачуна $K'_i = [I]/(\alpha' - 1)$. Концентрација инхибитора је варирана од 0 до 25 mM.

IC_{50} . За одређена једињења која су показала добар проценат инхибиције је рачуната IC_{50} (*енгл.* inhibitory concentration, IC) вредност. Одређена једињења (инхибитори) су тестирана у различитим концентрацијама од 0.1 nM до 500 μ M (1,5; 3,12; 6,25; 1,5; 25; 50; 100; 200 и 500 μ M) у 2% DMSO раствору, при константној концентрацији PQ која је била једнаке вредност K_m , 0,39 μ M. Вредности IC_{50} су рачунате уклапањем („фитовањем“) података из првих 12 минута инхибиције на криву која се описује као четворо-параметарна логистичка сигмоидална крива одговора зависног од дозе (*енгл.* four-parameter logistic sigmoidal dose-response curve) употребом GraphPad Prism верзија 6.01.

8.12. Кристализација AKR1C3 протеина

Припрема протеина за кристализацију обухвата исте или сличне кораке у односу на протоколе који су наведени на претходним странама, са малим разликама, које ће у наставку текста бити наведене.

Индукција и експресија протеина је иста осим што се у циљу добијања што више протеина, повећава запремина културе у којој се гаје трансформисане бактерије. Дакле у случају AKR1C3 припреманог за кристализацију, преконоћна култура је разблажена у 16 x 130 ml, што је на крају представљало запремину културе од 2080 ml. После индукције, експресије и центрифугирања, талог је ресуспендован у 35 ml пуфера и замрзнут на -80°C . Кораци који обухватају пречишћавање протеина су исти, до самог краја рада на гел-филтрационој колони. После завршене колоне и проверене концентрације протеина у узорак је у одређеним случајевима пре, а у другим после концентровања додаван кофактор NADP^+ у коначној концентрацији 1,2 mM. Део експеримената је урађен са инхибитором који је додат кад и кофактор у концентрацији 0,4 mM, а део експеримената је рађен када је инхибитор додат непосредно пре поставке протеина за кристализацију у методи кокристализације у 5 mM концентрацији. Коначна концентрација протеина је у експериментима била од 24 до 37 mg/ml. Све је аликвотирано у по 50 μ l и стављено на -80°C .

8.12.1. Поставка кристализације ручном методом

Протокол за кристализацију је модификован у односу на публиковани (Zhao et al., 2015). Коришћена је метода висеће капи са евапорацијом (Слика 33/а, налази се у оквиру увода). Постављена су 24 различита услова за раст кристала у плочи са 24 бунара. Сваки бунар у себи је садржао 0,5 ml смеше:

- поли-етилен гликол (*енгл.* PEG; Sigma P3640, молекуларна тежина 3015-3685), чија концентрација у бунарима је варирана од 20 до 25% (од А до F на плочи),
- NaCl, финална концентрација 0,14 M,
- дестилована вода додата по потреби до запремине од 0,5 ml,
- пуфери су додати у финалној концентрацији од 50 mM, међутим поред PEG-а и pH вредност пуфера је варирана (MES pH 6 и pH 6,44, Tris pH 7 и pH 8), од 1 до 4 на плочи.

Садржај за сваки бунар је прво направљен у тубици и онда пренет у бунар. На руб свакаког бунара је нанет вазелин и затим је сваки бунар затваран са покровним стаклом на ком је претходно измешан 1 μ l протеина и 1 μ l смеше из бунара. Тако припремљена плоча је постављена на стабилно место са приближно константном температуром.

8.12.2. Поставка кристализације употребом робота

У лабораторији у оквиру Института за органску хемију и биохемију у Прагу (Чешка) је рађено на протеину који је донет из Србије. Протеин је припремљен како је описао у претходном поглављу и спојен са кофактором и инхибитором. На основу корака оптимизације који су предходили установљено је да чистог протеина има у великим количинама и у испирању са мањом концентрацијом имидазола, тако да је у случајевима припреме протеина за кристализацију узорак подељен у две групе, узорак протеина после испирања са мањом концентрацијом (испирање 1) и испирање са већом концентрацијом имидазола (елуције). Оба узорка су пуштена кроз гел-филтрациону колону (Sephadex 200 pg, loop 5 ml) на FPLC-у, да би се уклониле потенцијалне агрегације протеина, затим је концентрован, и поново у истим запреминама додат кофактор и инхибитор, потом је аликвотиран и стављен на -80°C . Коначна концентрација протеина је била 31 mg/ml. Кристализација је рађена у три различита кристалографска сета: JCSG+ Suite, PEG (Qiagen) и Morpheus (Molecular Dimensions Ltd., Уједињено Краљевство), методом седеће капи (*енгл.* sitting-drop vapor-diffusion method) (Сл. 33, Б) и на 291 K. Рађено је на плитким плочама са 96 бунара са по 3 подбунара (96-well sitting drop MRC 3-well plates, Jena Bioscience, Немачка) (Сл. 35 поглавље 6.4.). Кристалографски сетови су нанети на плоче помоћу Gryphon-a (Art

Robbins Instruments, САД), а протеин помоћу Oryx8 (Douglas Instruments, UK). Коначна запремина смеше протеина и садржаја из бунара је 300 μl у размери 1:1, 2:1 и 1:2 (свака размера у посебан подбунар), у односу на 30 μl смеше у бунару. Процес кристализације је праћен аутоматским системом за праћење MinstrelTM DT UV са Gallery DT хотелом за плоче (Rigaku, Јапан) and by Olympus SZX10 оптичким микроскопом (Olympus, Јапан).

8.12.3. Динамичко расипање светлости

Динамичко расипање светлости (*енгл.* dynamic light scattering, DLS) представља физичку технику која се користи за одређивање дистрибуције величине малих партикула у раствору (B. J. Verne & Pecora, 2000). DLS се показао као добра техника за процењивање хомогености протеинског узорка, што представља битну ставку у карактерисању и припремању узорка протеина за кристализацију (Proteau, Shi, & Cygler, 2010). Узорци протеина који су пречишћени, концентровани и припремљени за кристализацију су тестирани на DLS-у, употребом RiNA Laser-Spectroscater 201 (RiNA, Берлин, Немачка). У специјалне кивете је стављено по 10 μl узорка и стављено на снимање 30x 30 секунди. Снимљена су оба узорка, и узорак од првог испирања (у дневнику - wash 1) и узорак од елуције.

8.12.4. *In situ* протеолиза у кристализацији

Део протеина који се постављао за кристализацију је био третиран и са тромбин протеазом. Секвенца између хистидинског обележивача на N-терминалном крају и самог протеина поседује рестрикционо место за тромбин. Метода *in situ* протеолизе је искоришћена ради отклањања обележивача као потенцијалног ометача кристализације. Тромбин (Bovine thrombin, Sigma Aldrich T4648-1KU, САД) је растворен у води у концентрацији од 2,7 mg/mL и 8 μL овог раствора је додато у раствор са AKR1C3 (200 μL) непосредно пре кристализације. Коначна концентрација тромбина у протеинском узорку који је коришћен за кристализацију је износила 0,1 mg/mL и моларни однос AKR1C3 према тромбину је био 280:1 (Plavša et al., 2018).

8.12.5. N-терминално секвенцирање протеина

N-терминална секвенца протеина је рађена Едмановом деградацијом, употребом Procise Protein Sequencing System (494 cLC Protein Sequencer, Applied Biosystems, САД). У сваком циклусу секвенцирања, N-терминални крај AKR1C3 протеина је третиран са

фенилизотиоцијанатом и резултујући стабилни фенилтиохидадон аминокиселински дериват је анализиран обрнуто фазним течном хроматографијом високог притиска (*енгл.* reversed-phase HPLC).

8.12.6. Кокристализација AKR1C3 протеина са инхибиторима

Након претходне оптимизације кристализације, рађена је кокристализација протеина AKR1C3 са одабраним инхибиторима. После никл колоне је узорак подељен на протеин испран са нижом и вишом концентарцијом имидазола (елуати). За потребе овог експериментат је рађено са протеином после испирања са нижом концентрацијом имидазола, а не са елуатима. Протеин је припремљен по већ описаном протоколу, са коначном концентрацијом 37 - 48 mg/ml, након коцентровања је додат кофактор NADP⁺ у концентрацији од 0,1 mM. Смеша протеина и кофактора је затим подељена у различите тубе, а у сваку тубу је додат један од инхибитора са којим се ради кокристализација у финалној концентрацији у туби 5 mM. Смеше су остављене тако на леду да се инкубирају у периоду од 30 минута. Након тога је у сваку тубу непосредно пре наношења на плочу додат тромбин (концентрација штока 2,7 mg/ml) у истом односу као и у оптимизацији дакле 280:1 (AKR1C3:тромбин). Садржај сваке тубе је посебно нанет на плочу са Morpheus условима. У зависности од потреба неки од услова у одређеним бунарима су поновљени у мануелној поставци кристализације протеина.

8.12.7. Сакупљање података дифракције и обрада

Кристали који су расли у Morpheus условима су сакупљани без потребе за додатним криопротектантима, док су кристали који су расли у PEG Suite криопротектовани додавањем мале запремине глицерола директно у кап са кристалом непосредно пре сакупљања (пецања). Подаци дифракције X зрака су сакупљени на 100 K на лабораторијском дифрактометру (MicroMaxTM-007 HF Микрофокусни X-зрачни генератор са VariMaxTM VHF Arc) SEC Конфокални Оптички Систем (Rigaku, Јапан), AFC11 Partial- γ 4-axis Гониометар (Rigaku, Јапан), PILATUS 300K детектор (Dectris, Ltd., Швајцарска) и Cryostream 800 систем за крио-хлађење (Oxford Cryosystems Ltd., UK). Подаци су такође сакупљани и на синхротрону MX 14.1 у оквиру BESSY II (Берлин, Немачка) (Gerlach, Mueller, & Weiss, 2016). Дифракциони подаци су процесовани употребом програма XDS (Kabsch, 2010).

8.12.8. Решавање структуре на основу дифракционих података

Структура хуманог AKR1C3 се решавала методом молекуларне замене (*енгл.* molecular replacement) са програмом MOLREP (Vagin & Teplyaev, 2000) користећи структуру хуманог AKR1C3 (PDB шифра 1ZQ5) као модел (Qiu et al., 2007). Иницијално утачњавање модела је рађено употребом REFMAC5 (Murshudov, Vagin, & Dodson, 1997) из CCP4 Suite (Collaborative Computational Project, 1994).

8.13. In silico

Аминокиселинске секвенце AKR1C и одређених ензима 17 β -HSD фамилије су преузете из National Center for Biotechnology Information (NCBI) базе података (Прилог 1 и 2) (“National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet],” 1988).

За анализу и визуелизацију секвенци коришћени су алати и софтвери: JalView (Waterhouse, Procter, Martin, Clamp, & Barton, 2009), Clustal Omega (Goujon et al., 2010; Sievers et al., 2011), SwissPDB viewer (Guex & Peitsch, 1997), FinchTV – Geospiza, Inc. (“FinchTV”), BLAST - Basic Local Alignment Tool (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990).

8.13.1. Припрема структурних координата рецептора

Координате решених кристалних структура протеина AKR1C3 су преузете из Протеинске базе података (PDB: www.rcsb.org) (Berman et al., 2000). За AKR1C3 у комплексу са андростенедионом је узет PDB унос 1XF0, а у комплексу са стероидним инхибитором EM12404 је узет унос 1ZQ5. Координате лиганда и молекула воде су уклоњене ручно из сваког уноса преко Notepad⁺⁺ програма за обраду текста. Атоми водоника и парцијална наелектрисања (*Gasteiger*) су дата атомима рецептора употребом *receptor.c* скрипте у оквиру програма VEGA ZZ 3.0.5.12 (Pedretti, Villa, & Vistoli, 2004). Након тога координате рецептора су сачуване у PDBQT формату за потребе симулације усидравања.

8.13.2. Припрема структурних координата лиганда

Координате лиганда које су извучене из претходно наведених PDB уноса су отворене, проверене у програму Avogadro 1.1.1 (Hanwell M.D. Lonie D.C., Vandermeersch, T., Zurek E., Hutchison, G., 2012). Део синтетисаних једињења је имао решену кристалну структуру (од AKR-1 до AKR-8), а преостала једињења су прављена од најјеличнијих који имају кристалну структуру. Хемијска структура сваког једињења

је проверена у Avogadro програму, додати су водоници и оптимизирана је геометрија структуре (*Force field*: MMFF94; *Steps per Update*: 4; Steepest Descent minimization), након тога су структуре сачуване у PDB формату. Позиција неполарних атома водоника је игнорисана и *Gasteiger* парцијала наелектрисања су додата атомима лиганда употребом *ligand.c* скрипте програма VEGA ZZ 3.0.5.12 и добијене структурне координате су затим сачуване у PDBQT формату.

8.13.3. Формирање мапа решетки потенцијалне енергије везивања

Мапе решетки (*енгл.* grid map) су израчунаване и формиране за сваки рецептор употребом AutoGrid 4 програма, на основу координата кристала протеина. Формиране су две групе решетки, једна која обухвата цео протеин, омогућавајући непристрасно усидравање и једна која обухвата активно место које се налази у центру решетке са димензијама 50x50x50. Коришћен је grid spacing у вредности од 0,375 Å. Мапе су израчунате за сваки тип атома у лиганду, заједно са електростатичком мапом и мапом доприноса раствора у енергији везивања уз употребу стандардне диелектричне вредности од -0,1465.

8.13.4. Симулације усидравања

Симулација молекуларног усидравања је рађена употребом Ламарковог генеричког алгоритма. Максималан број процена енергија је постављен на *short* (2500000), а за број јединки у GA популацији је одређен број од 150. Укупно је извршено 10 хибридних GA-LS циклуса за сваку симулацију и толики број потенцијалних положаја и оријентација је добијен по циклусу. Након извршене симулације резултати се добијају у *dlg* формату који се конвертује у *pdb* употребом скрипте *Dlg to pdb multimodel.c* VEGA програма. Резултати су анализирани у PyMOL програму (“The PyMOL Molecular Graphic System”) и упоређени са кристалним структурама протеин – лиганд комплекса које су преузете са PDB. AutoDock и AutoGrid израчунавања су урађена употребом сервера у оквиру Националног Биомедицинског Рачунарског Ресурса (*енгл.* The National Biomedical Computational Resource) (<http://nbcrc-222.ucsd.edu/opal2>) и помоћу PyRx виртуелног софтвера (Dallakyan & Olson, 2015). Контролне симулације усидравања су урађене употребом лиганда који се налази у кристалној структури протеина. На основу ових контролних симулација предвиђена енергија за везивање треба да буде $\leq -9,47$ kcal/mol, да би представљала индикатор јаког везивања.

9. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

9.1. Оптимизација и анализа раста, индукције, експресије и пречишћавање протеина

9.1.1. Анализа коришћених плаزمида

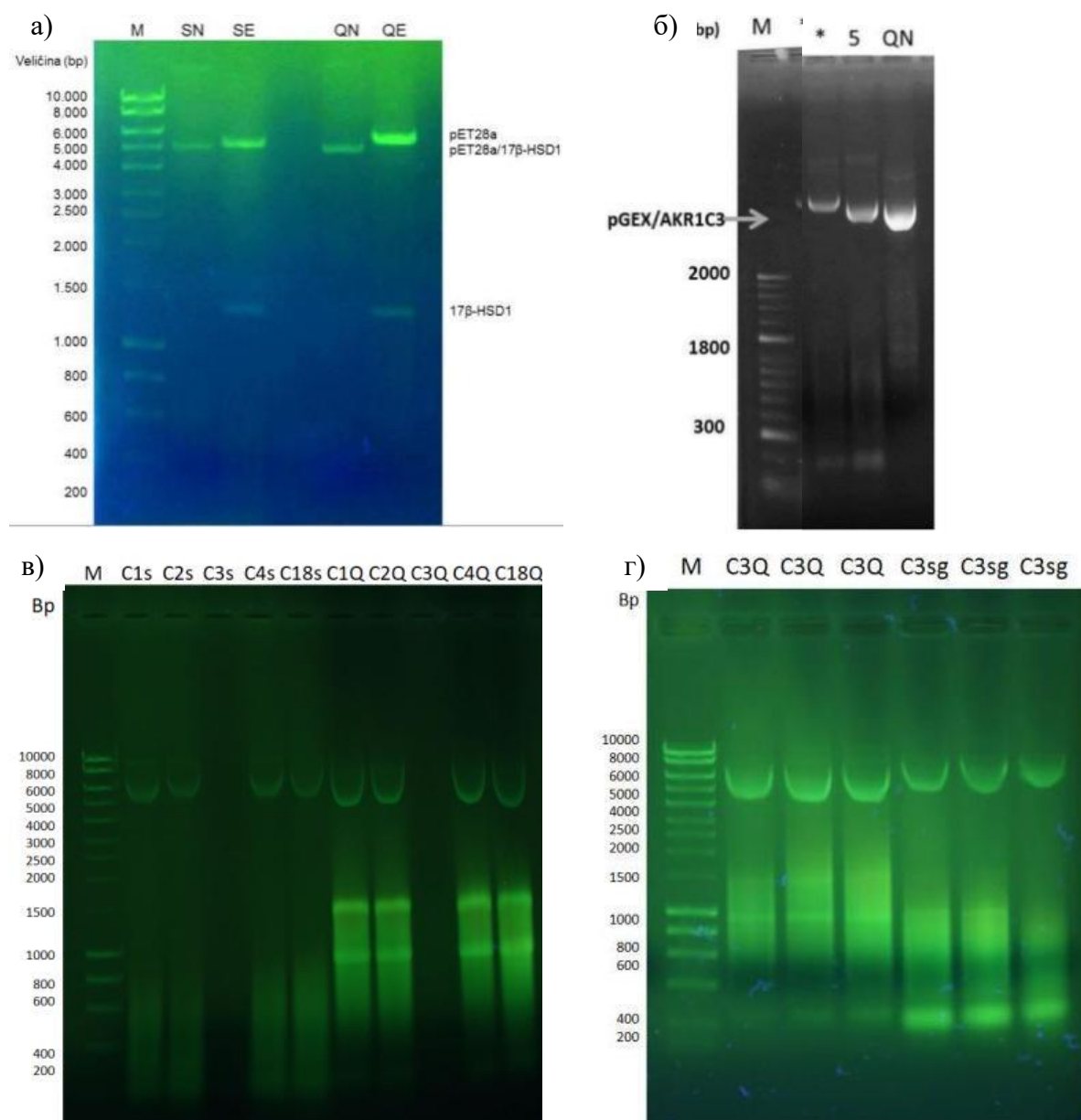
За потребе анализе и експерименталног рада сви добијени плазмиди су умножени трансформацијом *E. coli* соја DH5 α , након чега је рађен минипреп. Плазмиди су квалитативно и квантитативно анализирани употребом 1% агарозне електрофорезе. Део резултата за сваки плазмид је представљен на Слици 41.

pET28a(+)/17 β -HSD1. Иако је плазмид добијен са Тајвана, оригинал плазмид је од професора др Вихка (Dr. Vihko, Biocenter Oulu and Research Center for Molecular Endocrinology, Oulu University, Финска). Секвенца протеина заједно са узводном секвенцом од 6 хистидина и рестрикционим местом за тромбин је клонирана унутар рестрикционог места *EcoRI*, величина плаزمид са инсертом је око 5000 bp (Chang, Wang, Lin, Chuang, & Hwang, 2010).

Провера плазмиде и присуство инсерта у плазмиду је потврђено агарозном електрофорезом после дигестије плазмиде са *EcoRI* рестрикционим ензимом (Сл. 41/а). Присуство плазмиде је потврђено изолацијом са обе методе (и силика гелом и Qiagen колонама) без дигестије, што се види у виду траке величине око 5000 bp у другој и петој колони на гелу. Трећа и шеста колона приказују узорак након дигестије, види се присуство две траке једна између 5000 и 6000 bp, што је плазмид без инсерта (5369 bp), док је друга трака величине око 1300 bp колико приближно и износи величина инсерта. Разлог што на гелу плазмид без инсерта изгледа мало већи од плазмиде са инсертом је у физичкој структури плазмиде, плазмид без инсерта је због дигестије линеаран, док је са инсертом у суперспирализованој форми и као такав на гелу заузима положај мало испод линеарног који приказује тачан положај плазмиде на гелу у односу на његову величину (Tirabassi R.). У сваком случају траке плазмиде изолованих употребом колоне су дебље и указују на већи принос плазмиде у односу на изолацију са силика гелом. Међутим, јачина сигнала која је присутна за узорке изоловане силиком указује да је и ова метода адекватна за изолацију довољне количине плазмиде. Ово је битно јер је метода изолације са силика гелом приступачнија и подложнија оптимизацијама.

pGEX-2T/AKR1C3. Секвенца протеина AKR1C3 је дужине 972 bp и убачена је у оквиру вишеструког места за клонирање између места препознавања *BamHI* (G[^]GATCC) и *KpnI* (GGTAC[^]C). Од стране сарадника од којих је плазмид и конструкт

добијен (Институт за експерименталну генетику, Минхен, Немачка) је сугерисано да је хистидин на 5. позицији замењен са кодоном за глутамин (CAG). Ген за глутатион-S-трансферазу (GST) се налази испред секвенце протеина у истом оквиру читања (Сл. 41/б). Цео плазмид са инсертом је око 5900 bp величине.



Слика 41. Анализа плаزمида употребом 1% агарозне електрофорезе. S – силика гел, Q – Qiagen колоне, M – маркер. а) pET28a/17β-HSD1: без и са дигестијом са *EcoRI*; N – несечени и E – сечени узорци са *EcoRI*; б) pGEX-2T/AKR1C3: * – плазмид pET28a/17β-HSD1, 5 – плазмид pGEX-2T/AKR1C3, пречишћен са силика гелом, QN – исто као и 5 али пречишћен са Qiagen колоном; в) pET28b(+)/AKR1C3: Cx – плазмид са геном за изоформу чији број је написан. C18 није коришћен за ову тезу; г) pET28b(+)/AKR1C3.

И у овом случају је потврђено присуство плазмида изолацијом са обе методе, уз јачи сигнал у узорку изолованом са колоном. Као маркер је коришћен и плазмид

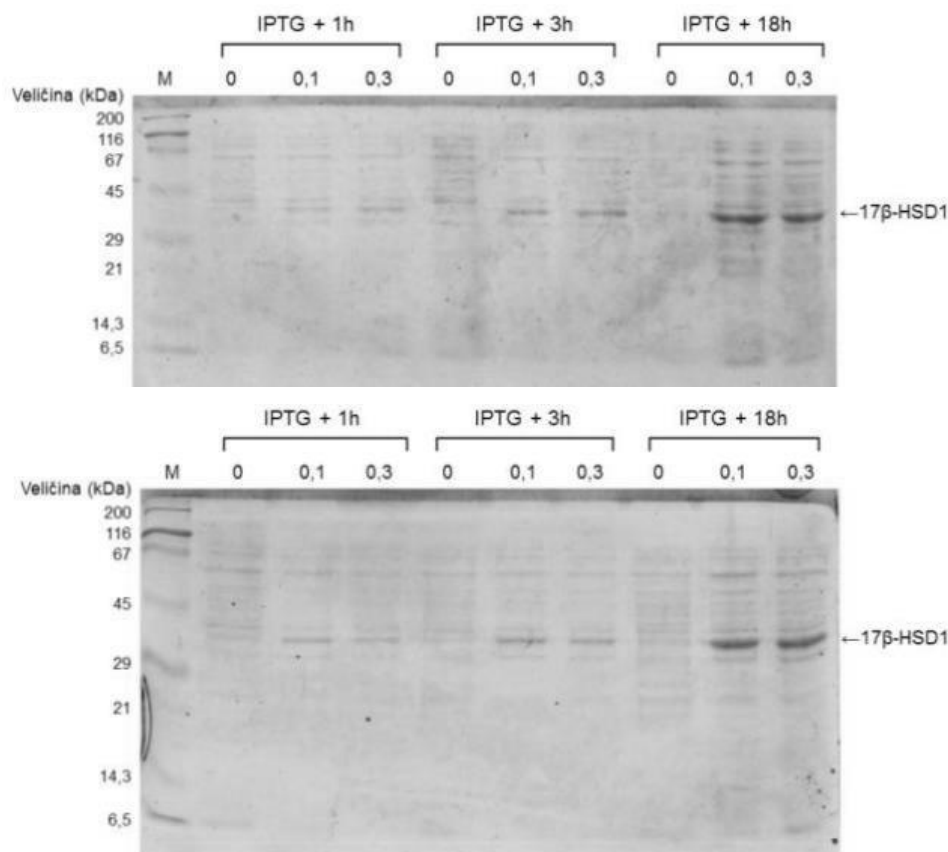
pET28a(+)/17 β -HSD1. У односу на 17 β -HSD1 траке за изоформу С3 имају јачи сигнал који је како је и очекивано, најјачи у случају изолације употребом колоне. Поред главних трака у колонама су видљиве и друге мање траке и размази који се могу објаснити чињеницом да није коришћена РНаза, па су те траке врло могуће РНК молекули. Изглед траке је у последње две колоне измењен, тако да нису равне линије већ полукружне, што може да буде у случајевима велике количине ДНК молекула.

pET28b(+)/AKR1C1, -C2, -C3, -C4. (Сл. 41/в). Присуство плазида је потврђено у свим колонама, дакле у обе методе и за сваку изоформу, осим за AKR1C3, за коју је накнадно рађен минипреп (Сл. 41/г). Флуоресценција која се налази у доњем делу гела, представља РНК молекуле као и деградирану геносмску ДНК која није елиминисана приликом пречишћавања.

9.1.2. *Протеин 17 β HSD1*

Протеин 17 β HSD1 је у целој тези коришћен за потенцијално поређење са по функцији најближим AKR1C протеинима. Његово пречишћавање и употреба је коришћена и анализирана докле је било могуће, обзиром да на крају нису добијене адекватне количине пречишћеног протеина.

Иако је публикован рад (Chang et al., 2010) који је користио наведени плазмид, услови у лабораторијма нису исти тако да је морала да се ради оптимизација. Први кораци у раду са протеином су обухватили истраживање најбољег односа густине бактерија, концентрације IPTG и температуре за време експресије протеина. Део резултата је представљен мастер радом Глушчевић Мартине (Glušćević, 2014). У литератури се наводи неколико оптичких густина бактеријских култура које су оптималне за индукцију експресије протеина и то су најчешће 0,4 - 0,6 и 0,8 мерено на 595 nm (интернет страна: “E. coli Growth and Induction with IPTG”; приручник: “pET System Manual”). У раду је индукована бактеријска култура у опсегу оптичке густине од 0,6 – 1 и коришћена концентрација IPTG је била 0,25 mM, док је температура експресије била 13°C. Прве анализе су обухватиле индукцију на 0,4; 0,6 и 0,8 оптичкој густини са концентрацијама 0; 0,1 и 0,3 mM IPTG анализирани после једног, три и 18 сати од индукције. Резултати су визуелизовани анализом узорака на SDS-PAGE гелу (Сл. 42).

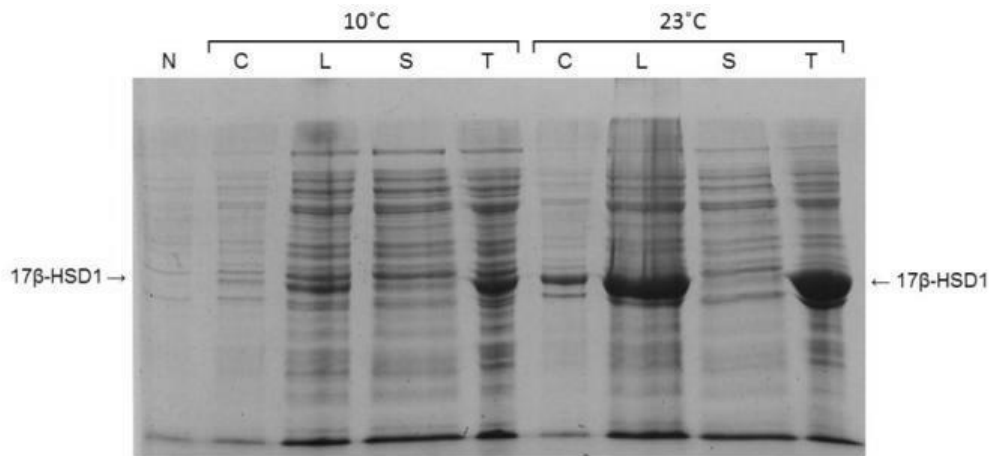


Слика 42. Узорци протеина бактерија након 1, 3 и 18 сати од индукције на 0,6 (горњи гел) и 0,8 (доњи гел) оптичке густине бактерија. М – маркер; 0; 0,1 и 0,3 – концентрације IPTG изражене у mM. Стрелицом десно од гела је приказан положај експресованог протеина.

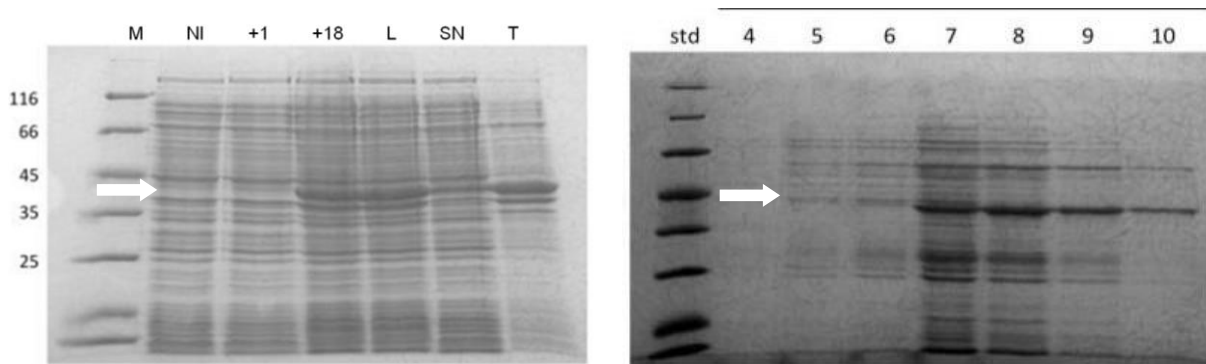
На основу гелова закључено је да ће индукција да се ради у трајању од 18 сати, на оптичкој густини од 0,6, међутим, решено је да се још варира концентрација IPTG. Затим је анализиран ефекат температуре анализом лизираних бактеријских ћелија који су расли на различитим температурама, односно анализом протеина у узорцима лизата, супернатанта и талоба тих бактерија (Сл. 43).

Прегледом гела на Слици 43 се види упадљива разлика у количини 17βHSD1 протеина у талогу између узорка где је протеин експресован на 10 и 23°C. Знатно више има протеина у талогу на 23°C, и самим тим мање у супернатанту на 23°C, што указује да је протеин експресован у тим условима знатно мање растворљив и као такав формира инклузиона тела и агрегате.

У сарадњи са колабораторима у Љубљани, покушана је нова трансформација и индукција у боље контролисаним условима и то све у покушају да се добије што више раствореног протеина, дакле да га буде више у супернатанту (Сл. 44).



Слика 43. Приказ протеина у узорцима који су индуковани са 0,1 mM IPTG, при 0,6 оптичкој густини, индуковани 18 сати и све то при температурама индукције од 10°C и 23°C. N (NI) – неиндуковани узорак, C – нелизирани ћелије, L – укупан лизат, S – супернатант лизираних ћелија, T – талог лизираних ћелија. Стрелицама са стране гела приказан положај инукцијом експресованог протеина.



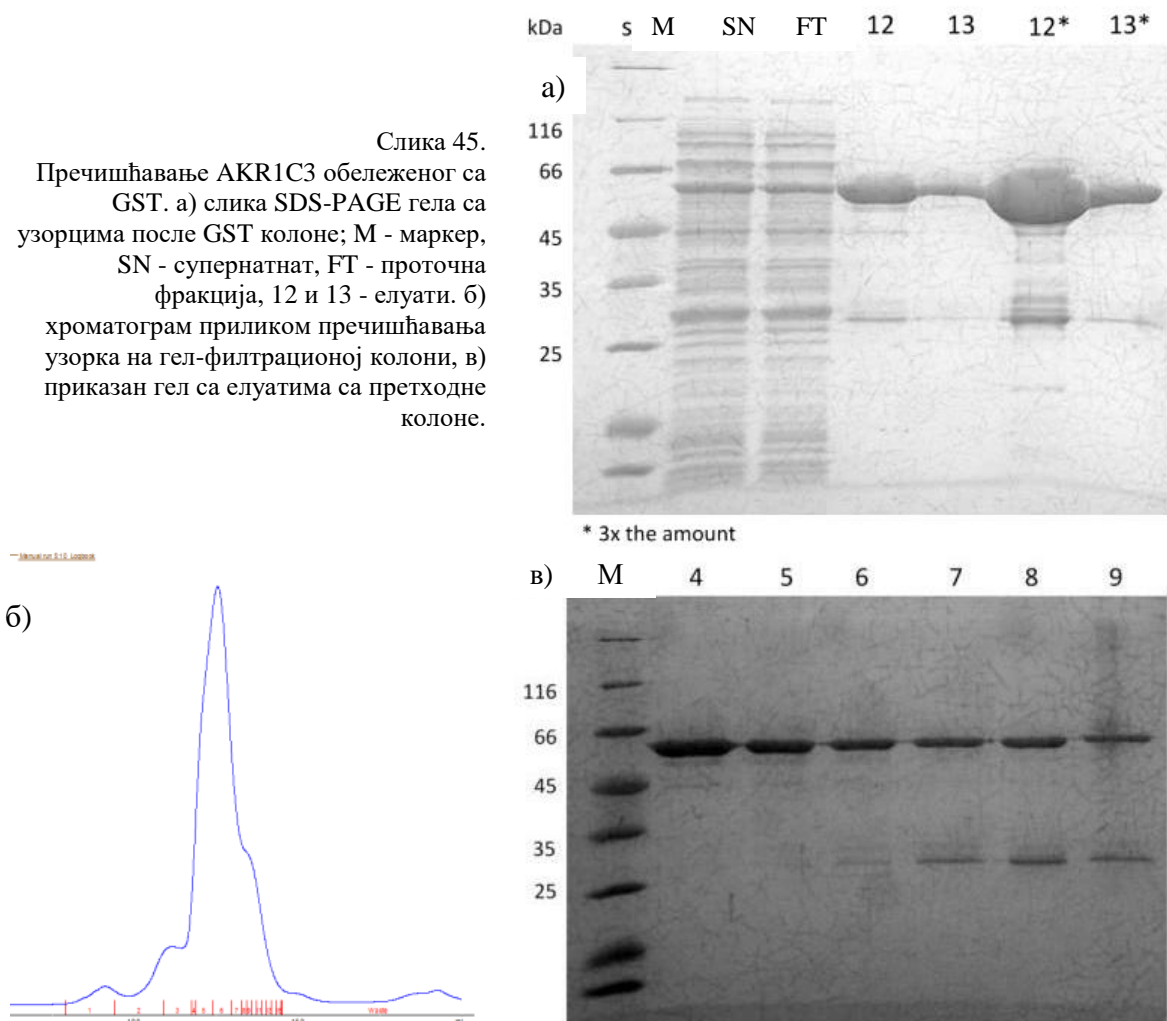
Слика 44. Протеин 17βHSD1 у различитим фазама индукције и пречишћавања приказано на SDS-PAGE гелу. M - маркер, NI - неиндукована култура, +1, +18 – сати након индукције, L – лизат, SN – супернатант, T – талог, 4-10 – елути са никл колоне.

Разматрајући гелове са Сlike 44, на левом гелу се види јача трака након 18 сати од индукције на положају између маркера од 35 и 45 kDa, што одговара очекиваном положају протеина 17βHSD1 (39,2 kDa). Међутим, на основу последња два бунара на левом гелу, види се да је главнина протеина присутна у нерастворљивом облику, односно у талогу. Даље пречишћавање је настављено са супернатантом на никл колони, а резултати пречишћавања могу да се виде на десном гелу, трака која представља протеин 17βHSD1 је присутна, међутим узорак за ту количину протеина није довољно чист.

Како се до веће количине чистог и растворљивог протеина 17βHSD1 тешко долазило у односу на присуство протеина у талогу, одустало се од даљег рада са овим протеином.

9.1.3. AKR1C3 обележен са GST

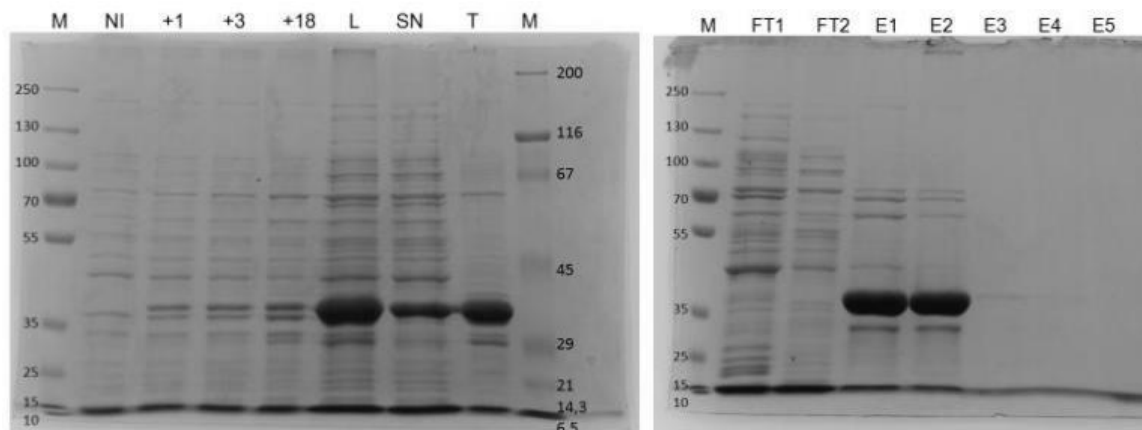
Оптимизација раста, индукције, експресије и делимичног пречишћавања AKR1C3+GST је објављено у виду мастер рада Китановић Невене (Kitanović, 2015). Међутим, накнадно је у колаборацији са лабораторијом у Љубљани, настављено са пречишћавањем употребом GST и гел-филтрационе колоне (Сл. 45).



На приказима Сlike 45 се види да после GST колоне узорак и није баш чист (GST+AKR1C3=66 kDa), док је после гел-филтрационе веома чист, са појавом још једне траке ниже која представља сам GST (26 kDa) који се одвојио од главног протеина AKR1C3. Констатовано је да је протеин довољно чист да се може наставити његова употреба у ензимским есејима. Пре самих есеја протеин је концентрован и аликвотиран. Са овим протеином су рађене реакције оксидације у оквиру ензимских есеја.

9.1.4. AKR1C3 обележени хекса-хистидином на N-терминалном крају

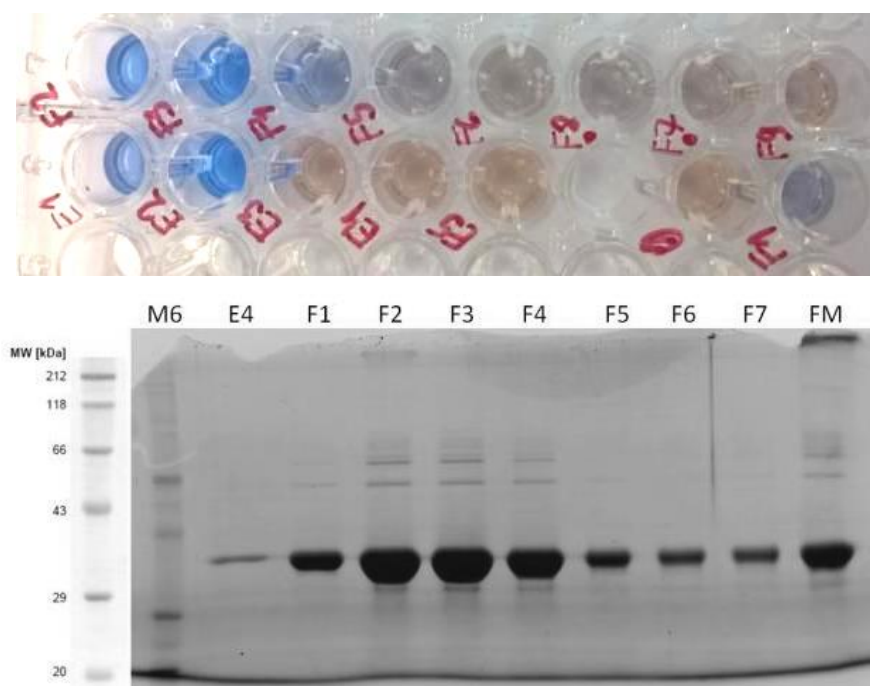
AKR1C3. За разлику од претходна два протеина, за пречишћавање протеина алдо-кето редуктаза које су обележене хистидином није било потребе за великим оптимизацијама, процедура је оптимизована уз употребу рада од професора Боунса и колаборатора (University of Birmingham, Уједињено Краљевство) од којих смо и добили плазмиде (Velića, 2010; Velića et al., 2009) (Сл. 46). Оптичка густина бактеријске културе је 0,6, концентрација IPTG 0,5 mM, раст на 37°C, а експресија на 21°C.



Слика 46. Приказ AKR1C3 протеина (37 kDa) кроз различите фазе од неиндуковане бактеријске културе до елуата после никл колоне. M – маркер, NI – неиндуковани узорак, +1, 3, 18- сати после индукције, L – лизат, SN – супернатант, T – талог, FT1 – проточна фракција, испирање колоне, FT2 – проточна фракција, испирање колоне са малом концентрацијом имидазола, E1-E5 – елуати.

Прегледом узорака кроз различите фазе на гелу, види се да је највећа експресија протеина након 18 сати и да та иста трака недостаје у узорку неиндуковане културе. Узорак лизата представља укупну количину експресованог протеина, а следеће два узорка, односно супернатант и талог, приказују у ком делу лизата има колико протеина. Како што може да се види, доста протеина се налази у талогу дакле у нерастворљивој фази у виду инклузионих тела, међутим даљим пречишћавањем се види да и то протеина што има у супернатанту је довољно за даљи рад. Протеина нема у проточним фракцијама и скоро цео излази из никл колоне у прва два елуата (E1 и E2 на гелу). У елуатима су присутне и друге траке поред траке која потиче од протеина AKR1C3, међутим њихово присуство је скоро занемарљиво у односу на дебљину траке од AKR1C3. Након никл колоне пречишћавање протеина је настављено на гел-филтрационој колони, која осим што представља додатан корак у пречишћавању служи и за замену пуфера у ком се протеин налази, односно путем те колоне отклања се имидазол који је присутан уз протеин након никл колоне у замену за коначан пуфер.

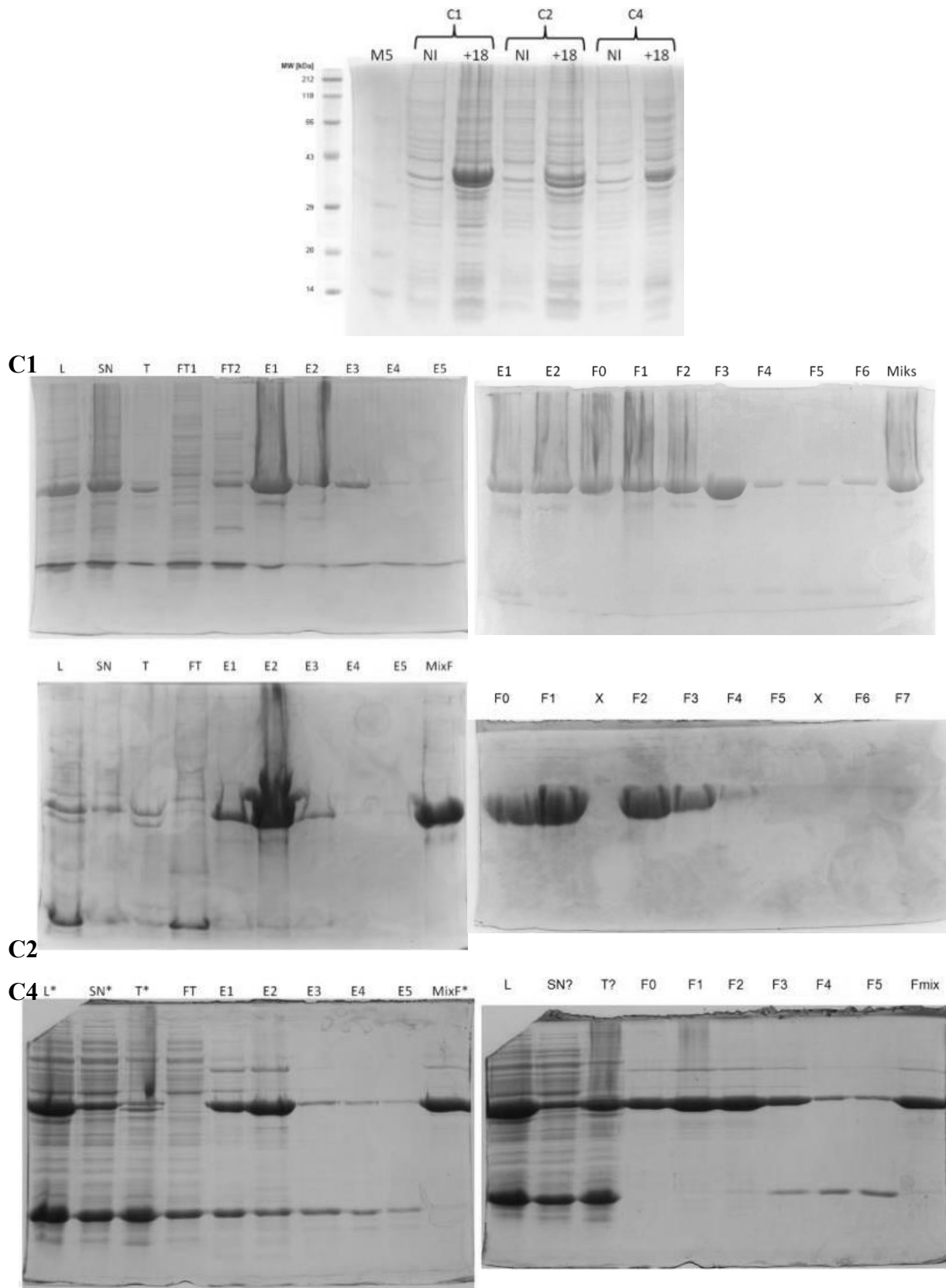
Елуати који имају протеин су спојени заједно и нанети на колону. Узорак се у гел-филтрационој колони помера помоћу гравитационе силе и хидростатичког притиска и због тога на крају протеин изађе разблаженији него пре колоне (Сл. 47).



Слика 47. Приказ протеина AKR1C3 у различитим фракцијама након гел-филтрационе колоне; горе – бојење сваке фракције и елуата са Брадфордским реагенсом, доле – SDS-PAGE провера присуства и чистоће протеина у различитим фракцијама. М6-маркер, Е4 – елуат 4, F1-F7 – фракције, FM – спојене фракције од 1 до 4 за даље потребе експеримента.

Након бојења са Брадфордским реагенсом (Сл. 47) решено је да се споје прве четири фракције (F1-F4) за даље експерименте за анализу активности протеина. Наравно, могуће је спојити све фракције јер као што слика гела приказује, протеина има и у другим фракцијама, међутим за даље потребе протеин треба да је што концентрованији, па би додатно спајање фракција заправо само додатно разблажило узорак и смањило концентрацију протеина. У накнадним експериментима су коришћене тубе за концентровање протеина уколико протеин не би дошао до концентрације од око 2 mg/ml.

AKR1 C1, C2 и C4. Преостале три изоформе су експресоване и пречишћене сличном процедуром као и изоформа C3. Дакле, при оптичкој густини од 0,6 је додат IPTG у коначној концентрацији од 0,5 mM и експресија је била на 21°C. На Слици 48 су приказане изоформе на гелу у различитим фазама пречишћавања.



Слика 48. Приказ фаза пречишћавања изоформи AKR1C1,2 и 4. Први гел приказује разлике између неиндукованог и индукованог узорка у све три изоформе. На наредним геловима су приказане фазе пречишћавања сваке изоформе посебно и то редом C1, C2 и C4. L – лизат, SN – супернатнат, T – талог, FT – проточна фракција са никл колоне, E1-E5 – елуати, F1-Fx – фракције са гел филтрационе колоне, X – празан бунар.

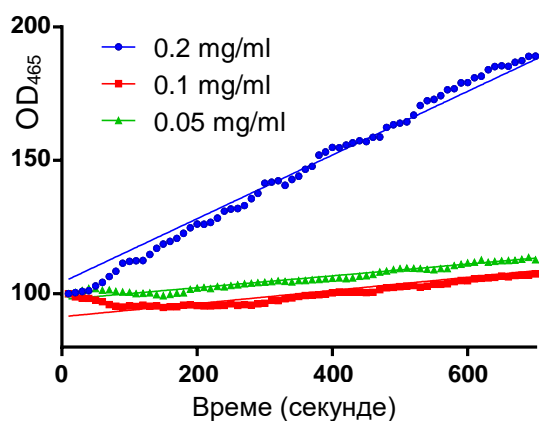
Изоформа C1 је у мањој мери била присутна у талогу него у супернатату у односу на изоформу C3. После никл колоне протеин је изашао у прве три елуције и после следеће колоне на основу промене боје Брадфордског реагенса, сакупљене су прве четири фракције од F0 до F3, које су потом концентроване уз додатак кофактора и/или глицерола. Слично је било и са изоформама C2 и C4.

9.2. Ензимски есеји за AKR1C: оптимизација есеја и тестирање једињења

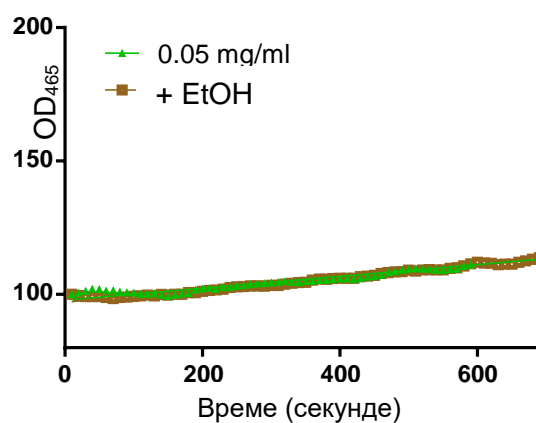
9.2.1. Оптимизација реакције оксидације

Продукција, пречишћавање и испитивање оксидативне активности ензима AKR1C3 (са GST обележивачем) на флуориметру је рађено на Факултету за хемију и хемијску технологију у Љубљани. Есеј је започет у кивети у запремини од 0,3 ml. Реакције оксидације подразумевају оксидацију супстрата, а као последица тога кофактор се редукује из NADP^+ у NADPH и прати се пораст оптичке вредности на 465 nm. Као супстрат у свим реакцијама је коришћен естрадиол (E2).

Први кораци су били истраживање најмање потребне концентрације протеина у есеју коју је могуће користити за детектовање активности. На Слици 49 је приказана промена апсорбанце током времена у случајевима са различитим концентрацијама протеина од највеће (по радовима) па до два и четири пута мање у присуству естрадиола раствореног у етанолу.



Слика 49. Ток реакције оксидације естрадиола у присуству различитих концентрација AKR1C3.



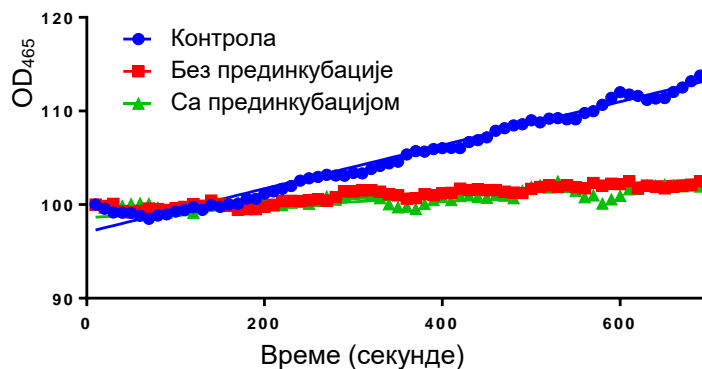
Слика 50. Ток реакције оксидације естрадиола у присуству AKR1C3 и различитих концентрација етанола. +EtOH – реакциона смеша са додатном количином етанола.

Закључено је да је могуће детектовати активност и са најмањом испитиваном концентрацијом протеина, дакле са 0,05 mg/ml и са том концентрацијом су насатављени даљи експерименти.

У овим експериментима сви лиганди су растворени у етанолу. Међутим, поред лиганда који је супстрат за протеин, додају се и испитивана једињења такође растворена у етанолу. Урађена је и проба реакције са повећаном количином етанола у систему и констатовано је да систем ради и у том случају (Сл. 50). Након наведених закључака приступило се тестирању једињења, потенцијалних инхибитора.

9.2.2. *In vitro* анализа ефекта различитих једињења на оксидујућу активност изоформе AKR1C3

Прве реакције за испитивање потенцијалних инхибитора су имале за циљ да установе утицај прединкубације на ефикасност инхибирања активности ензима. Да би се то проверило постављене су две реакције једна без и друга са прединкубацијом и NSN једињењем као потенцијалним инхибитором (Сл. 51).



Слика 51. Графички приказ утицаја прединкубације на инхибиторно дејство једињења NSN на активност AKR1C3.

На графику на Слици 51 се види врло мала разлика између случајева са и без прединкубације и то таква да линија која представља реакцију са прединкубацијом је врло мало испод линије без прединкубације, а што је линија нижа она представља већу инхибицију. Међутим иако је разлика скоро неприметна, литературни извори углавном имају прединкубацију као један од корака у ензимским есејима (Burns et al., 2008), тако да су даљи експерименти рађени са прединкубацијом, као редовним кораком.

Тестирање једињења у оквиру реакција оксидације су представљала прве експерименте за тестирање активности и из тог разлога је прво започето са једињењима која личе по структури на познати инхибитор изоформе С3, односно ибупрофеном, или PQ, а да су при том и доступна. Тестирана су 4 једињења и вредности нагиба криви као и проценат инхибиције је приказан у Табели 6.

Табела 6. Вредности нагиба криве која представља ток реакције оксидације у присуству различитих комерцијалних једињења (100 μ M) и проценат инхибиције оксидативне активности AKR1C3 изоформе на основу првих 10 минута.

Тестирано једињење	Вредност нагиба за:		Инхибиција (%)*
	60'	10'	
Естрадиол	0,05026	0,02323 \pm 8,598e-005	0
pNBA	0,04695	/	/
2NBA	0,03355	0,01385 \pm 0,0001165	40,38 \pm 0,84
AKR-22	0,01916	0,007849 \pm 0,0001061	66,21 \pm 1,35
NSN	0,00492	0,005666 \pm 8,776e-005	75,61 \pm 1,55

10' – вредност нагиба за првих 10 минута \pm коефицијент варијабилности (CV), *вредност нагиба за првих 10 минута E2 су представљали 100% активност протеина, дакле 0% инхибиције, остале вредности су рачунате преко пропорције и затим је израчунат и додат \pm CV.

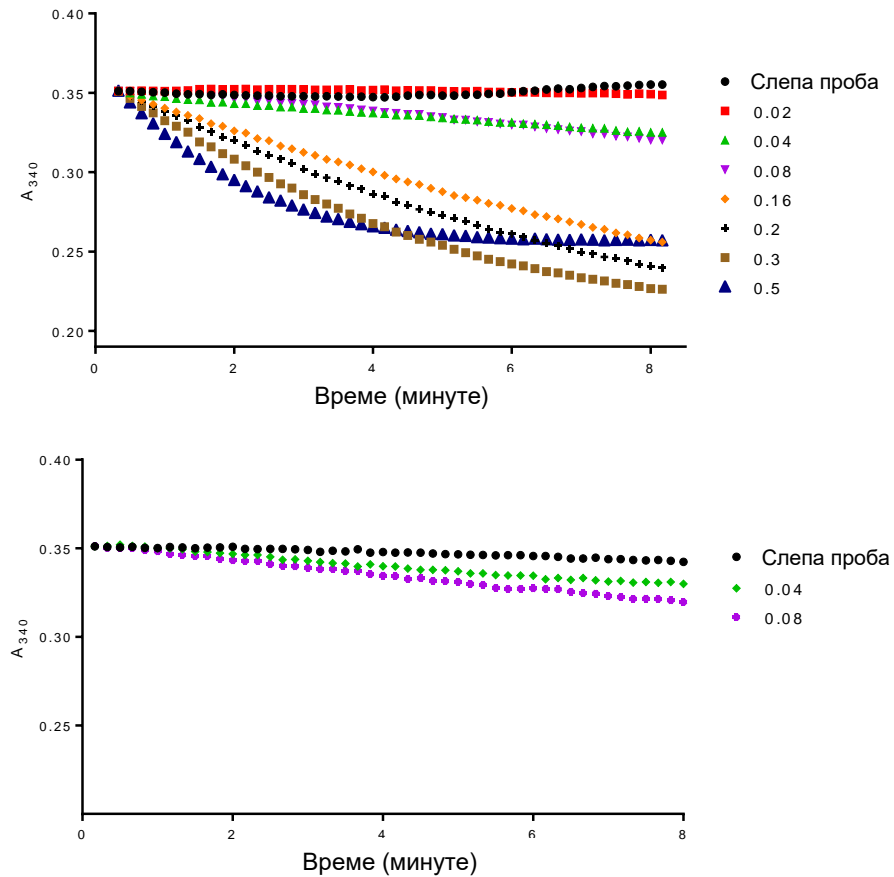
Упоређивањем вредности инхибиције у табели 6, најбољу инхибицију је показало једињење NSN око 75%, а затим AKR-22 око 66%.

9.2.3. Оптимизација реакције редуције

Оптимизација преко изоформе AKR1C3. Оптимизација ензимског есеја је рађена употребом AKR1C3 изоформе протеина (обележеног са хексахистидином) и на основу установљених параметара су урађени ензимски есеји са другим протеинским изоформама.

Концентрација протеина. Први корак у оптимизација ензимског есеја је обухватило истраживање колика концентрација пречишћеног рекомбинантног AKR1C3 ензима је потребна за детекцију активности ензима који претходно није био замрзнут. У литератури је навођена концентрација од 0.02 mg/ml по реакцији. Концентрација протеина у 50% глицеролском штоку је износила 0.93 mg/ml. Испробане су различите концентрације протеина (Сл. 52) са фенантренеквиноном као супстратом.

На основу графика (Сл. 52) се види да је узорак концентрације 0,02 mg/ml скоро права линија, која има идентичан нагиб као и слепа проба која је без ензима, односно детекција активности протеина са овом концентрацијом је слаба. Концентрације од 0,04 и 0,08 mg/ml иако имају дуплу разлику у вредности, међутим у нагибу и није толика велика, док је код још виших концентрација лако видљива разлика у активности, где у случају највише тестиране концентрације већ после четвртог минута долази до платоа који указује да је ензим потрошио сав кофактор у реакционој смеси.



Слика 52. Активност АКR1C3 протеина у различитим концентрацијама (mg/ml), приказана променом апсорбанце на 340 nm током времена. Горњи график представља активност одмах после пречишћавања протеина, док доњи представља активност после замрзавања протеина. Концентрација супстрата је 100 μ M.

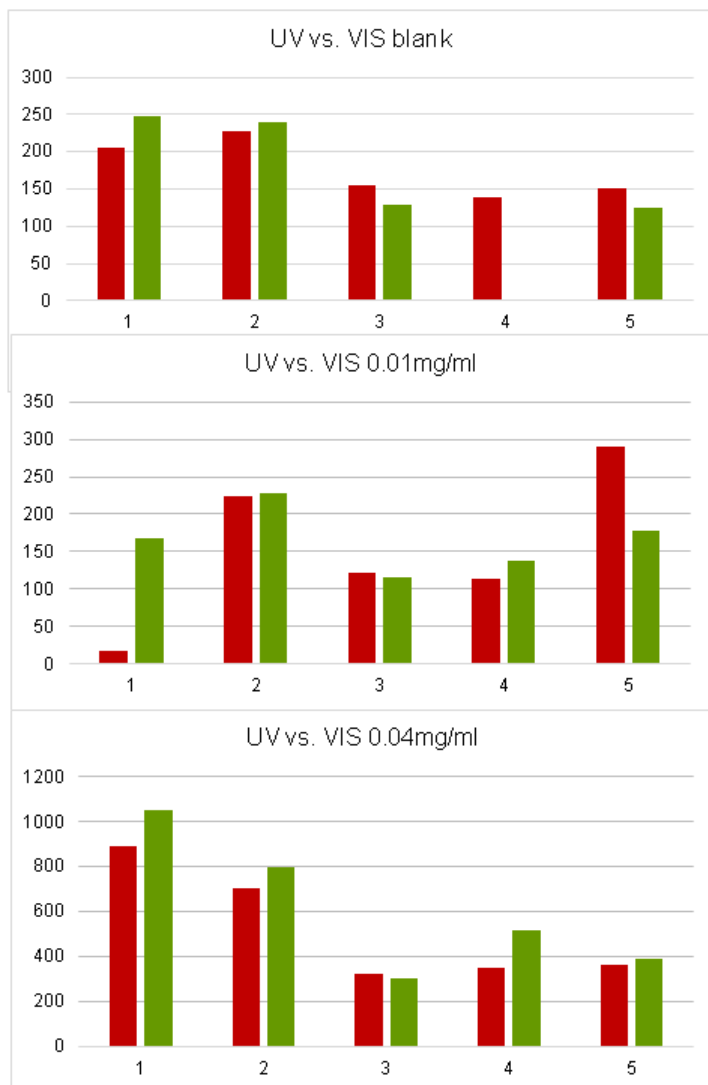
На основу добијених резултата закључено је да је ензим активан одмах после пречишћавања и да за сада најмања концентрација протеина која може да детектује активност је 0,04 mg/ml и из практичности у раду је решено да се ради са том концентрацијом.

Замрзавање. Следећи корак је био да се установи активност протеина после замрзавања на -80°C , јер план је да се после пречишћавања протеин аликутира и замрзне, дакле битно је да протеин остане активан и после замрзавања.

Анализом промене апсорбанце узорка пре и после замрзавања, установљено је да узорци концентрације 0,04 и 0,08 mg/ml имају приближно исту вредност апсорбанце измерене у 8. минути. Дакле, после замрзавања експерименти ће да се раде са концентрацијом АКR1C3 протеина од 0,04 mg/ml.

Микротитар плоча. Вредност апсорбанце која се користи за ове експерименте не спада у видљиви спектар, из тог разлога је решено да се тестира разлика у вредностима промене апсорбанце за исте узорке рађено на обичној пластичној

микротитар плочи и на плочи која пропушта УВ светлост. У оквиру истог експеримента је праћена и разлика у вредности промене апсорбанце без и са различитим временима трајања прединкубације и то на различитим температурама (Сл. 53).



Слика 53.

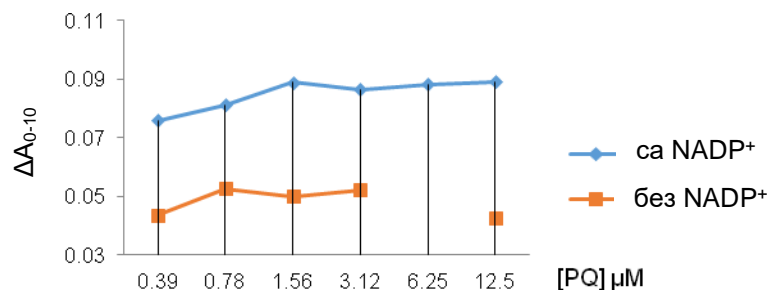
Разлика у вредностима промена апсорбанци, мерених на различитим врстама микротитар плоча, са различитим периодима прединкубација, различитим концентрацијама AKR1C3 протеина и при различитим температурама одвијања реакције. Услови: 1 – собна температура, без прединкубације; 2 - 25°C, 1 минут; 3 - 25°C, 7 минута, 4 - 30°C, 7 минута; 5 - 37°C, 7 минута.

Зелена боја представља вредност разлике апсорбанци добијених на обичној пластичној (VIS), а црвено на УВ (UV) микротитар плочи.

На основу првог графика могуће је уочити да је мала разлика у вредностима између УВ и ВИС плоча без обзира на услове. Недостатак вредности за обичну (ВИС) плочу у услову 4 се приписује техничкој грешки. У оквиру другог графика са концентрацијом протеина 0,01 mg/ml се виде већа варирања у условима 1 и 5, док у последњем графику са концентрацијом протеина од 0,04 mg/ml, варирања су мала у свим условима. Уколико се посматра промена вредности у различитим условима (вертикално упоређивање) најмање варирање је у условима 2 и 3.

Након овог и претходних експеримената решено је да се може радити на обичној пластичној микротитар плочи, са концентрацијом узорка протеина 0,04 mg/ml и да може да се ради на температури од 25°C, без обзира на дужину трајања прединкубације, међутим одлучено је да се ради са прединкубацијом на 37°C у трајању од 15 минута.

Кофактор. Прегледајући литературу, дошло се до сазнања да протеин може да има бољу активност у случају када се после пречишћавања замрзне са кофактором (Qiu, Zhou, Labrie, & Lin, 2004). Кофактор у овом случају има функцију одржавања структурне стабилности протеина и као такав омогућава да протеин испољи и бољу активност у есеју. Да би се ово испитало један део протеина је после пречишћавања замрзнута са NADP⁺ кофактором (Сл. 54).

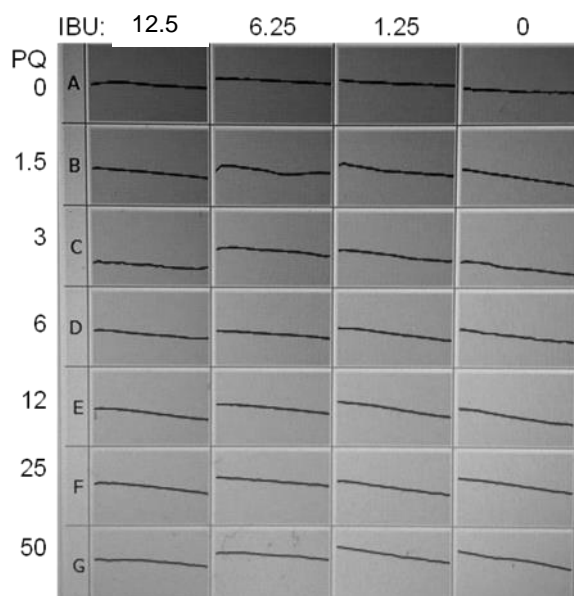


Слика 54. Разлика у промени апсорбанце у периоду мерења у 10 минута са и без кофактора NADP⁺ који је био додат пре аликвотирања и замрзавања протеина.

На основу резултата приказаних на Слици 54, може се видети да је већа разлика у промени апсорбанце током времена у примерима са свим концентрацијама PQ, у узорцима са NADP⁺, дакле протеин у тим случајевима је имао већу активност и зато је дошло до веће промене. Након овог случаја закључено је да ће даље да се ради са протеином који је замрзнут са кофактором.

Ибупрофен (IBU). Наредни кораци су обухватили проверу рада и активности ензима приликом додатка познатог инхибитора AKR1C3 у систем - ибупрофена (IBU) (Burns et al., 2008). Прво је проверено како различите концентарције инхибитора делују на систем у зависности и која концентрациј PQ је у систему. У првим покушајима је IBU био растворен у етанолу и као такав није давао резултате, тако да је одлучено да се у наредним експериментима раствори у DMSO као и PQ, међутим да максимална концентрација растварача у систему (реакционој смеси) буде до 4% (Burns et al., 2011). Уз таква правила је организован и испланиран експеримент у ком је PQ тестиран у следећим концентрацијама: 0; 1,5; 3; 6; 12; 25 и 50 μM (по редовима, Сл. 55). Највиша

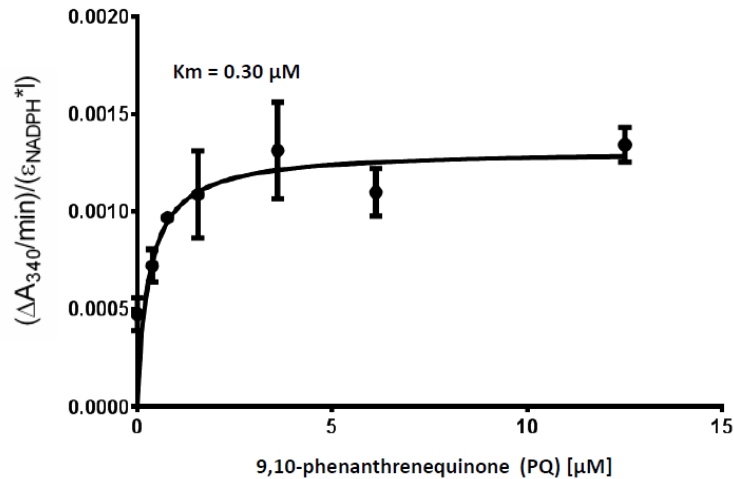
испитивана концентрација PQ је спуштена са 200 на 50 μM јер се на основу графика (Сл. 56), види да релативно рано долази до платоа који обухвата бар три последње највише концентрације супстрата. Испитивана концентрација IBU је 0; 1,25; 6,25 и 12,5 μM (по колонама) (Сл. 55).



Слика 55. Разлике у паду криве као одговор на различиту комбинацију концентрација IBU као инхибитора AKR1C3 са PQ као супстратом.

Као провера рада ензима може да се види да први ред где нема PQ нема ни нагиба криве, док у колони без IBU у свим ћелијама постоји нагиб који је највећи у последњој ћелији где је и највећа концентрација супстрата. Како се повећава концентрација IBU могуће је кроз редове (Сл. 55) видети и благо смањење нагиба. Међутим, има одступања у неким бунарима (ћелијама), а претраживањем литературе (Berg, Tymoczko, Stryer, & Berg, 2002) указано је на потенцијалне проблеме уколико супстрата има у вишку, односно да инхибитор не може да покаже ефекат уколико је у знатно мањој концентрацији од супстрата, што је може да буде један од главних проблема у конкуритивној инхибицији. Тако да је решено да се следећи експеримент проба са мањим концентрацијама супстрата да би се боље видео прелаз у криви инхибиције.

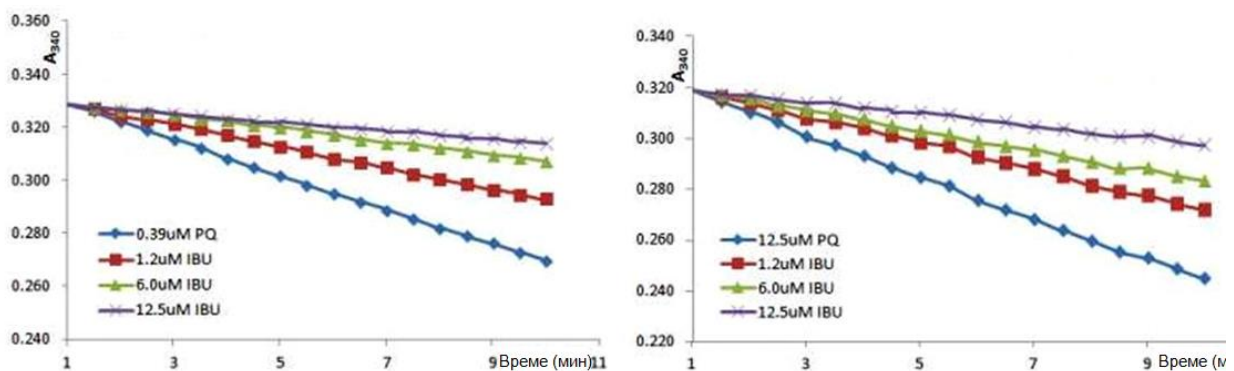
K_m и PQ, AKR1C3. За испитивање инхибиторног дејства неког једињења, уколико је конкуритивна инхибиција у питању, пожељно је да супстрат буде у концентрацији у вредности K_m (Burns et al., 2011). За анализу вредности K_m , варирана је концентрација PQ у опсегу од 0 до 200 μM (Сл. 56).



Слика 56. Графички приказ зависности ензимске активности AKR1C3 од концентрације супстрата (PQ).

На основу унетих параметара за мерење K_m , добијене су вредност од $0,3240 \mu\text{M}$, што одговара реду величина из литературе - μM (Burns et al., 2008). У наведеном серијском разблажењу PQ-а, најнижа испитивана концентрација је била $0,39 \mu\text{M}$, која одговара вредностима K_m , тако да је план да се ради са том концентрацијом PQ у есејима у којима ће се испитивати утицај других једињења на активност ензима.

Затим је проверена ефикасност различитих концентрација ибупрофена ($1,2$; 6 и $12,5 \mu\text{M}$) у системима са најмањом концентрацијом PQ ($0,39 \mu\text{M}$) са којом је планирано да се раде даља испитивања и првом највећом концентрацијом која прелази у плато ($12,5 \mu\text{M}$) (Сл. 57) (2017_01_24).



Слика 57. Упоредни приказ инхибиције ибупрофена у присуству $0,39$ и $12,5 \mu\text{M}$ концентрације PQ.

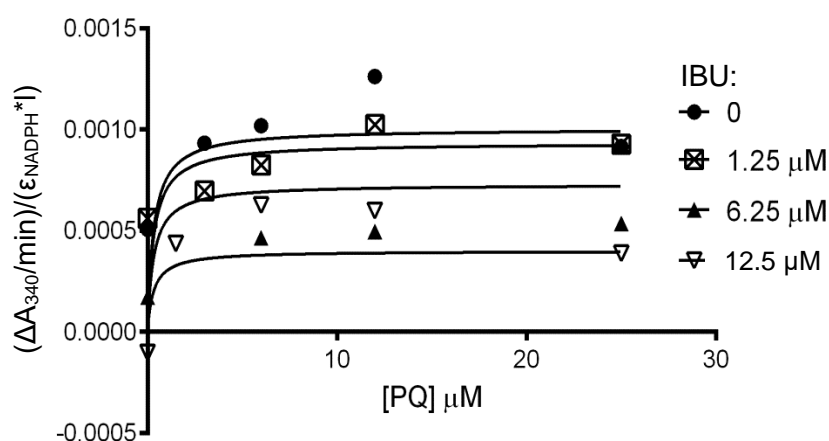
Одређен је проценат инхибиције у сваком случају (Табела 7). На основу података из табеле, могуће је видети да је разлика у процентима инхибиције између две концентрације PQ релативно мала у односу на то да је разлика између концентрације чак 32 пута. Дакле, концентрација PQ која одговара K_m и која је толико пута мања од прве највеће концентрације платоа, је сасвим одговарајућа за праћење ефекта инхибиције и тестирања ефеката других једињења.

Табела 7. Процент инхибиције* АКR1C3 ензима у комбинацији различитих концентрација ибупрофена (IBU) и фенантрениквина (PQ).

IBU \ PQ	0.39 μ M	12.5 μ M
1.20 μ M	39.22	36.36
6.00 μ M	63.67	51.76
12.5 μ M	75.05	71.41

*инхибиција је рачуната пропорционално у односу на разлику вредности прве и последње тачке праве за PQ. Та разлика је представљала 100% активност, затим је за остале рачунато као пропорција и како је тај резултат представљао активност, добијена вредност је одузета од 100 и резултат тога је у табели.

IBU, K_i . Литература наводи да један исти инхибитор може да испољи различиту врсту инхибиције (компетитивна, некомпетитивна или акомпетитивна) на истом ензиму у зависности која је врста супстрата, што је показано у неким од истраживања када је рађено са PQ или андростенедионом као супстратима (Burns et al., 2011, 2008). Литература наводи да је IBU компетитивни инхибитор (Jamieson et al., 2012), међутим са PQ као супстратом је ту врсту инхибиције мало теже добити. Подаци добијени из ензимског есеја са инхибитором су глобално уклапани („фитовани“) на моделе компетитивне, некомпетитивне и акомпетитивне инхибиције, а резултати који су презентовани представљају најбоље уклапање (Сл. 58). Резултатима је представљена некомпетитивна инхибиција, са вредношћу $K_i = 9,18 \mu\text{M}$.



Слика 58. Некомпетитивна инхибиција активности АКR1C3. Есеј је тестиран са 4 различите концентрације ибупрофена у комбинацији са различитим концентрацијама PQ као супстрата.

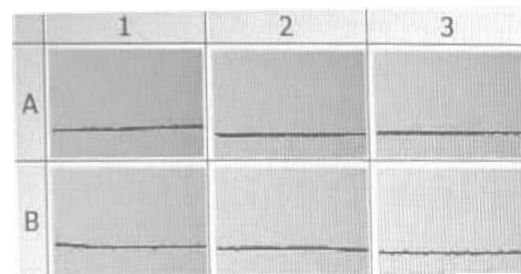
У раду Бирнса и сарадника (Burns et al., 2008) је оповргнута врста инхибиције коју су они добили у ензимским есејима са различитим инхибиторима у којима су PQ

користили као супстрат, тако што су добили кристал са инхибитором који је у активном месту и самим тим указао на то да је инхибиција компетитивна за њихов инхибитор. Што се тиче IBU, поред литературе, постији и кристална структура на PDB са њим у активном месту ензима (PDB ID: 3R8G) што иде у прилог чињеници да PQ као супстрат у ензимским есејима модификује инхибиторно дејство IBU-а.

На основу оптимизованих корака ензимског есеја на примеру изоформе AKR1C3, решено је да се исти услови и закључци примене и на есеје са другим изоформама.

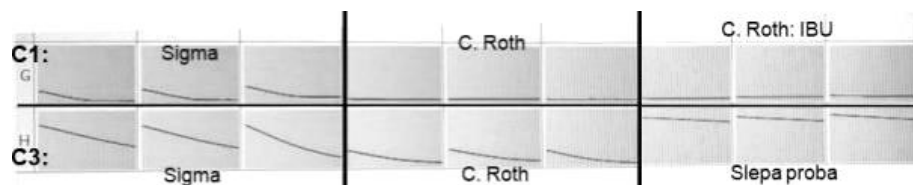
Редукција – AKR1C1

За ензимски есеј у ком је тестирана изоформа C1, коришћена је иста концентрација свих компонената у систему и исте компоненте као у претходном примеру. Коришћен је и исти супстрат и исти инхибитор. Пречишћени ензим је пре замрзавања и аликвотирања помешан са NADP⁺ кофактором.



Слика 59. Приказ (не)промене апсорбанце током времена у случају тестирања активности изоформе C1 у трипликату са PQ (ред A) и IBU (ред B).

Тестирање активности ензима у трипликату приликом додатка супстрата (колона A) и инхибитора (колона B) није показало промену апсорбанце током времена ни у једном од та два случаја, што се види на Слици 59. Као потенцијални разлог због недостатка пада у вредности апсорбанце се претпоставило да је проблем био у неактивности кофактора. Из наведеног разлога решено је да се тестирају кофактори различитих произвођача (Sigma и Carl Roth) паралелно и на C1 и на C3 изоформи (Сл. 60).



Слика 60. Разлика у активности између AKR1C1 и AKR1C3 изоформе протеина у присуству кофактора различитих произвођача.

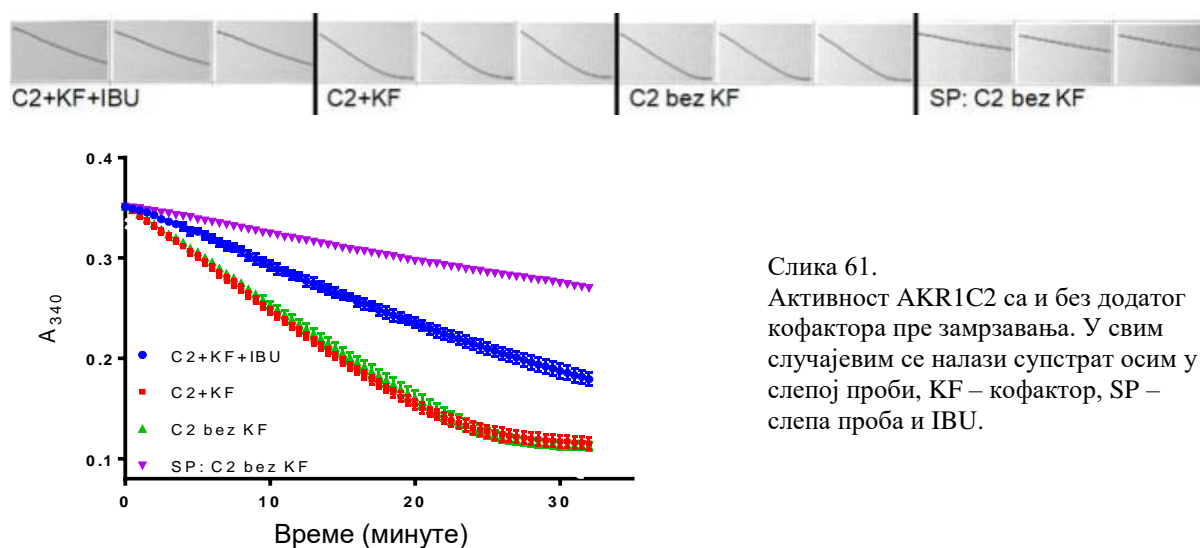
Анализом Слике 60 може да се установи више ствари. Упоређивањем колона првог сета трипликата, потврђено је да кофактор произвођача Sigma активан. Међутим,

у случају изоформе C1 врло брзо долази до престанка пада у апсорбанци и почетна вредност апсорбанце је нижа у односу на почетну вредност у случају C3. Други сет трипликата јасно показује у односу на први сет да кофатор произвођача C. Roth није активан или има знатно смањену активност. На основу поређења изоформи C1 и C3, C1 је показао слабију активност.

Разлог за неактивност другог кофактора је у чињеници да су његови аликвоти који су коришћени за овај есеј чувани на -20°C , а не на -80°C као претходни који су били активни.

Редукција – AKR1C2

За разлику од C1, део пречишћеног протеина C2 је замрзнут са кофактором NADP⁺, а у део није. Проверена је активност протеина у оба случаја са истим супстратом (PQ) и истим инхибитором (IBU) као у претходним случајевима (Сл. 61). Али овог пута без прединкубације.



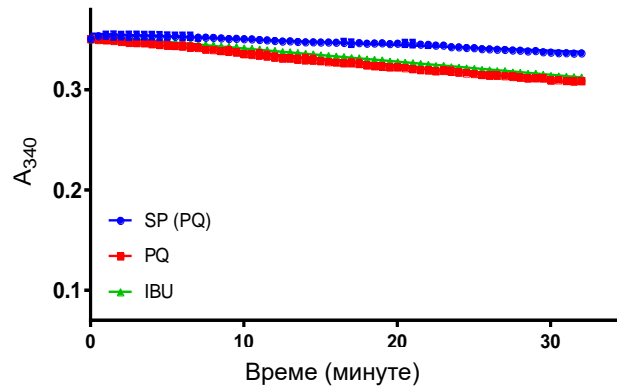
Слика 61.
Активност AKR1C2 са и без додатог кофактора пре замрзавања. У свим случајевим се налази супстрат осим у слепој проби, KF – кофактор, SP – слепа проба и IBU.

На основу средња два сета трипликата види се да изоформа C2 има активност у оба случаја са и без претходно додатог кофактора. У случају када се дода инхибитор пад апсорбанце је мањи, а у случају слепе пробе пад је још мањи.

Дакле, изоформа C2 је активна, уочава се разлика између активности када је инхибитор присутан у односу на ситуацију када је супстрат сам, као и у односу на слепоу пробу. Активност је иста без обзира да ли је додат кофактор пре замрзавања или не.

Редукција – АКR1C4

Изоформа С4 је цела пре замрзавања помешана са кофактором, аликвотирана и замрзнута. Коришћен је исти и супстрат и инхибитор, и била је 15 min прединкубација пре додавања супстрата (Сл. 62).



Слика 62. Промена апсорбанце на 340 nm као приказ активности протеина АКR1C4 тестираног са супстратом PQ и инхибитором IBU.

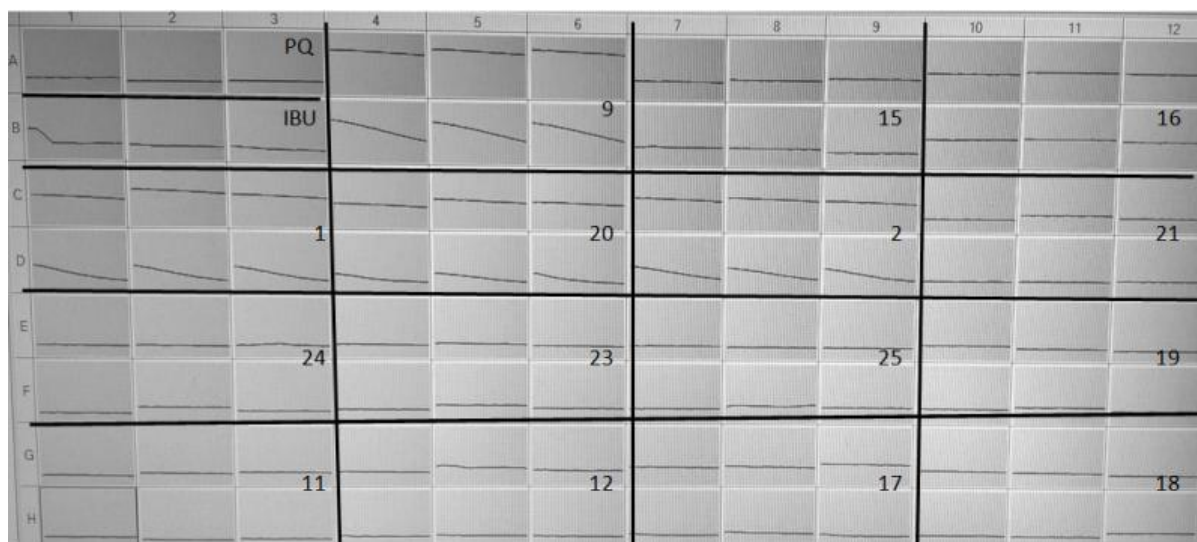
Упоређујући промену апсорбанце на графику, види се да је слепа проба равна линија, односно да скоро нема промене током времена, међутим PQ и IBU се поклапају и то са малом променом у односу на слепу пробу, дакле протеин у овом систему није показао активност, бар у тој мери да би се користила за даљи рад.

9.2.4. *In vitro* анализа ефекта различитих једињења на редукујућу активност АКR1C протеина

На основу покушаја тестирања постојања активности свих хуманих изоформи чланова АКR1C подфамилије (претходно поглавље), неке од изоформи су тестиране са синтетисаним једињењима и екстрактима, а неке не. Изоформа С4 није даље тестирана, С1 и С2 су тестирана са неким, док је С3 тестиран са свим једињењима и екстрактима који су коришћени у оквиру ове тезе.

Изоформа АКR1C1

Приликом првог тестирања активности изоформе С1 осим што је пробано и са познатим инхибитором и супстратом, одмах су испитана и једињења која су у датом моменту била растворена и самим тим доступна за тестирање (Сл. 63).

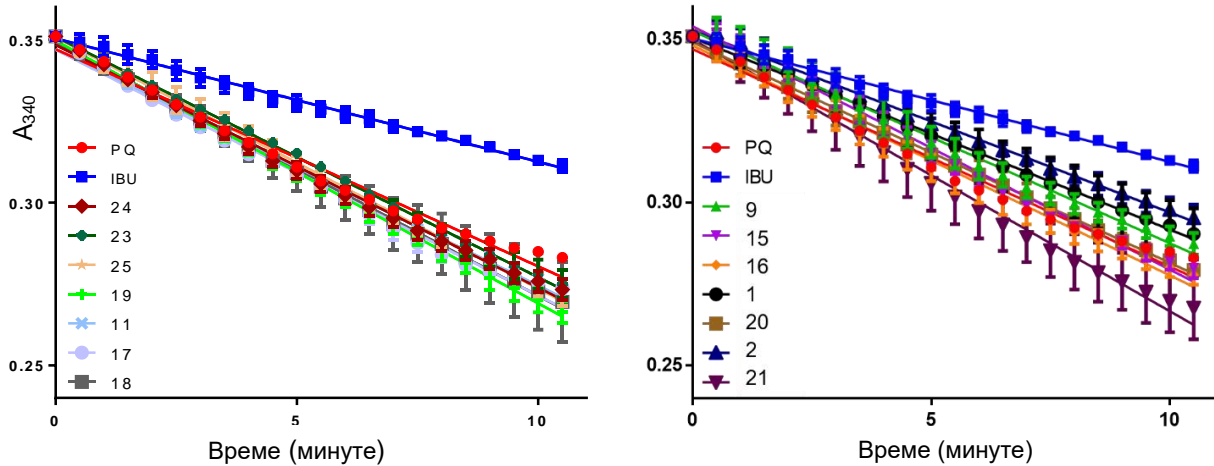


Слика 63. Ензимски есеј са АКR1C1 изоформом и различитим једињењима. Приказ промене апсорбанце током времена у сваком бунару микротитар плоче, бројеви на плочи представљају име једињења без првог дела (AKR-), видети поглавље Материјал и методе, Табела 3.

Слика 63 приказује промену апсорбанце током времена у сваком бунару на микротитар плочи. Црном линијом су одвојени резултати за свако тестирано једињење. Једињења су испитана у трипликатима, с тим да горњи ред представља слепу пробу (мастер микс без супстрата), а доњи сам експеримент. Одмах се може уочити да систем није добар, јер није уочена активност код PQ, прегледом осталих бунара, види се да скоро ни у једном нема промене у вредности апсорбанце, осим за АКR-9, -1, -20 и -2. Али како контроле нису показале очекивани резултат, остатак експеримента није узиман у обзир. После наредних експеримената како је већ наведено у делу Редукција – АКR1C1, установљено је да је део проблема био кофактор. Међутим како је фокус тезе био на изоформи С3, није настављено даље са радом на С1 изоформи.

Изоформа АКR1C2

За тестирање једињења коришћени су аликвоти С2 који су замрзнути са кофактором NADP⁺. Слепе пробе су одузете од сваког експеримента у трипликату посебно, да би се добио график са приказом промене апсорбанце по тестираном једињењу (Сл. 64). Део једињења који је тестиран поседује циклични естар – лактон. Та једињења су се показала у истраживањима као добри потенцијални инхибитори АКR1C3 изоформе па је зато одабран сет једињења који га поседују (Burns et al., 2008; Qiu et al., 2007).



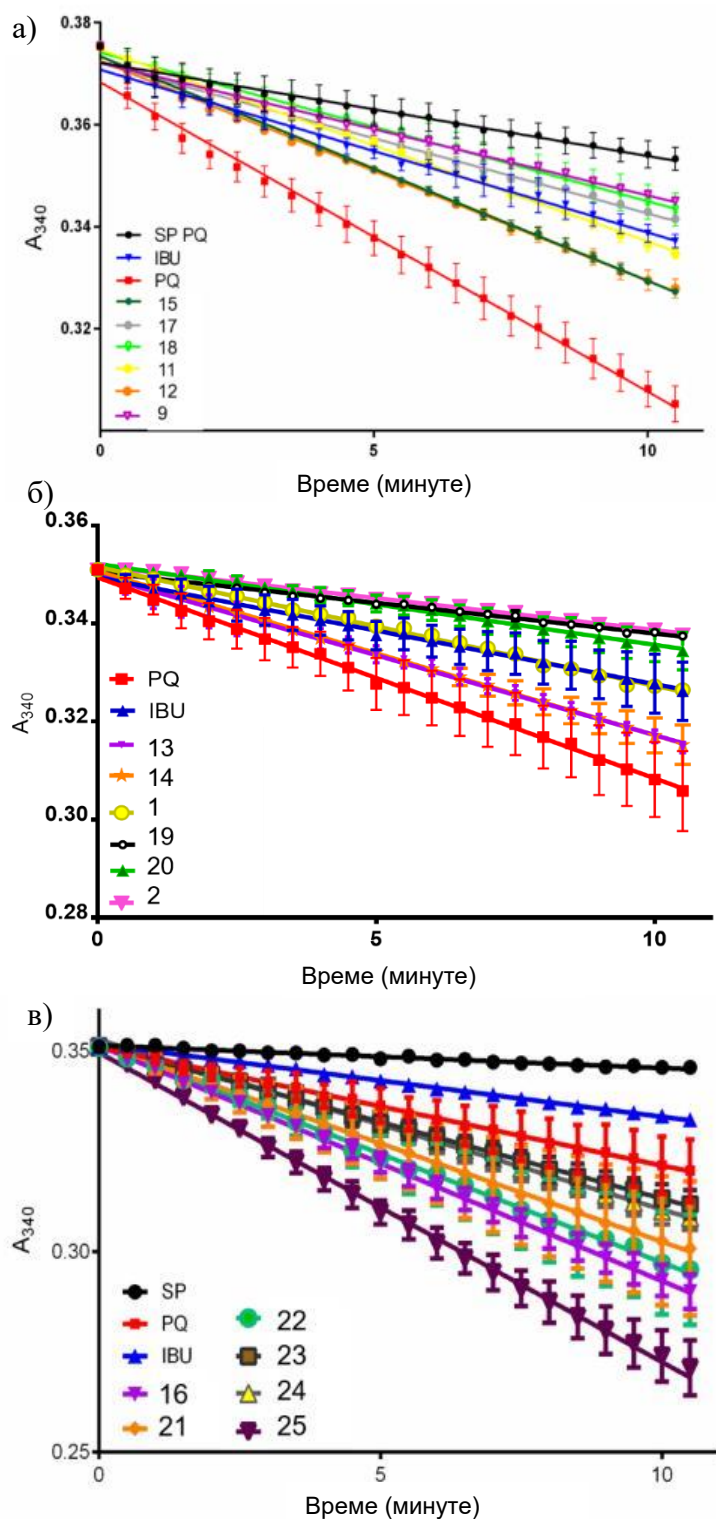
Слика 64. Промена апсорбанце на 340 nm услед активности AKR1C2 изоформе са лактонима и Ф једињењима (лево) и са пиколил и пиколинидилден (десно). Бројеви представљају име једињења без првог дела (AKR-), видети поглавље Материјал и методе, Табела 3.

На оба графика се може видети да су реакције са IBU највише инхибиране, односно линија има најмањи пад. У сету једињења на левој половини слике ни једно једињење није показало карактеристике инхибитора, јер је пад апсорбанце са свим другим једињењима ближи или и скоро исти промени апсорбанце приликом тестирања позитивне контроле – PQ. У десном графику је мало шира дистрибуција вредности пада у апсорбанци, после IBU најбоље се показало једињење 2. Оно што је карактеристика изоформе C2 која се види на оба графика лако у односу на конкретно изоформу C3 јесте свакако повећан пад у есеју и са IBU, док је код C3 тај пад знатно мањи скоро једнак слепој проби. Та чињеница може да укаже на неколико ствари, прво да C2 можда нема чистоћу колику и C3, затим да IBU није толико јак инхибитор C2 као што је у случају C3.

Изоформа AKR1C3

Изоформа C3 се показала као најбоља за сва даља детаљнија истраживања како инхибиторног потенцијала неког једињења тако и самих кинетичких параметара за одабране инхибиторе. Како је већ наведено такође је и оптимизација ензимског есеја урађена на овој изоформи.

Сва тестирања су урађена уз контролни супстрат (PQ) и инхибитор (IBU). За прва тестирања су одабрани представници стероидних једињења са различитим модификацијама. Тако да су у првом изналажењу тестирана једињења AKR-9, -11, -12, -15, -17 и -18 (Табела 4, Слика 65/а). У односу на PQ сва једињења су смањила



Слика 65. Промена апсорбанце приликом тестирања реакција редукције у присуству три сета модификованих стероида на изоформи АКР1С3. Бројеви представљају име једињења без првог дела (АКР-), видети поглавље Материјал и методе, Табела 3.

структури и модификацијама припадају једној групи да би се финије могле видети разлике у промени у активности протеина у зависности од врло малих међусобних модификација на једињењу. Први сет су била једињења са пико или пиколинилиден

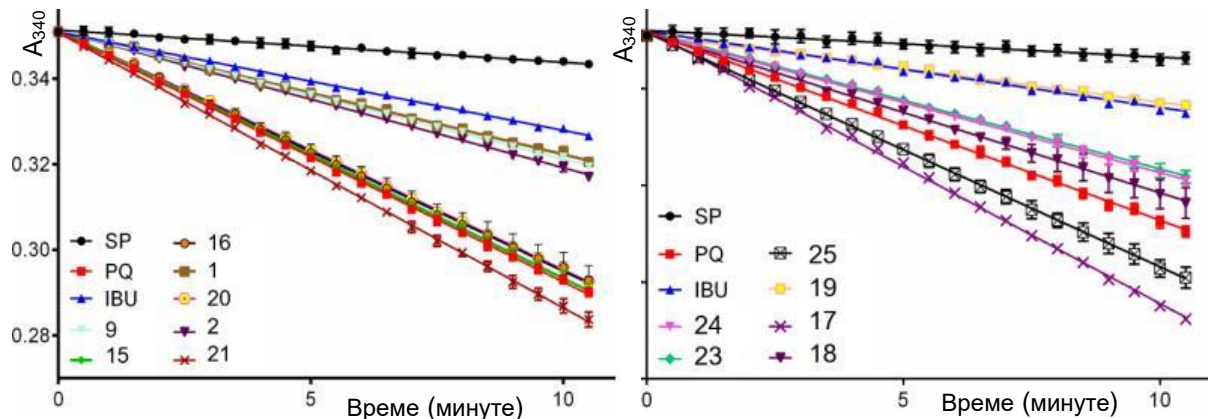
активност ензима, с тим да су **АКР-9, -18, -17** се показали као најбољи, **АКР-11** има исти нагиб као и IBU, а преостала два једињења имају мало већи нагиб али и даље свакако знатно мањи од PQ.

Други сет једињења који је тестиран приказан је на Слици 65/б. У овом сету само једињења **АКР-13** и **-14** су се показала као слабији инхибитори, док су сва остала једињења показала исти или још бољи инхибиторни потенцијал од IBU.

Трећи сет једињења су углавном једињења са отвореним D прстеном. Из Слике 65/в, се види да ни једно једињење нема инхибиторни потенцијал. Бар у случају редукујућих реакција, посебно када се обрати пажња на **АКР-22**, који инхибира активност у случају оксидујућих реакција.

После анализираних мешаних сетова једињења приступило се анализи сетова једињења тако да по

групом на C17 атому D прстена стероидне основе, **AKR-9, -16, -15, -1, -20, -2** и **-21** (Сл. 66). Оваква подела није једина, могуће су и по другој хемијској основи. Разлог да се тестирају ова једињења је у чињеници да AKR1C ензими најчешће модификују на природном супстрату групу која се налази на C17 положају. На основу Сликe 66, једињења која су се показала као инхибитори су **AKR-9, -1** и **-2**. Са малом променом у нагибу, али дакле и у поновљеном тестирању су се показали као инхибитори са потенцијалом блиском потенцијалу IBU.



Слика 66. Графички приказ промене апсорбанце (y-оса) као одговора на утицај на активност AKR1C3 ензима приликом тестирања са пико и пиколинилиден једињењима, леви график и са једињењима која поседују лактон или отворен D прстен са хидроксилном групом на C3, десни график.

Тестирана су у једном сету и једињења која поседују лактон (**AKR-19, -17, -18**) и сва једињења са отвореним D прстеном која поседују хидроксилну групу на C3 атому (**AKR-23, -24, -25**) (Сл. 66). У овом сету највећу инхибицију је показало једињење **AKR-19**, док су остали били ближи нагибу од PQ.

Веродостојност резултата се потврђује и њиховом поновљивошћу. Упореджени су положаји нагиба до сада приказаних и тестираних једињења на изоформи C3, који су тестирани бар два пута и испоставило се да одређена једињења не показују исто својство, односно да се у неком есеју понашају као инхибитори међутим приликом поновног тестирања као супстрат или као једињење са осредњим инхибиторним потенцијалом. Једињења која су показала исти потенцијал су **AKR-9, -12, -19, -2, -1, -23, -24** и **-25**. Остала једињења која су варирала са својим инхибиторним потенцијалом, могу да указују на нестабилност самог једињења.

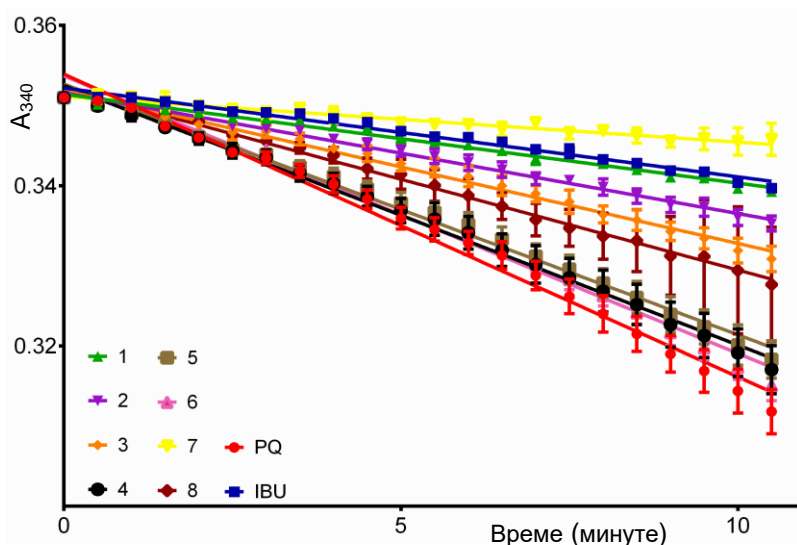
За једињења која нису мењала свој потенцијал је израчунат проценат инхибиције употребом вредности нагиба од PQ као 100% и пропорционално израчуната вредност активности свих осталих нагиба, па затим одузета од 100% (Табела 8).

Табела 8. Инхибиција активности AKR1C3 протеина употребом различитих једињења, изражено у процентима (%).

PQ	0	AKR-12	15	AKR-1	50	AKR-25	/
IBU	60	AKR-19	65	AKR-23	28		
AKR-9	48	AKR-2	45	AKR-24	25		

*инхибиција је рачуната пропорционално у односу на разлику вредности прве и последње тачке праве за PQ. Та разлика је представљала 100% активност, затим је за остале рачунато као пропорција и како је тај резултат представљао активност, добијена вредност је одузета од 100 и резултат тога је у табели. Концентрација тестираних једињења је 6,25 μM .

После ових тестирања, анализом најбољих резултата установило се да би било интересантно тестирати нови сет пиколил и пиколинилиден једињења која поседују различите групе на C3 атому, уз два већ тестирана. Тако да је нови сет обухватио једињења **AKR-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 и -8** (Сл. 67).



Слика 67. Графички приказ промене апсорбанце услед утицаја тестираних пико и пиколинилиден деривата са различитим групама на C3 атому на активност AKR1C3 ензима.

У оваквом сету најбољу инхибицију је показало једињење **-7**, после одмах за њим једињења **-1** и **-2**, једињење **-3** је близу по вредности и **-8**, међутим са великим флукуацијама у мерењу. Једињење **-7** је једино једињење са азотом на положају C3 које је показало инхибиторно својство. Од наведена три најбоља једињења, прва два су оба са пиколил групом на C17 положају у односу на **-2** које је са пиколинилиден. Што може да се тумачи тако што фелксибилност пиколил групе можда омогућава боље усидравање једињења у протеину и боље „закључавање“ у великом активном месту. Вредности процената инхибиције су приказане у табели 9.

Табела 9. Ефекат инхибиције (%) тестираних пиколил и пиколинилиден једињења на активност AKR1C3*.

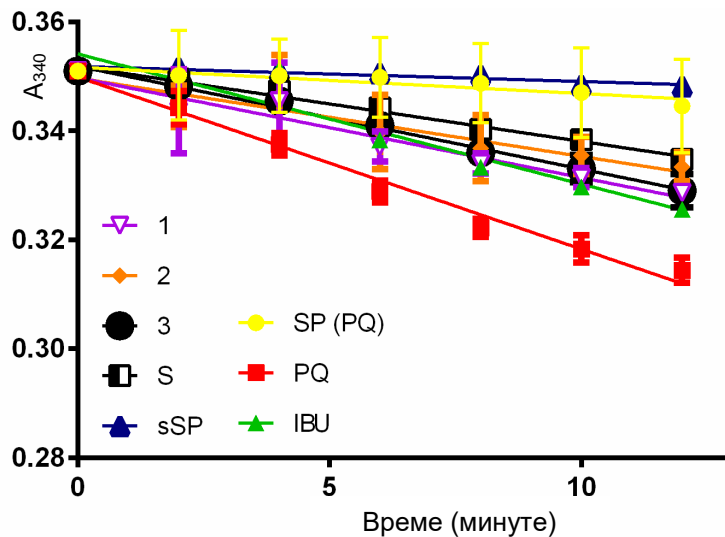
PQ	0	AKR-4	14.32 \pm 2.10
IBU	70.65 \pm 2.16	AKR-5	17.17 \pm 1.85
AKR-1	70.65 \pm 1.89	AKR-6	8.34 \pm 1.73
AKR-2	60.12 \pm 1.78	AKR-7	84.93 \pm 5.62
AKR-3	49.43 \pm 2.09	AKR-8	60.00 \pm 4.75

*Вредности представљају средњу вредност \pm коефицијент варијабилности, са концентрацијом инхибитора 6,25 μM , за детаље погледати поглавље 8.11.2.

9.2.5. *In vitro* анализа efekta биљних екстраката на редукујућу активност изоформе AKR1C3

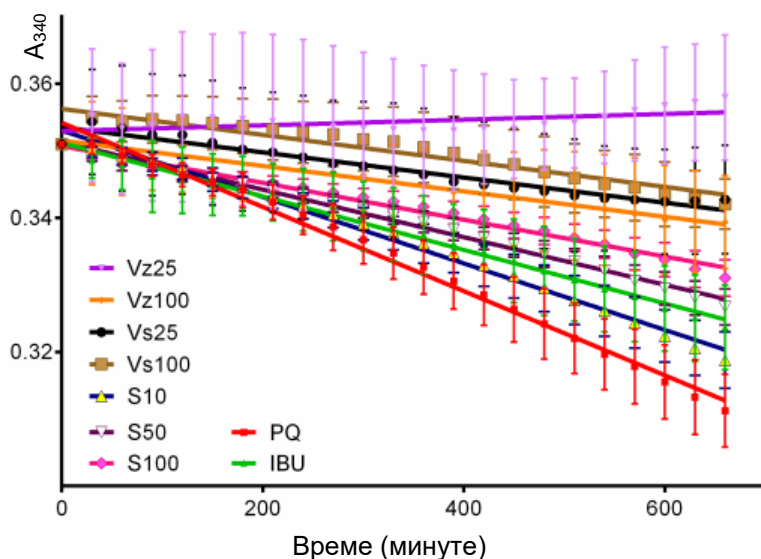
Редукција са биљним екстрактима је рађена са изоформом С3 која је претходно аликвотирана и замрзнута са кофактором NADP⁺ и глицеролом. У већини народних рецепата се препоручује једна кашичица чаја на 2,5 dl хладне или прокувале воде па је решено за потребе ензимског тестирања да се припреми 10x коцентрованији чај, дакле 1 g сувог биљног материјала на 25 ml воде.

Прво тестирање је рађено са вирком (*A. vulgaris*) у различитим разблажењима, где су као и до сада PQ и IBU били контролни супстрат и инхибитор, редом. Поред наведених, коришћен је као контрола и водени екстракт вирка који је припремљен од стране колега на Департману за хемију (Сл. 68).



Слика 68.
Графички приказ првог тестирања редуције ензима са екстрактима вирка (*A. vulgaris*).
1 – 3: 1 g суве биљке у 25, 50 и 100 ml прокувале воде,
S – водени екстракт са хемије, sSP – слепа проба без ензима.

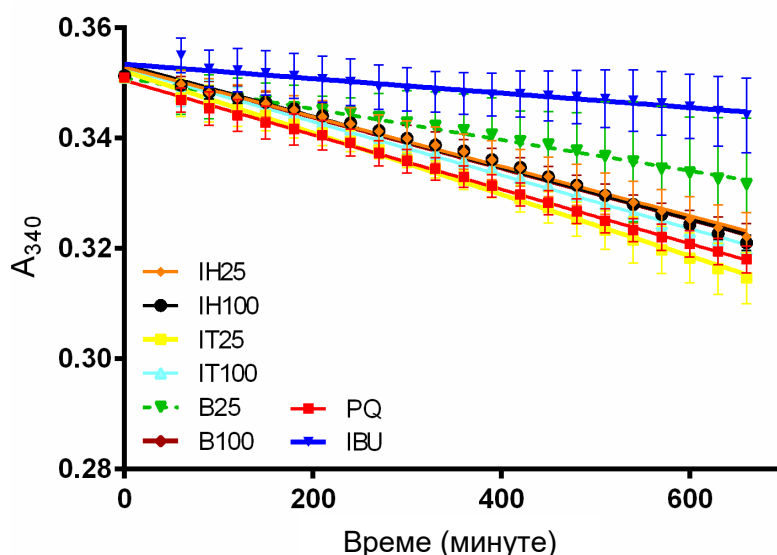
Као и до сада и на овом графику је редослед контролних есеја гледано од горе на доле био добар: слепе пробе (SP(PQ) и sSP), IBU и затим PQ. Сва тестирана разблажења као и сам водени екстракт су показали сличне или боље инхибиторне карактеристике од IBU, са тим да је водени екстракт најбољи, док није детектована велика разлика између различитих разблажења чаја. Одлучено је да се у будуће тестирају само два разблажења, 25 и 100 ml на 1 g сувог биљног материјала. Остаци чајева су аликвотирани и замрзнуту на -20°C. Да би се установила поновљивост експеримента као и ефекат замрзавања чајева на њихову инхибицију активности AKR1C3, експеримент је поновљен, тако да су тестирани замрзнуту чајеви, затим свеже припремљени чајеви и опет све то у односу на различите концентрације воденог екстракта и познате контроле PQ и IBU (Сл. 69).



Слика 69.
Графички приказ тестирања редукције ензима AKR1C3 са екстрактима вирка (*A. vulgaris*), са замрзнутим (Vz) и свеже припремљеним (Vs) чајем. Бројеви у легенди представљају у којој запремини воде је 1 g суве биљне материје припремљен; S – водени екстракти са хемије, бројеви представљају концентрацију mg/ml; SP – слепа проба; PQ – супстрат; IBU – инхибитор.

На графику на Слици 69 се може видети да ензим и даље највећу активност испољава у присуству самог PQ, највећу инхибицију су испољили есеји са вирком који је растворе у 25 ml воде без обзира да ли је претходно замрзнут или свеже припремљен. После њих следећи по јачини инхибиције су чајеви који су у 100 ml растворени и тек затим водени екстракти, који имају инхибицију блиску IBU.

Уз наведено тестирање и замрзнутог и свежег вирка, тестирани су и чајеви од лишћа имеле (*V. album*) и лишћа боровнице (*V. myrtillus*) (Сл. 70). Због постојања различитих припрема чаја од имеле, испробане су обе опције и са хладном и са топлом водом.



Слика 70.
Графички приказ тестирања редукције ензима са екстрактима вирка (*A. vulgaris*), имеле (*V. album*) и боровнице (*V. myrtillus*). Бројеви у легенди указују у којој запремини воде је 1 g суве материје биљке припремљено, IH – имела, хладна припрема; IT – имела, топла припрема; B – боровница; PQ – контролни супстрат и IBU контролни инхибитор.

Анализом графика 70 се уочава да су скоро сви екстракти по паду апсорбанце блиски вредности криве са PQ, док се најконцентрованији екстракт боровнице једини

издвојио и то у виду инхибиције активности AKR1C3 протеина, посебно ако се пореди са IBU као познатим инхибитором.

Сви резултати који су добијени уз употребу биљних екстраката указују на потенцијални значај и самих чајева у како свакодневном животу тако и можда у медицинске сврхе. Међутим, овим што је обухваћено у оквиру ове тезе је само почетак који је показао на потенцијал који биљке могу да имају и њихов значај као такав, с тога даља истраживања би требала да се фокусирају и на истраживање биљних екстраката у ензимским есејима, њихове активности и анализе садржаја (фракцинација) екстракта који има утицај на ензим. Посебан акценат треба ставити на чињеницу богатства диверзитета који се налази на Балкану и самим тим у Србији који би могао због тога да има оригиналне и јединствене резултате у оквиру оваквих, а можда и медицинских истраживања.

9.3. Карактеристике установљених инхибитора AKR1C3 протеина

Претходно поглавље се бавило генералним претраживањем, односно изналажењем синтетисаних једињења са инхибиторним потенцијалом према ензиму AKR1C3. У овом поглављу су приказане додатне анализе спроведене на најбољим инхибиторима из претходног поглавља и значај тих инхибитора у ширем контексту. Потентност неког инхибитора се даље огледа између осталог и кроз анализу кинетичких параметара попут K_i и IC_{50} .

9.3.1. Преглед структура једињења која су показала инхибиторни потенцијал

Од свих тестираних једињења из претходног поглавља, 6 једињења се показало као инхибитор у реакцијама редукције и два једињења у реакцијама оксидације (Табела 10).

Табела 10. Структуре тестираних једињења која су у есејима са AKR1C3 ензимом показала инхибиторно својство (AKR-22 и NSN у оксидацији, а остали у редукцији)

AKR-1*		AKR-2*	
AKR-3**		AKR-7§	
AKR-9* (AJ-1)		AKR-19‡ (3)	
AKR-22€ (AN10)		NSN	

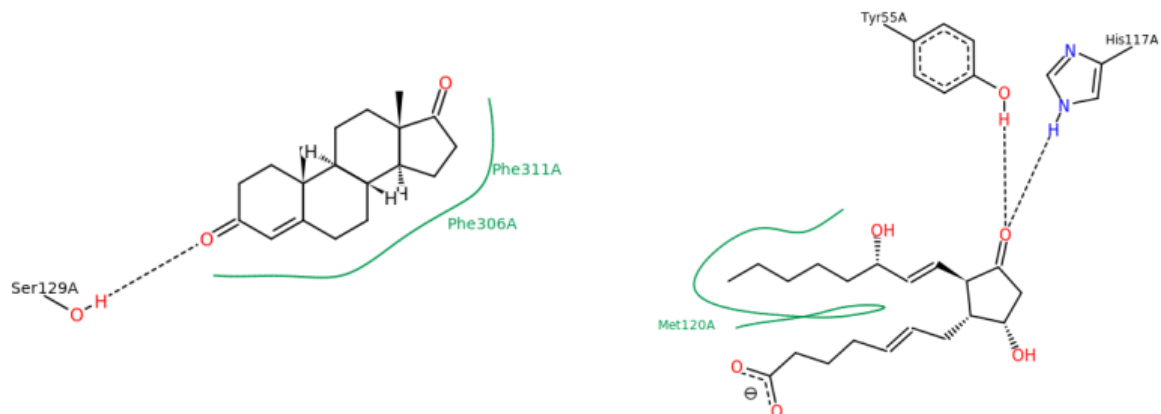
* (Penov-Gaši et al., 2007); ** (Djurendić et al., 2012); § (Ajduković et al., 2015); ‡ (Savić et al., 2018); € (Nikolić et al., 2015);

Осим NSN сва преостала једињења имају А, В и С прстен, а ако се изузме и AKR-22 сви остали имају и D прстен карактеристична за стероидна једињења. Највећи број једињења има пиколил групу на C17 атому D прстена са међусобном разликом на C3 атому (AKR-1, 3, 7, 9), док је једињење 2 исто као и 1 осим пиколинилидена на месту пиколила. Главна разлика у физичком смислу у оквиру првих пет једињења је у чињеници да је пиколил група врло флексибилна, док пиколинилиден због двоструке везе није. Једињење 19 има додатни прстен на А прстену, који изгледа као прстен из пиколил и пиколинилиден групе. Оваква структура једињења је омогућила једињењу

да буде врло нефлексибилно и планарно. За разлику од 19, једињење 22 је због отвореног прстена врло флексибилно и због тога може да заузме различите и оријентације и положаје у активном месту.

9.3.2. *In silico* анализа усидравања инхибиторних једињења кроз примере са супстратима

Тренутно, на PDB сајту од свих структура AKR1C3 само две су са природним лигандима, 1XF0 са андростенедионом и 1RY0 са простагландином. На Слици 71 су приказане кључне везе у везивању супстрата у активном месту.

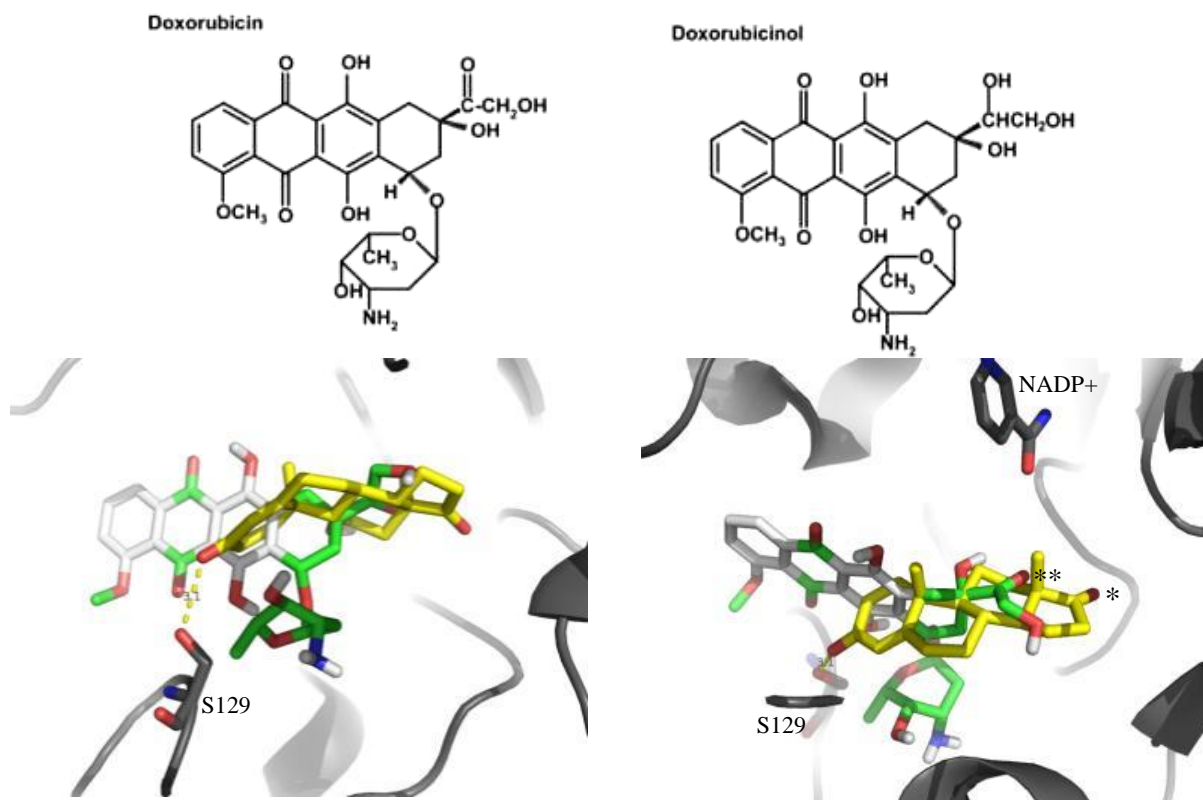


Слика 71. Кључне интеракције у везивању андростенедиона (лево, PDB ID 1XF0) и простагландина (десно, PDB ID 1RY0) у активном месту протеина AKR1C3. Црне испрекидане линије представљају водоничне везе, а зелене пуне линије представљају хидрофобне интеракције.

На основу Слике 71 се види да је за везивање и положај стероидног једињења битно формирање како хидрофобних интеракција преко фенилаланина тако и водонична веза са серином 129 који омогућава стероиду да остане у одређеном положају и оријентацији. Поред природних супстрата истраживањима која су већ напоменута (Novotna et al., 2008) је установљено да AKR1C3 и одређене антиканцерогене лекове обрађује као да су му супстрати, како таквих структура још нема на PDB-у, молекуларним (рачунарским) усидравањем је покушано да се анализира које су то потенцијалне интеракције које се у том случају дешавају. Један од таквих супстрата је и доксорубицин (координате узете из PDB ID 4ZVM) који помоћу AKR1C3 прелази у неактивну форму - доксорубицинол (Сл. 72).

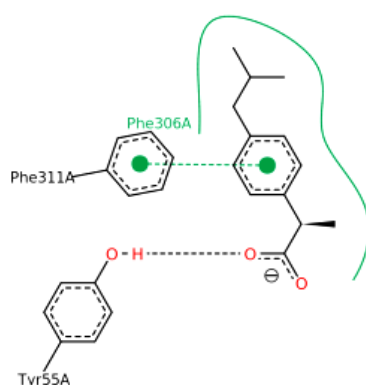
Поређењем положаја и оријентације доксорубицина са природним супстратом може да се види да и доксорубицин има могућност за интеркацијом са серином 129 и исто тако може да се примети да његова кето група која се редукује у -ОН није далеко од положаја кето групе андростенедиона. Међутим, мора се узети у обзир молекуларна

динамика и протеина и супстрата у живом систему која омогућава да одређени делови молекула дођу и контакт.



Слика 72. Приказ структура доксорубицина и рубицинола (слика горе). Доле: Положаја доксорубицина у односу на андростенедион у активном месту АКР1С3 протеина. Жуто - андростенедион, бело-зелено – доксорубицин; * и ** - положаји циљних кето група андростенедиона и доксорубицина, PyMOL.

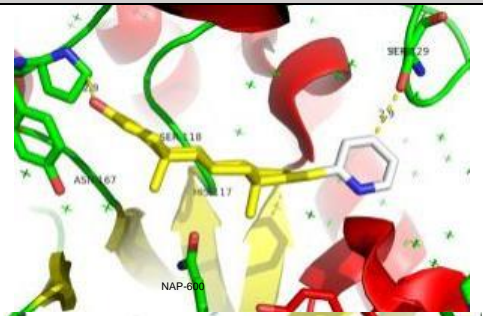
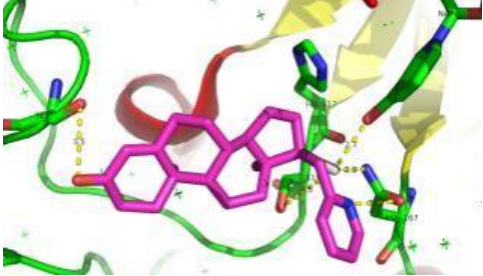
У оквиру PDB базе постоји више структура АКР1С3 са различитим инхибиторима од којих су скоро све структуре са малим не-стероидним молекулима. Ибупрофен, инхибитор који је коришћен у оквиру овог истраживање је мали молекул па као такав није погодан за структурно поређење са једињењима која имају стероидну основу али свакако треба обратити пажњу које су кључне аминокиселине и у том случају (Сл. 73).



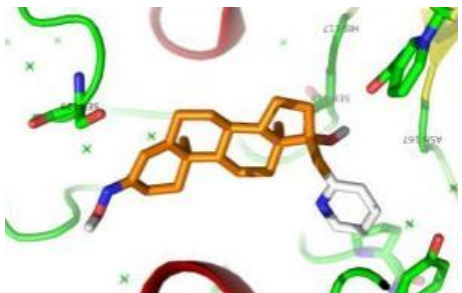
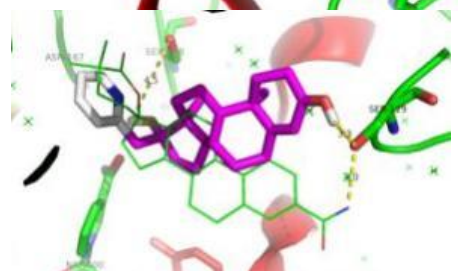
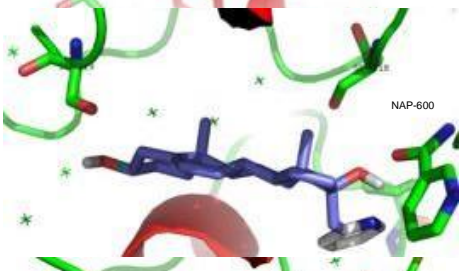
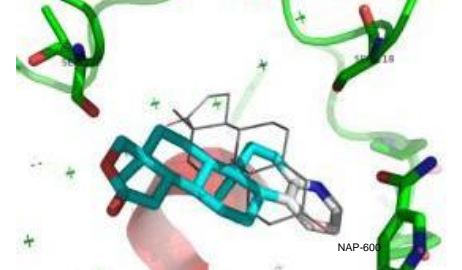
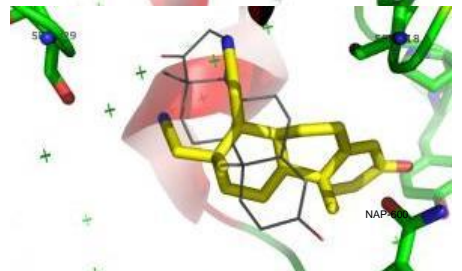
Слика 73. Кључне интеракције у везивању ибупрофена у активном месту АКР1С3; PDB ID: 3R8G.

Осам једињења која су у оквиру ове тезе показала инхибиторни потенцијал су усидравана у структуру AKR1C3 са PDB-а (PDB ID: 1ZQ5) добијену кристалографијом, дифракцијом X-зрака, структура је похрањена у комплексу са стероидним лактонским инхибитором EM1404 (Сл. 81). Ова структура је одабрана за усидравање из разлога што је наведени лиганд стероидни дериват који је по основној структури сличан једињењима која су тестирана у оквиру ове тезе. У анализи усидравања, рецептор је представљен као ригидан молекул без флексибилности бочних ланаца аминокиселина. Симулација контролног усидравања је као резултат дала RMSD у вредности 0.812 Å и енергију везивања $-12,27 \text{ kcal mol}^{-1}$. Андростенедион, супстрат протеина AKR1C3, је послужио за унакрсно усидравање у овој структури, као резултат добила се енергија везивања у вредности $-9,47 \text{ kcal mol}^{-1}$, која је коришћена као референтна вредност за меру јаког везивања (Savić et al., 2018). Табеларно су приказане најниже добијене вредности енергије везивања за инхибиторе са сликом потенцијалних интеракција у активном месту са оријентацијом која је имала најнижу енергију везивања (Табела 11).

Табела 11. Енергије везивања за једињења са најбољим инхибиторним потенцијалом и њихова оријентација са најмањом енергијом везивања у активном месту AKR1C3 протеина.

Инхибитор и енергија везивања (kcal mol^{-1})	Потенцијалне интеракције/ коментар	Слике потенцијалних интеракција
AKR-2 -11,38	Серин 129 Пролин 318 ≈EM1404 90° наспрам NADP	
AKR-1 -10,80	Хистидин 117 Серин 118 Серин 129 Аспарагин 167 NADP	

Наставак Табеле 11.

AKR-7	-10,69	Серин 118 Серин 129 NADP	
AKR-3	-10,32	Серин 118 Серин 129 NADP ≈EM1404 (зелено)	
AKR-9	-10,40	Серин 118 Серин 129 NADP	
AKR-19	-9,83	≈EM1404 90° наспрам NADP (сиво је АСД)	
AKR-22	-9,7	≈EM1404	

На основу табеле је могуће закључити да сви инхибитори на основу молекуларног усидравања показују бољу енергију везивања од забележене референтне вредности. Што се поклапа и са резултатима добијеним у ензимским есејима, на основу којих су ова једињења и издвојена као инхибитори.

Прегледањем оријентације и потенцијалних интеракција инхибитора са активним местом установљено је неколико хипотеза (ово је ипак рачунарско моделовање). Инхибитори се грубо могу поделити у три групе, прву групу чини и прво

једињење на листи - АКР-2 које је и једино једињење међу инхибиторима са пиколинилиден групом. Другу групу чине следећа 4 једињења (АКР-1, 7, 3 и 9) која имају пиколил групу и последња група су последња два једињења (АКР-19 и 22) која немају структурне сличности са претходне две групе.

Друга група која је и најбројнија се дакле, карактерише присуством пиколил групе, која је за разлику од пиколинилиден врло флексибилна и због тога омогућава боље „увлачење“ лиганда за разлику од пиколинилидена, али са друге стране баш та флексибилност за нијансу и повећава енергију везивања. Оријентација једињења са пиколил групом који су имали најниже енергије везивања су међусобно поређени и установљено је постојање сличности у положају у односу на протеинско окружење. Сва пиколил једињења имају оријентацију и положај сличан једином стероидном инхибитору на PDB - EM1404 (PDB ID: 1ZQ5) и могу да формирају баш исте везе као и инхибитор, дакле са серином 118 и 129, јер су и приближно исте дужине као EM1404. Међусобна разлика једињења у оквиру ове групе је углавном само у функционалној групи на C3 атому А прстена, осим између АКР-3 и -9 који се разликују у положају двоструке везе из прстена А у прстен Б, што се и види међусобно најмањом разликом у енергији везивања. Једињења из преосталих група имају сличан положај међусобно у односу на кофактор, односно попреко су постављени у односу на кофактор и тако као да га својом структуром изолују од потенцијалних других контаката.

Међутим, оно што посебно треба узети у обзир је чињеница да је везивање лиганда у *in vivo* условима тесно повезано са конформационим променама самог активног и везног места. Присуство бројних везујућих места, велике флексибилности везујућег места и потенцијал за ефекат „индукованог уклапања“ у случају АКР1С3 значи да резултате *in silico* симулација треба пажљиво интерпретирати и повезати са доступним *in vitro* и структурним подацима да би се идентификовали инхибитори АКР1С3. Међутим, све наведено не умањује значај молекуларног усидравања као добре методе за предвиђање и филтрирање једињења која имају потенцијал за даље експериментално тестирање.

9.3.3. Кинетичке карактеристике једињења која су показала инхибиторни потенцијал

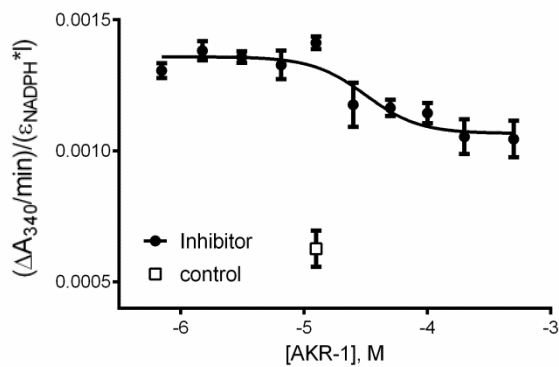
Одређивање K_i и IC_{50} . IC_{50} представља концентрацију инхибитора која инхибира 50% активности протеина, добија се тестирањем различитих концентрација инхибитора при константној концентрацији супстрата. K_i је равнотежна константа и као таква представља константну вредност одређеног једињења са ензимом, док IC_{50} представља релативну вредност чија магнитуда зависи од концентрације супстрата као и количине ензима која се користи у есеју. Сматра се да је добар инхибитор онај који има K_i вредност у nM опсегу. Међутим како је већ наведено у претходим поглављима ове тезе, IC_{50} је параметар који је у биомедицини чешће користи за изражавање инхибиторне јачине тестираних једињења (Табела 12).

У табели 12 су приказане вредности за IC_{50} мерене са различитим концентрацијама супстрата, где се може видети разлика у вредностима самог параметра у односу на концентрацију коришћеног PQ. Десне вредности су добијене када је PQ имао концентрацију једнакој K_m . Да би се добијене вредности поредиле са литературом неопходно је да експеримент буде спроведен под истим условима са истим концентрацијама, што је прилично тешко, али оно што може да се закључи о веродостојности експеримента ове тезе, јесте вредност која је добијена за IBU јер је кроз прегледање литературе установљено да су вредности исте или у истом опсегу реда величине. У поређењу са осталим вредностима из табеле може да се види да су и оне у истом реду величина као и за ибупрофен. С тим да најниже вредности има **AKR-7**, што га квалификује као најјачег инхибитора у датим условима.

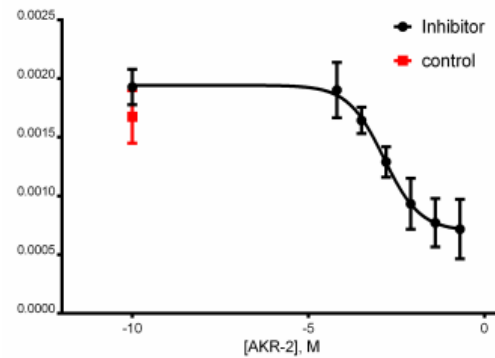
Табела 12. Приказ вредности кинетичких параметара за неке од најбољих инхибитора и графички прикази различитих мерења IC_{50} вредности.

Једињење	K_i (μM)	Тип инхибиције*	Процент инхибиције ^{&}	IC_{50} (μM)	
				PQ: 50	0.4 μM
IBU	16.56		75	9.9**	
AKR-1	2.1 ± 0.5	НК	75.65 ± 1.89	/	31.69
AKR-2	13.16 ± 2.8	НК	$60.12 \pm 1.78^*$	1.4	/
AKR-3	/	нд	49.43 ± 2.09	/	/
AKR-7	0.76 ± 0.19	НК	84.93 ± 5.62	/	14.44
AKR-9	/	нд	48	/	/
AKR-19	/	нд	64.35 ± 1.02	34.2	18.15

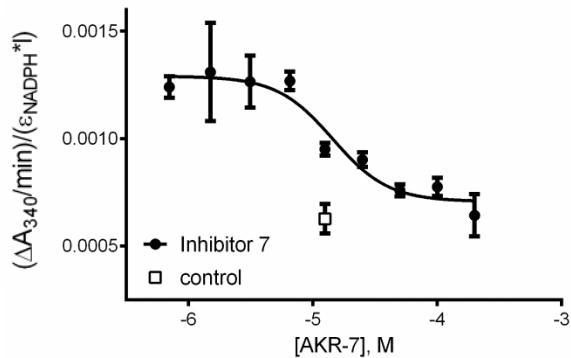
*НК-некомпетитивна, & - финална концентрација $6,25 \mu\text{M}$, ** (Burns et al., 2011), / - није тестирано, нд - није детерминисано, за детаље рачунања K_i и инхибиције погледати поглавље 8.11.2.



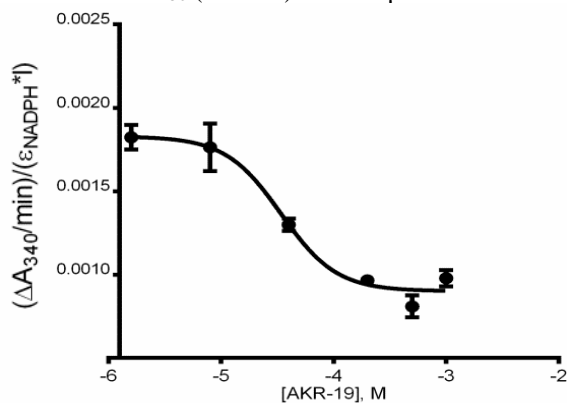
IC_{50} (AKR-1) = 31.69 μM



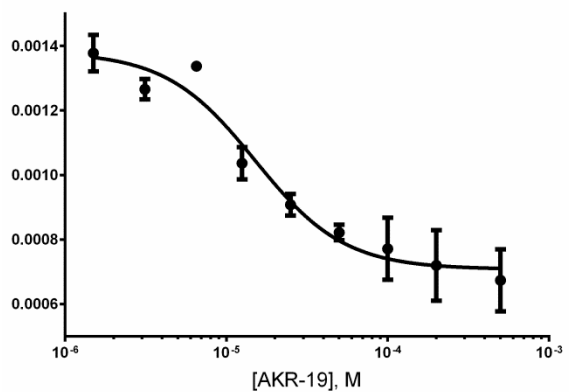
IC_{50} (AKR-2) = 1.4 μM



IC_{50} (AKR-7) = 14.44 μM



IC_{50} (AKR-19) = 34.2 μM



IC_{50} (AKR-19) = 18.15 μM

9.3.4. Упоредивање резултата са литературним подацима о тестираним једињењима

Једињења коришћена у оквиру истраживања теме овог доктората су углавном већ публикована када су први пут и синтетисана. У оквиру тих публикација поред процеса синтетисања објављена су и додатна истраживања која су у молекуларно-биолошком смислу спроведена. Додатна истраживања су најчешће обухватала цитотоксичност синтетисаних једињења, инхибиторне карактеристике и рачунарско молекуларно усидравање у оквиру новијих радова. У табели 13 су приказане упоредо вредности за најбоље тестиране инхибиторе из различитих експеримената из литературе са вредностима за иста једињења која су добијена као резултат експеримената у оквиру ове дисертације.

Табела 13. Упоредни приказ различитих вредности из различитих експеримената из литературе и из експеримената у оквиру ове дисертације за најбољих 7 једињења.

Једињење	Инхибиција % или IC ₅₀ (μM)				Енергија везивања мол. усидравања		IC ₅₀ (μM) ћелијске културе		
	СYP17 %	17βHSD	СYP19	AKR1C3 %	СYP17	AKR1C3	PC-3	MRC-5	Друге значајне линије
AKR-1	-10.9±8.9*	37.6±1.1*	51.5±0.3*	75.65 ± 1.89	НВ ^α	-10.80	>100**	>100**	>100**
AKR-2	14.4±5.0*	18.9±4.8*	67.9 ± 0.9*	60.12 ± 1.78	-12.19 ^α	-11.38	12.9**	>100**	>100**
AKR-3	69±12 ^Δ	/	/	49.43 ± 2.09	/	-10.32	22.3 ^β	>100 ^β	MDA 3.8, HeLa 26.9 ^β
AKR-7	/	/	/	84.93 ± 5.62	/	-10.69	/	/	/
AKR-9	/	63±5 ^δ	-28.9±15.7*	48	НВ	-10.40	6.3**	>100**	/
AKR-19	/	/	/	64.35 ± 1.02 ^γ	/	-9.83	>100 ^γ	>100 ^γ	MDA-MB-231 9.13, HeLa 11.77 ^γ
AKR-22	/	/	/	66.21 ± 1.35	-10.09 ^π	-9.70	70.85 π	>100 π	MDA 0.11, MCF 0.52 HeLa 12.49 π

Вредности за AKR1C3 су резултати експеримената у оквиру ове дисертације; Ћелијске линије: MRC-5 – неканцерогена, PC-3 – канцера простате, MDA-MB-231 – епител канцера дојке, HeLa – канцер цервикса, MCF – канцера дојке, НВ – нема везивања, / – нема података, црвено – значајне вредности. *(Penov-Gaši et al., 2007), **(Djurendić et al., 2008), ^Δ(Kovačević, Podunavac-Kuzmanović, Jevrić, Djurendić, & Ajduković, 2014), &(Ajduković et al., 2013), ^β(Djurendić et al., 2012), ^Δ(Szabó et al., 2015), ^γ(Savić et al., 2018), ^π(Nikolić et al., 2015)

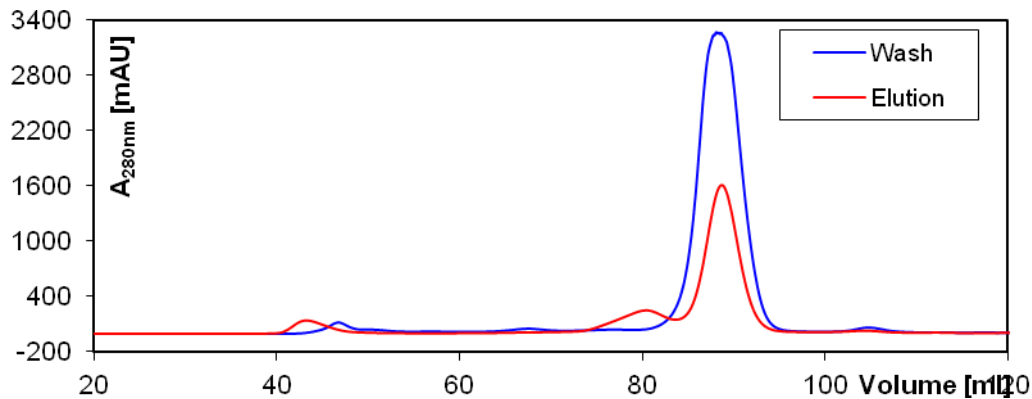
У табели су приказане и вредности за СYP17 (17,20-лијазу) и СYP19 (ароматазу), као додатна два кључна ензима у процесима стероидогенезе (Сл. 8 и 18), поред тога приказан је и преглед потенцијалних инхибиторних својстава тестираних једињења за најбољим инхибиторним потенцијалом у оквиру ове тезе. **AKR-1** се најбоље показао као инхибитор лијазе, **AKR-2** такође као добар инхибитор лијазе и поред тога као добар инхибитор у ћелијској култури PC3 канцера простате, за **AKR-7** нема литературних података ове врсте јер је у литератури представљао смешу изоформи као међуједињење у даљој синтези. У инхибицији ћелијске културе PC3 канцера простате посебно се добро издвојило једињење **AKR-9**. На основу прегледа вредности у табели 13 и инхибиторних својстава истих једињења према AKR1C3,

једињење **AKR-2** се посебно издвојило. На основу података се испоставило да **AKR-2** инхибира ћелије РС3 канцера простате, али као потенцијални разлог тога могу да буду баш инхибиторна својства према AKR1C3 и CYP17, који представљају једне од циљних мета у терапијама канцера простате и као такав инхибитор AKR-2 би могао да се сматра потенцијалним дуалним инхибитором, односно једињење које може да успешно инхибира два циљна ензима у терапијама!

9.4. Кристализација AKR1C3

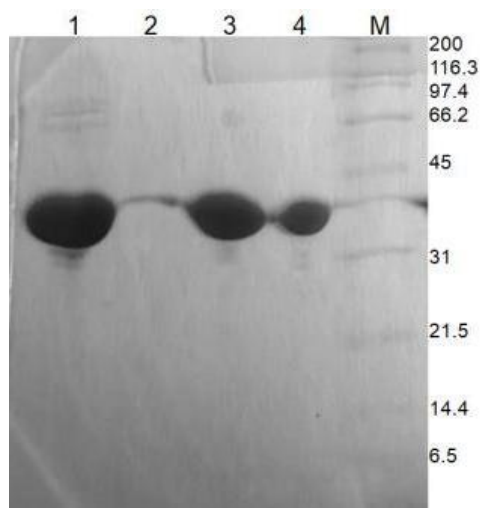
9.4.1. Чистоћа и хомогеност узорка

Експерименти кристализације протеина су рађени са експресованим AKR1C3 протеином са рЕТ28b(+) вектора. Протеин је обележен са N-терминалним хексахистидинским обележивачем, а између секвенце обележивача и протеина се налазила препознавајућа секвенца за тромбин. Протеин је пречишћен комбинацијом никл и гел-филтрационе колоне са приносом од 20 mg по 1 L бактеријске културе. На основу гел-филтрационе колоне (Сл. 74), протеин је у мономерном облику, што и представља биолошки облик протеина (Penning et al., 2000).



Слика 74. Аналитичка гел-филтрација AKR1C3 протеина (црвена линија) са једним врхом на 88,9 ml.

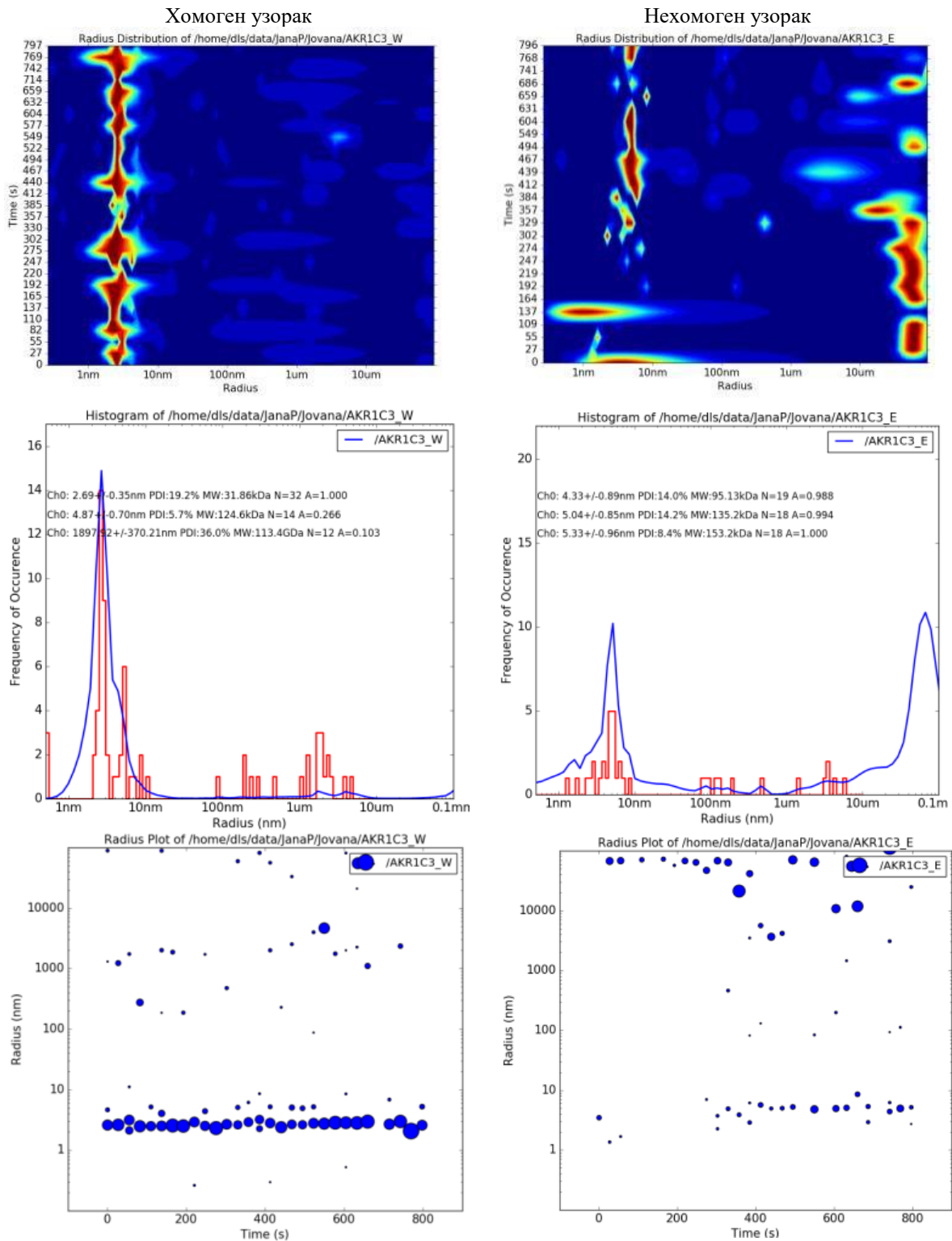
Чистоћа протеина је била >95%, што је установљено Coomassie Blue бојењем SDS-PAGE гела (Сл. 75).



Слика 75. Чистоћа протеина AKR1C3 припреманог за кристализацију после гел-филтрационе колоне. 1 – узорак пре гел-филтрационе колоне, 2 – проточна фракција, 3 – узорак после колоне и 4 – дуplo разблажени узорак број 3. М – маркер, бројеви са десне стране су изражени у kDa.

Да би се установила хомогеност протеинског узорка у раствору, коришћена је метода динамичког расипања светлости (DLS) (Сл. 76). DLS анализе се користе рутински у биолошким лабораторијама да би се детектовало присуство агрегата у макромолекуларним растворима, затим да би се установила величина протеина, нуклеинских киселина и комплекса или чак и за праћење везивања лиганда. Метода је заснована на чињеници да померање молекула воде помера и молекуле који су растворени у води. Карактеристика оваквог Брауновог кретања је да се мали молекули померају брже од већих молекула. Након зрачења са видљивом монохроматском светлошћу мала фракција светлости је дифрактивана. Интензитет те дифрактоване светлости се мења у временски зависном маниру због константне промене у дистанци између партикула. Ово доводи или до конструктивне или деструктивне интерференције. Интензитет флукуације снимљен током анализе садржи информацију о временској скали померања дифракције. „Распадање“ корелације је директно повезано са померањем партикула и самим тим са њиховом димензијом (Lorber, Fischer, Bailly, Roy, & Kern, 2012).

Слика 76. Приказ хомогеног и нехомогеног узорка протеина AKR1C3 припремљеног за кристализацију и проверено употребом DLS-а.



Узорак који се показао као хомоген приликом DLS анализе је настављен да се користи за даљу поставку за кристализацију. Мање хомоген (нехомоген) узорак је коришћен за покушаје ручне поставке кристализације.

9.4.2. Хистидински обележивач протеина и *in situ* протеолиза

У претходним радовима је углавном AKR1C3 конструктор са N-терминалним хистидинских обележивачем коришћен за ензимске есеје, док се за структурна истраживања користио конструктор са хистидинима на C-терминалном крају (Jamieson et al., 2012). Само три од 43 структуре AKR1C3 на PDB-у су решене употребом конструктора са N-терминалним хистидинима са резолуцијама 2,0 Å и 2,3 Å, Табела 14 (Zhao et al., 2015), док је 29 структура решено употребом C-терминалних хистидина са опсегом резолуција од 1,2 Å (Lovering et al., 2004) до 2.8 Å. Три структуре су решене употребом GST обележивача који је био отклоњен пре кристализације (Qiu et al., 2007, 2004), док су преостале решене структуре пореклом од необележеног протеина.

Дакле, у овом истраживању је модификована метода *in situ* протеолизе која је иначе коришћена за неспецифично одвајање/пресецање неструктурираних продужетака или фелксибилних делова протеина са циљем да се побољша кристализација (Dong, Xu, & Edwards, 2007; Wernimont & Edwards, 2009). Употребом тромбина за пресецање специфичне препознавајуће секвенце за тромбин је *in situ* одстрањен N-терминални хистидински обележивач у експерименталним поставкама за кристализацију. Ово представља практичан приступ како временски тако и финансијски у односу на стандардне начине отклањања обележивача у којима се користи велика количина хистидином обележеног тромбина и у којима је неопходан још један корак пречишћавања.

Табела 14. Хронолошки и упоредни приказ структура на AKR1C3 на PDB, са информацијама о резолуцији, обележивачу, вектору и просторној групи.

Аутор и година	PDB	Резолуција	Обележивач	Вектор (плазмид)	Просторна група
Komoto et al. 2004.	1RY8	1.69		pUC-hLuFS	P1
	1RY0	1.69			
Lovering et al. 2004	1S2C	1.8		pET21b	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
	1S2A	1.7	C-His6		P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
	1S1R	2.0			P3 ₂ 2 1
	1S1P	1.2			P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Qiu et al. 2004.	1XF0	2.0		GST	P6 ₃
Komoto et al. 2006.	2F38	2.0	Нема	pUC-hLuFS	P1 2 ₁ 1
Qiu et al. 2007	2FGB	1.35	GST		P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
	1ZQ5	1.3			

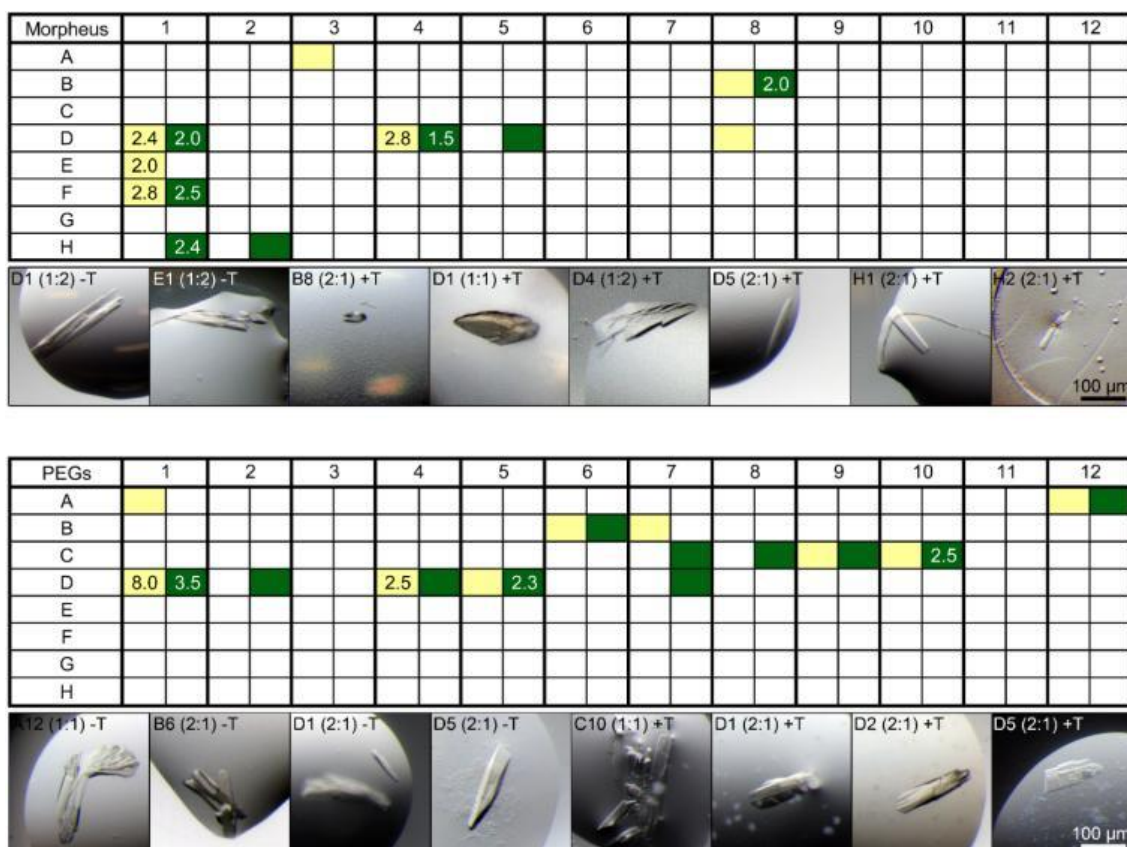
Наставак Табеле 14.

Chen et al. 2012/3	4DBU	2.53	нема		P1
	4DBS	1.85			
	3R58	2.3			
	3R43	2.0			
	3R94	2.01			
	3R8H	1.9			
Flanagan et al. 2012	3R8G	1.8	C-His6	pET21b	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
	3R7M	2.1			
	3R6I	1.95			
	3UGR	1.65			
	3UG8	1.73			
	3UFY	1.9			
	3UWE	1.68			
Jackson et al. 2012.	4FAM	2.0			P1 2 ₁ 1
Jamieson et al. 2012	4FAL	2.0	C-His6	pET28a	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
	4FA3	2.2			
Liedtke et al. 2013.	4DBW	1.8	нема	pET16b, huPGHS-1+His6	P1
Heinrich et al. 2013.	4H7C	1.97	C-His6		P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Flanagan et al. 2014.	4HMN	2.4	C-His6	pET21b?	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
	4XVE	1.55			
	4XVD	2.81			
Amano et al. 2015.	4WDX	1.64	C-His6	pET22	P1 2 ₁ 1
	4WDW	1.94			
	4WDU	1.7			
	4WDT	1.5			
	4YVV	2.3			
Zhao et al. 2015	4ZFC	2.0	N-His6	FulenGene Co.	P1
	4YVX	2.3			
Није публиковано					
Squire 2013	4DZ5	1.7			P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Yosaatmadja 2014	4WRH	1.6			P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Li 2017	5HNU	2.0			P1 2 ₁ 1
	5HNT	2.0			
He 2017	5JM5	1.99			P1 2 ₁ 1
Squire	3QUU	/			

9.4.3. Утицај *in situ* протеолизе хистидинског обележивача на морфологију кристала

Два сета кристализационих услова су постављени употребом PEGs Suite (Qiagen, USA) и Morpheus (Molecular Dimensions, Ltd., UK) са AKR1C3 са и без присуства тромбина, моларни однос AKR1C3 и тромбина је био 280:1. Потенцијални

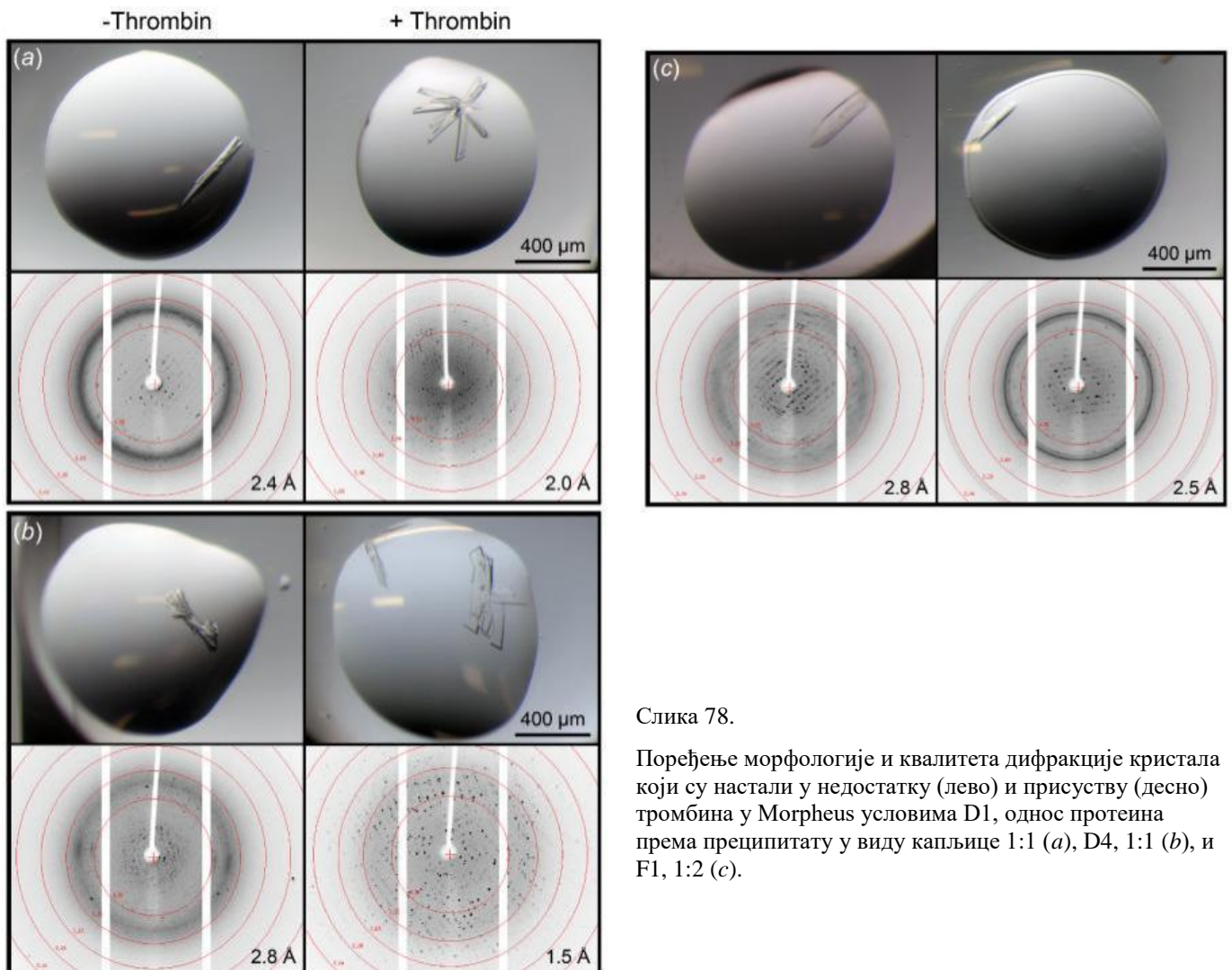
кристалizacionи услови су прегледани у бројним условима у оба сета кристалizacionих услова и већина кристала се појавила преко ноћи (Сл. 77). Није била значајна разлика у броју услова у којима су добијени кристали између услова са и без тромбином (17, односно 16, редом, Ф1). Међутим кристали су се визуелно разликовали у морфологији у зависности од присуства или одсуства тромбина. У неким од услова појавили су се кластери микрокристала у облику игли, док су други услови формирали велике кристале погодне за сакупљање („пецање“). Кристали су углавном били тродимензионални, издужени и често са већим бројем центара нуклеације (Сл. 77, 78). Кристали који су израсли из узорка третираног са тромбином су визуелно имали мање слојева нуклеације. Ови кристали су такође били лакши за одвајање од кластера током пецања или им је бар била лакша поставка монокристалног дела наспрам снопа X-зрака за анализу дифракције.



Слика 77. Резултати изналажења кристалizacione из Морфеус (горе) и PEGs Suite (доле). Представљен је шематски приказ кристалizacione плоче; боја представља бунаре који су имали кристале уз одсуство (жуто) и присуство (зелено) тромбина. Вредности у одређеним бунарима представљају најбољу постигнуту резолуцију (Å) у тестовима дифракције на сакупљеним кристалима. Репрезентативне слике кристала су приказане испод шема, обележене бројем бунара, запреминским односом протеина према преципитанту (1:2, 1:1 или 2:1) и одсуством (-Т) или присуством (+Т) тромбина.

9.4.4. Утицај *in situ* протеолизе хистидинског обележивача на квалитет дифракције

Сви кристали који су били упецани су монтирани у петље, крио-заштићени уколико су расли у PEGs Suite и охлађени у течном азоту. Сви успешно сакупљени кристали су тестирани на снопу X-зрака на лабораторијском дифрактометру. Кристали који су израсли у присуству тромбина су формирали слике дифракције са генерално бољим карактеристикама на основу визуалног поређења. У суштини узорци са тромбином су имали вишу резолуцију, бољи облик тачака и вишу преваленцу тачака једне кристалне решетке што је олакшало индексирање дифракционих тачака.



Слика 78.

Поређење морфологије и квалитета дифракције кристала који су настали у недостатку (лево) и присуству (десно) тромбина у Morpheus условима D1, однос протеина према преципитату у виду капљице 1:1 (a), D4, 1:1 (b), и F1, 1:2 (c).

Кристали који су израсли у PEGs Suite систему су морали бити крио-заштићени, тако да је то могло да утиче на квалитет дифракције. Кристали који су израсли у Morpheus комплекту нису захтевали додатну заштиту (Gonges, 2009), а неки од услова у истом комплекту су формирали кристале и у присуству и у одсуству тромбина. Тако да

је на основу тога било могуће направити директно поређење морфологије кристала и квалитета дифракције у неколико случајева (Сл. 78). Ово поређење јасно приказује да је *in situ* отклањање хистидинског обележивача са одређеном количином тромбина резултовало бољом морфологијом кристала и бољим квалитетом дифракције у смислу лимита резолуције, величине тачака и њиховог облика.

9.4.5. Ефективност *in situ* тромбинске протеолизе у растворима преципитаната

Кристализациони услови углавном садрже мешавину различитих преципитаната, подразумевајући високу концентрацију соли и полиалкохола велике молекуларне тежине и слично. Обзиром да ови услови не омогућавају оптималне услове за рад тромбина, кристали који су израстали у Morpheus условима и који су третирани тромбином *in situ* су анализирани Едмановим N-терминалним секвенцирањем. Резултати секвенцирања заједно са саставом одговарајућег кристализационог услова је приказан у Табели 15. Контролно секвенцирање је урађено на узорку који није третиран тромбином и добијена је секвенца 'GSSHHHHHHSSG', која одговара N-терминалном His₆-обележивачу. После секвенце His-обележивача следи секвенца LVPRGSH, која би требала да буде пресечена тромбином између R и G. Анализа резултата кристализације јасно указује да је тромбин ефикасно уклонио *in situ* His-обележивач у кристализационом коктелу. Очекује се да овај приступ може да буде генерално применљив за конструкте добијене са рЕТ28(+) вектора.

Табела 15. Едманово секвенцирање AKR1C3 кристала израсталих/насталих у присуству тромбина

Број бунара	Садржај кристализационих раствора	N-терминална секвенца [§]
D1	10% w/v PEG 20 000, 20% v/v PEG MME 550, 0.02 M сваког алкохола (1,6-хександиол, 1-бутанол, (RS)-1,2-пропандиол, 2-пропанол, 1,4-бутандиол и 1,3-пропандиол), 0.1 M MES/имидазол рН 6.5	GSHMDSxQQxV
D4	12.5% w/v PEG 1000, 12.5% w/v PEG 3350, 12.5% v/v MPD, 0.02 M сваког алкохола (1,6-хександиол, 1-бутанол, (RS)-1,2-пропандиол, 2-пропанол, 1,4-бутандиол, and 1,3-пропандиол), 0.1 M MES/имидазол рН 6.5	GSHxDSxQ
F1	10% w/v PEG 20 000, 20% v/v PEG MME 550, 0.02 M сваког моносахарида (D-глукоза, D-маноза, D-галактоза, L-фукоза, D-ксилоза и N-ацетил-D-глукозамин), 0.1 M MES/имидазол рН 6.5	GSHMDSxQQxV

[§]Резидуе обележене са x није било могуће идентификовати, метионин одговара првој аминокиселини од AKR1C3, а претходне три – GSH, представљају резидуе које остају након пресецања са тромбином.

9.4.6. Решавање структуре

Кристали који су добијени из бунара D1 из Morpheus сета (Табела 15) су дифрактовали до резолуције од 2.0 Å на дифрактометру у лабораторији, а накнадно су анализирани употребом синхротронског зрачења и постигли дифракцију резолуције 1,5 Å. Дифракциони подаци су сакупљени на температури од 100 К на MX 14.1 руковођеним од стране Joint Berlin MX-Laboratory (BESSY II electron storage ring, Berlin-Adlershof, Немачка) (Gerlach et al., 2016). Статистика сакупљених дифракционих података је приказана у Табели 16, а поређењем са другим структурама установљено је да су параметри елементарне ћелије исти или врло слични.

Табела 16. Статистика сакупљених дифракционих података
Вредности у заградама представљају највишу постигнуту резолуцију

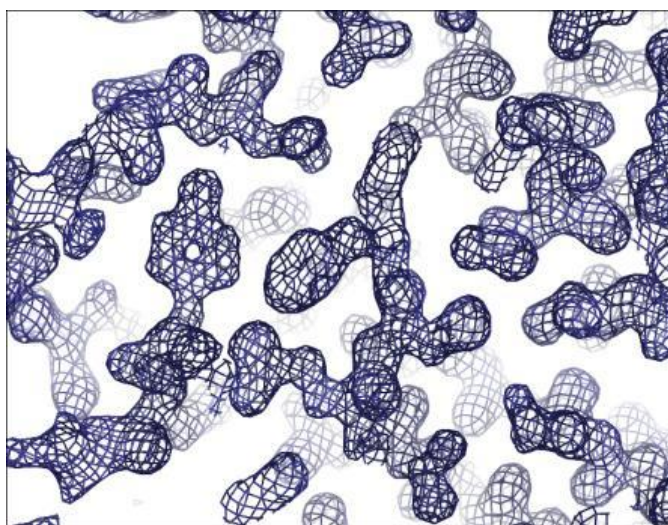
Таласна дужина (Å)	0.9184
Просторна група (<i>енгл.</i> space group)	<i>P</i> 1
Параметри елементарне ћелије	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	39.36, 51.43, 75.96
α , β , γ (°)	76.88, 84.26, 77.69
Лимит резолуције (Å)	45.59-1.50 (1.54-1.50)
Број јединствених рефлекција	87,396 (5,588)
Комплетност (%)	96.3 (83.4)
Мултиплицитност (<i>енгл.</i> multiplicity)	3.3 (2.8)
Просек $I/\sigma(I)$	4.07 (0.76)
R_{meas} (%)‡	17.0 (89.1)
$CC(1/2)$ §	98.6 (53.6)
Генерални <i>B</i> фактор из Вилсоновог плота (Wilson plot) (Å ²)	25.76

‡ $R_{\text{meas}} = \sum_{hkl} \{N(hkl)/[N(hkl) - 1]\}^{1/2} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, где је $I_i(hkl)$ и $\langle I(hkl) \rangle$ су детектовани и просечни интензитети, редом, и *N* је производ рефлекција *hkl*. § Персонов коефицијент корелације детерминисан на основу сета података насумично подељених на пола.

Подаци су сакупљени до највише резолуције од 1,5 Å. Само 4 структуре од 43 AKR1C3 структуре на PDB имају исту или бољу од наведене. Ово подразумева две структуре које су детерминисане (решене) употребом конструкта са С-терминалним His-обележивачем (Lovering et al., 2004) и две структуре које су решене коришћењем GST-обележивача, где је GST отклоњен пре кристализације (Amano, Yamaguchi, Niimi, & Sakashita, 2015). Једна од свега неколико AKR1C3 структура је решена употребом конструкта са N-терминалним His-обележивачем, најбоља публикована резолуција је

2,0 Å (Zhao et al., 2015). Већина AKR1C3 структура на PDB, са резолуцијом од или испод 1,5 Å, припада просторној групи (енгл. space group) $P2_12_12_1$. Кристали добијени овим истраживањем поседују симетрију $P1$ просторне групе, што представља другу најприсутнију просторну групу AKR1C3 присутну у 9 AKR1C3 структура у PDB-у. Све структуре добијене од N-His-обележеног AKR1C3 конструкта припадају просторној групи $P1$ (Zhao et al., 2015), међутим генерално боље решене $P1$ структуре су добијене употребом необележеног протеина са најбољом резолуцијом од 1,69 Å (Chen et al., 2012; Komoto, Yamada, Watanabe, & Takusagawa, 2004; Liedtke et al., 2013).

Триклинички (енгл. triclinic) кристали су садржали 37% раствора и два протеинска молекула у асиметричној јединици. Структура хуманог AKR1C3 у комплексу са NADP⁺ и потенцијалним AKR1C3 инхибитором (Plavša et al., 2018) је детерминисана до резолуције од 1,5 Å методом молекуларне замене употребом фаза изведених из претходно решених хуманих AKR1C3 структура доступних на PDB под шифром 1ZQ5 (Qiu et al., 2007). После иницијалног циклуса утачњавања R -фактор је спао на $R = 26.5\%$ и $R_{\text{free}} = 29.4\%$ и квалитет иницијалне мапе електронске густине (Сл. 79) приказује тачно решење за структуру.



Слика 79. Иницијална мапа електронске густине за AKR1C3. Приказана је мапа електронске густине $2F_o - F_c$ после првог циклуса утачњавања, контурисање на 1 σ .

Није даље настављено са утачњавањем модела из разлога што није детектована електронска густина која би указивала на присуство инхибитора у активном месту ензима.

Дакле, овим истраживањем је коришћена техника модификоване *in situ* протеолизе да би се специфично отклонио N-терминални His-обележивач од

рекомбинантног AKR1C3 протеина употребом тромбина током поставке експеримената за кристализацију. Приступ је резултовао кристалима са побољшаном морфологијом и квалитетом дифракције. Детерминисана је тродимензионална структура AKR1C3 протеина са просторном групом $P1$ са 1.5 \AA резолуцијом, што представља најбољу резолуцију постигнуту за AKR1C3 у овој кристалној форми. *In situ* протеолитичко отклањање His-обележивача употребом тромбина је једноставно и практична процедура која би могла генерално да буде применљива за кристализацију протеина експресованог са рЕТ28(+) вектора.

Поред наведеног, ови резултати представљају и прве протеинске кристале у чијој продукцији је учествовао српски тим.

9.5. Кокристалација AKR1C3 протеина са инхибиторима

Експерименти кокристалације као и кристалације су рађени у колаборацији са Лабораторијом за биохемију и структурну биологију на Институту за органску хемију и биохемију, Праг, Чешка. Метода кокристалације је коришћена да би се добила кристална структура комплекса протеина са лигандом. Ова метода функционише као стандардне методе кристалације осим што се лиганд може додати у различитим моментима рада са протеином. У случају овог истраживања, лиганди су се најчешће додавани 30-60 минута пре поставке протеина на плочу за раст кристала и држани за све то време на леду. Покушаји кокристалације су рађени са лигандима који су се показали у ензимским есејима са протеином AKR1C3 као најбољи инхибитори (Табела 10). Од осам инхибитора из наведене табеле кристали су добијени са свим инхибиторима осим са NSN једињењем. До сада (25. јул 2018) од преосталих 7 комплекса, за два су решене структуре са инхибитором у активном месту, за три комплекса није потврђено присуство инхибитора (лиганда) и преостала два још нису снимана (Табела 17). За решавање свих структура је коришћена метода молекуларне замене, где се као шаблон за замену користила структура са PDB-а. Тренутно на PDB постоји само једна структура са стероидним инхибитором и то још из 2005. године (PDB ID: 1ZQ5), с тога ови резултати представљају прве нове структуре са стероидним инхибитором после 2005. године за AKR1C3 протеин. Дакле, из разлога што је то једина структура са стероидним инхибитором, решено је да се баш она узме као шаблон за методу молекуларне замене. Методом молекуларне замене се заправо израчунава фазни проблем за израчунавање прелиминарне мапе електронске густине.

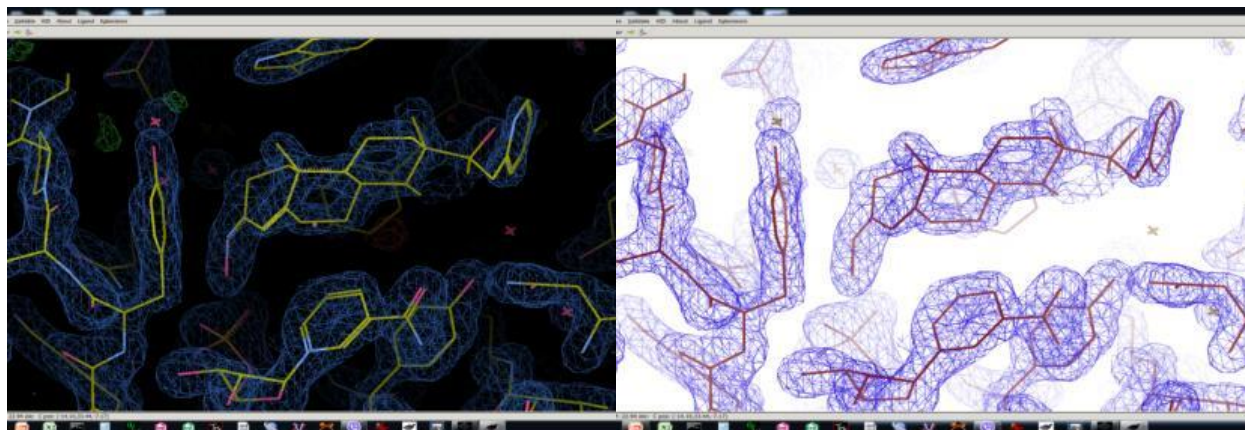
Табела 17. Списак тестираних инхибитора у кокристализацији, резолуција структуре и стање у везном месту.

Једињење	Резолуција (Å)	Везно место	Једињење	Резолуција (Å)	Везно место
AKR-1	1.5	Празно	AKR-2	/	/
AKR-3	/	/	AKR-7	1.7	
AKR-9	/	/	AKR-19	1.6	
AKR-22	1.7	Празно			

На основу решене структуре комплекса са лигандима **3** и **7**, установљена је разлика у оријентацији и положају у односу на природни лиганд и на наведени публиковани стероидни инхибитор.

9.5.1. Кристална структура комплекса AKR1C3·NADP⁺·AKR-7

Структура комплекса AKR1C3·NADP⁺·AKR-7 је решена са резолуцијом од 1.7 Å употребом молекуларне замене. Генерално, структура је слична другим кристалним структурама са ТИМ буретом, који је карактеристичан за алдо-кето редуктазе. Коначни модел обухвата два протеинска мономера у свакој елементарној ћелији, а сваки се састоји од свих аминокиселина 5-323 и са целом петљом у поређењу са другим PDB уносима којима недостаје (на пример у PDB 1ZQ5, у петљи недостају аминокиселине 131-133) која има јасну електронску густину што омогућава приказ свих аминокиселина, кофактора и једињења АКР-7, један молекул Вг (бром) и 609 молекула воде (Сл. 80).



Слика 80. Радна верзија утачњавања комплекса AKR1C3+ NADP⁺+AKR-7. Плава мрежа представља електронску густину AKR1C3 протеина са једињењем 7, а линије унутар мреже представљају уклопљену структуру аминокиселина и једињења.

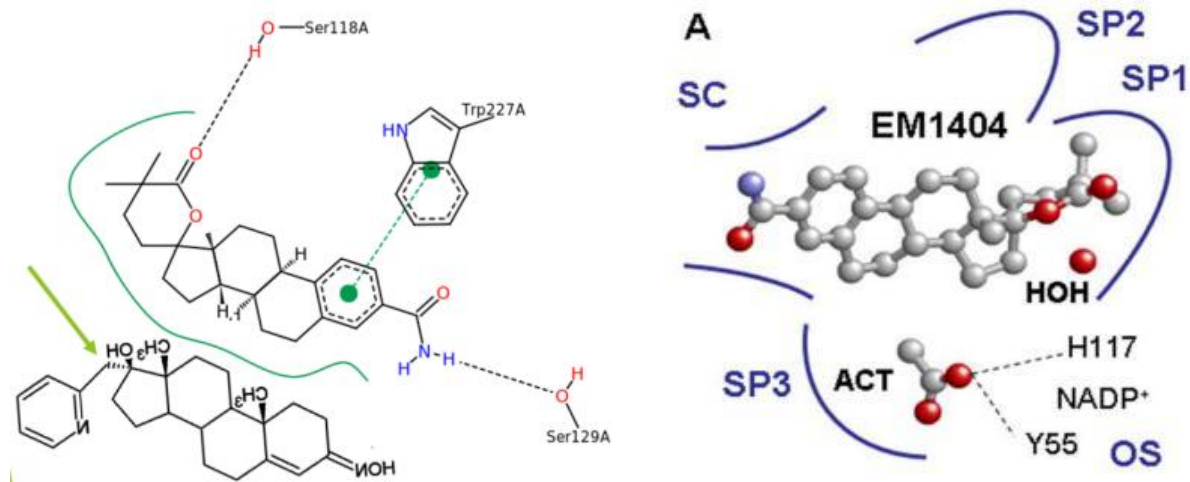
По један молекул једињења АКР-7 је присутан у сваком везујућем месту за стероиде. Интеракције једињења са протеином се могу поделити према топографији везног места на интеракције у оксианјон месту (OX), стероидном каналу (SC) и/или три подцепа (SP1, 2, 3). У оквиру оксианјон места једињење има врло специфичну позицију

у односу на кофактор, тако да А прстен стероидног језгра инхибитора је паралелан са никотинамидним прстеном кофактора, тако да HON= на C3 је усмерен ка позитивно наелектрисаном никотинамидном прстену, формирајући на тај начин потенцијалне наелектрисане интеракције (charge-charge interaction). У стероидном каналу су могуће π -(хидрофобне/ароматичне-ароматичне) интеракције $\sim 4.4 \text{ \AA}$, са очуваним триптофаном 227, који је паралелно постављен у односу на стероидно језгро инхибитора. Пиколил група инхибитора се простире у SP1 подцепу, са могућим интеракцијама са тирозином 319. SP2 има један молекул воде (37) који би могао бити координисан са аминокиселинама овог подцепа, такође тај молекул воде има могућност да формира и интеракције са ОН групом на C17 позицији инхибитора. Подцеп SP3 има два молекула воде (71 и 378) која могу да стварају интеракције са азотом у NOH делу на C3 положају инхибитора, поред тога А прстен инхибитора наведени положај може да заузима не само због никотинамидног прстена кофактора већ и због прстена тирозина 24 који је паралелан са А прстеном. Дакле, једна од опција је да је А прстен координисан са два друга прстена, један од ароматичног од тирозина (дистанца је 3-5 \AA), а један од пиридина од кофактора (4.5-5.5 \AA).

Поређење АКР-7 са ЕМ1404

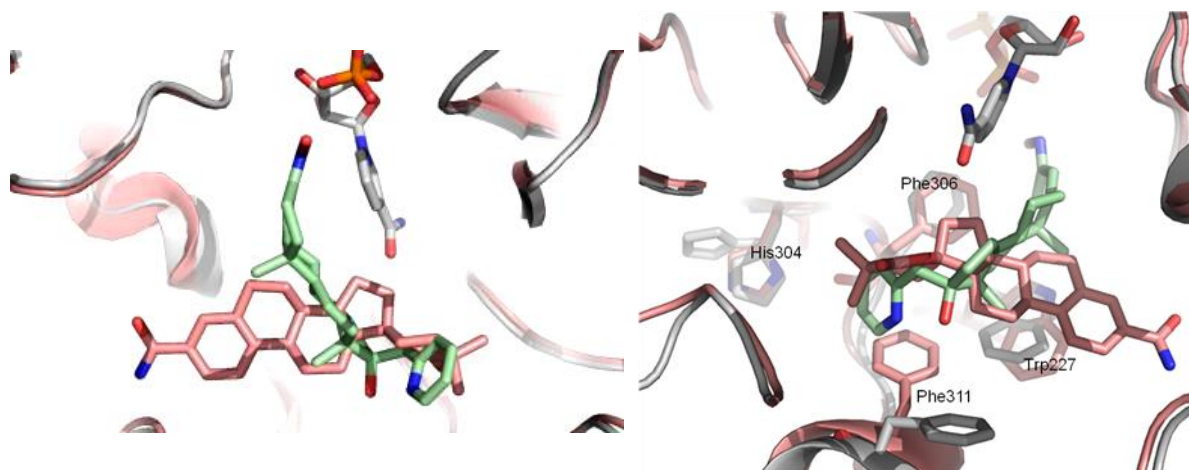
Инхибитор ЕМ1404 је до сада једини стероидни инхибитор на PDB-у у АКР1С3 протеину. Његова структура је већ приказана у оквиру Сlike 17, а у оквиру Сlike 24 је приказа оквиран положај у активном месту протеина. Једињење ЕМ1404 има структурну сличност са једињењем 7 и због тога је било очекивано да буде и слично везивање и оријентација у активном месту. Оба инхибитора имају четири основна стероидна прстена, на C3 имају додатке и додатни прстен на D прстену стероидног језгра (Сл. 81, лево).

Фланаган и сарадници су навели да добар инхибитор АКР1С3 има тенденцију заузимања SP1 подцепа (Flanagan et al., 2012), што се и види на примеру ЕМ1404, где се лактонски прстен и налази у оквиру подцепа SP1.



Слика 81. Структура инхибитора EM1404 са окружењем у активном месту AKR1C3. Лево: приказ структуре EM1404 са делом интеракције и са ротираним једињењем 7 испод, ради структурног поређења, зелена стрелица указује на флексибилну пиколлил групу. Десно: положај EM1404 у активном месту (Burns et al., 2011).

Препоклапањем наше структуре са 1ZQ5 (Qiu et al., 2007) неколико структурних и сличности и разлика је установљено. Прво, положај инхибитора је знатно другачији од очекиваног, односно окомито су постављени један према другом, на такав начин да је А прстен једињења 7 окренут ка кофактору, тако да се С3 А прстена пружа ка рибози (Сл 82). Исти крај EM1404 се налази у оквиру стероидног канала, потенцијалног канала за улазак стероида у везно место протеина. Међутим, флексибилност једињења 7 је можда омогућила једињењу да дубље уђе у шупљину и заузме наведени положај.



Слика 82. Положај једињења 7 и EM1404 (PDB ID 1ZQ5) у везујућем месту AKR1C3 после препоклапања. Зелено и бело – 7, розе – EM1404, горе – NADP⁺. PyMOL

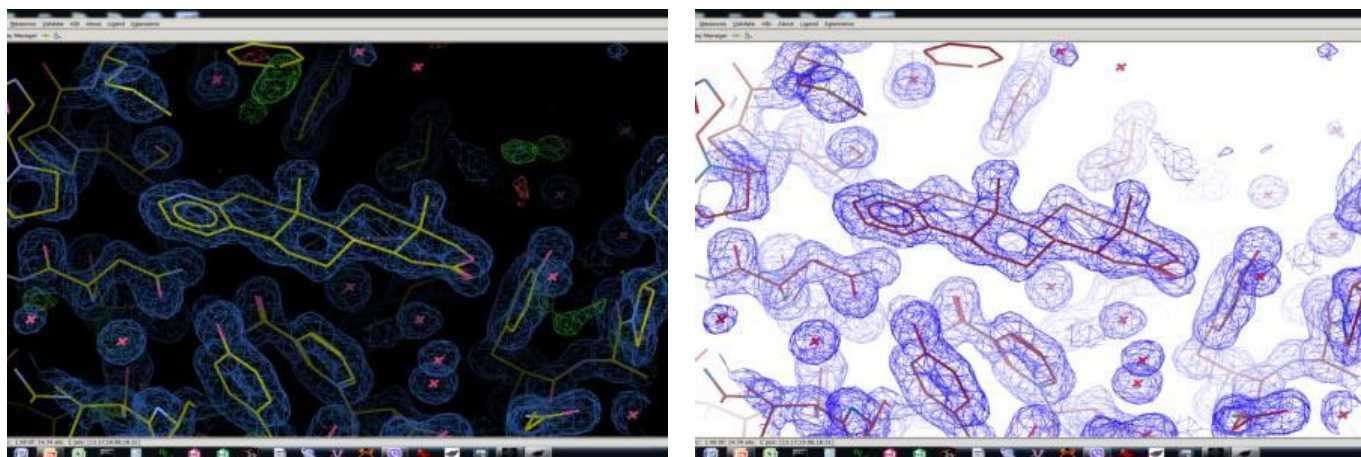
Поред наведене разлике, оба једињења ипак имају и нешто заједничко, а то је да прстен који је додат на D прстен стероидног језгра у оба случаја се налази у SP1 месту! Дакле, на овај начин је и поред ензимских есеја и структурно потврђено али и показано зашто ово једињење има инхибиторни потенцијал. Међутим, овде мора да се нагласи и

ограниченост употребе молекуланог усидравања. На Слици 82 се види да је пиколил група једињења 7 окренута на супротну страну од положаја кофактора, док је у случају предвиђања јачине везивања у оквиру поглавља 9.3.2. Табела 11, оријентација била скроз обрнута, бар за случај који је приказан у наведеној табели. Што иде у прилог наведеном да молекуларно усидравање је добро користити у комбинацији са додатним информацијама, попут публикованих радова.

Промена у везујућем месту AKR1C3 протеина се не огледа само у положајима инхибитора већ и оклоних аминокиселина, посебно оних које имају или каталитичко или физичко својство у функционисању ензима. Упоредивањем беле структуре на Слици 82 са розе (1ZQ5) бојом, виде се различите оријентације хистидина 117, фенилаланина 306 и 311 и триптофана 227. Триптофан и фенилаланин представљају аминокиселине са вишом хидрофобичношћу, дакле њихова оријентација је у сагласности са положајем који има већу удаљеност од стероидног, хидрофобног једињења који се налази унутар везујућег места

9.5.2. Кристална структура комплекса AKR1C3·NADP⁺·AKR-19

Структура комплекса AKR1C3·NADP⁺·AKR-19 је решена са резолуцијом од 1.6 Å употребом методе молекуларне замене (Сл. 83). И ова структура као и предходна је генерално слична свим структурама које имају TIM буре у својој структури, које представља и структурну карактеристику алдо-кето редуктаза. Коначна структура обухвата два протеинска мономера у свакој основној ћелији, сваки мономер се састоји од 5. до 323. аминокиселине и то без прекида, односно са електронском густином присутном у континуитету за све аминокиселине. Таква структура представља предност у односу на већину присутних на PDB којима понекад недостају неке од аминокиселина у флексибилним петљама (на пример у PDB 1ZQ5, у петљи недостају аминокиселине 131-133). Поред присутних 318 аминокиселина у континуитету, присутна је и јасна електронска густина за кофактор, и 663 молекула воде.

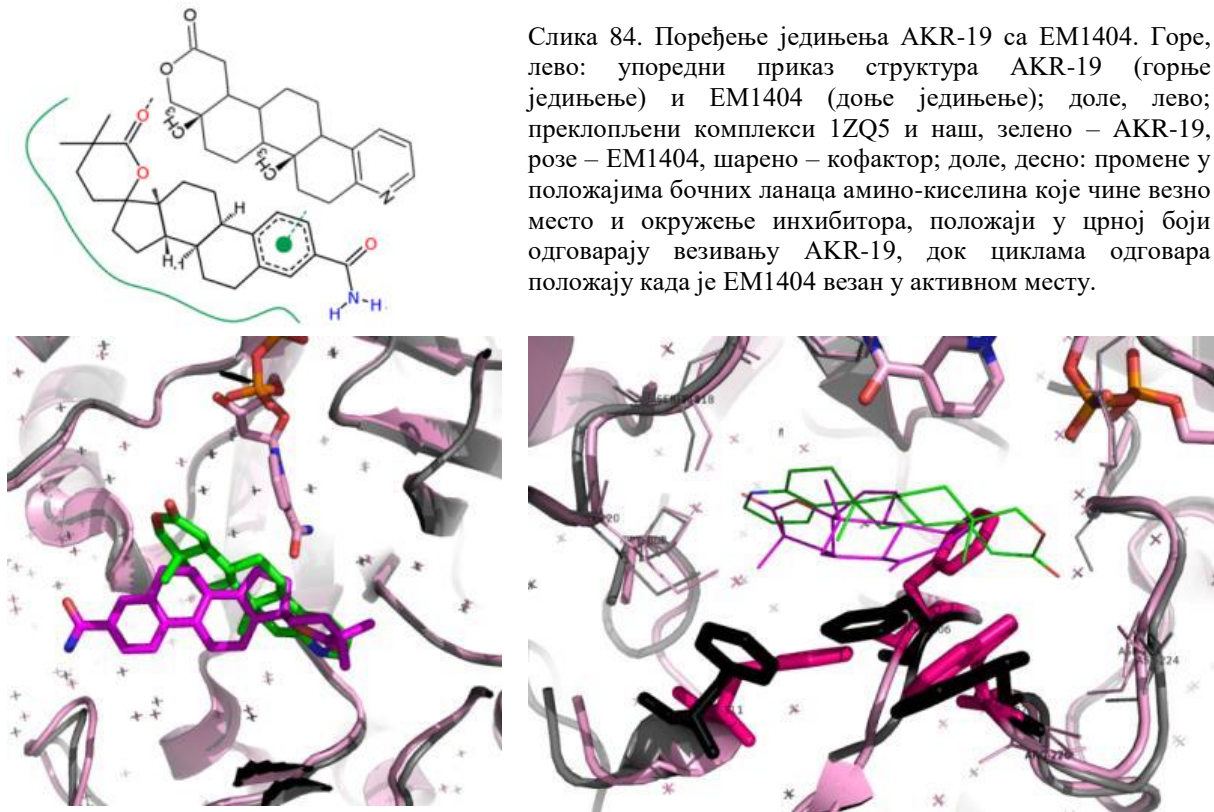


Слика 83. Радна верзија утачњавања комплекса $AKR1C3 + NADP^+ + AKR-19$. Плава мрежа представља електронску густину $AKR1C3$ протеина са једињењем $AKR-19$, а линије унутар мреже представљају уклопљену структуру аминокиселина и једињења $AKR-19$, PyMOL.

По један молекул једињења $AKR-19$ је присутан у сваком везујућем месту за стероиде. Интеракције једињења са протеином се могу поделити према топографији везног места на интеракције у оксианјон месту (OX), стероидном каналу (SC) и/или три подцепа (SP1, 2, 3). У оквиру оксианјон дела везујућег места инхибитор је далеко од каталитички битног тирозина 55 али и хистидина 117. Што се тиче стероидног канала, инхибитор је у релативно паралелном положају са прстеновима C и D у односу на положај триптофана 227, што иде у прилог постојању потенцијалних хидрофобних ароматичних интеракција. Подцеп SP1 је окупиран пиридинским прстеном (који је фузионисан са A прстеном) инхибитора. SP2 је празан осим постојања једног молекула воде (476) и слично је за SP3 који такође садржи један до два молекула воде. Потенцијална интеракција која би могла да стабилизује положај инхибитора у везном месту је између кето групе лактонског прстена инхибитора и аспартата 224.

Поређење $AKR-19$ и $EM1404$

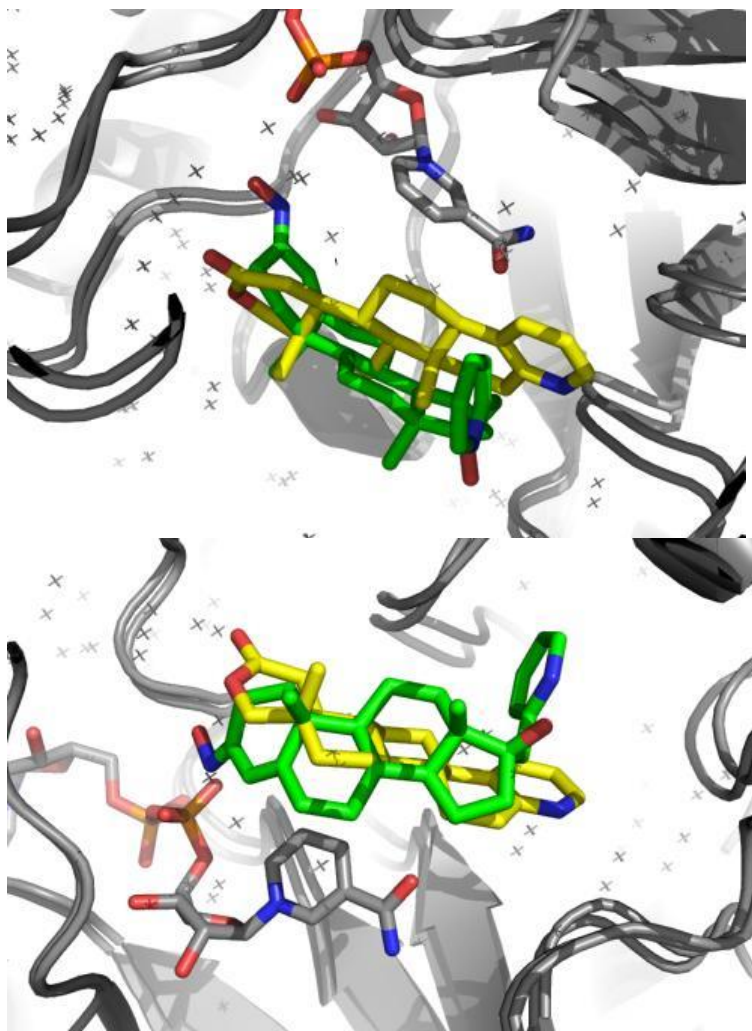
Како је већ наведено у поређењу са $AKR-7$, инхибитор $EM1404$ је до сада једини стероидни инхибитор на PDB-у у $AKR1C3$ протеину. Његова структура је већ приказана у оквиру Сlike 17, а у оквиру Сlike 24 је приказа оквиран положај у активном месту протеина. Једињење $EM1404$ има структурну сличност са једињењем 19 и због тога је било очекивано да буде и слично везивање и оријентација у активном месту. Оба инхибитора имају лактонски прстен на једном крају, а једињење $AKR-19$ има и додатни прстен на другом крају са азотом у њему, док $EM1404$ има кето групу која на једном свом крају има такође азот (Сл. 81, десно и 84, горе лево).



Међутим положај инхибитора један у односу на други се мало разликовао, али и оријентација, лактонски прстен ЕМ1404 се налази у подцепу SP1, док лактонски прстен АКР-19 је оријентисан скроз на супротну страну, благо ка подцепу SP3. Дакле, пиридински прстен инхибитора АКР-19 је унутар SP1 у односу на лактонски од ЕМ1404. Поред разлике у положајима и оријентацији самих инхибитора и неки од бочних ланаца аминокиселина које окружују инхибиторе су променили своје положаје и/или оријентације. Највеће промене имају бочни ланци фенилаланина 306 и 311 као и у сличају везивања АКР-7, са променом за 180° у оријентацији.

9.5.3. Поређење положаја AKR-19 и AKR-7 у AKR1C3

Преклопљене су структуре протеина са инхибиторима AKR-7 и AKR-19 ради поређења основних карактеристика које су им омогућиле инхибиторно својство као и ради анализе за потребе дизајнирања будућих стероидних једињења (Сл. 85).



Слика 85.
Преклопљене структуре комплекса протеина AKR1C3 са кофактором NADP⁺ (сиво-наранџасто) и инхибиторима AKR-7 (зелено) и AKR-19 (жуто). Доња слика је за 180° ротирана у односу на горњу.

Анализом положаја инхибитора на основу Сlike 85 види се да оба инхибитора заузимају релативно сличан положај у односу на цело везно место протеина. Међутим, оријентација им је обрнута, А прстен једног инхибитора је у обрнутом положају у односу на А прстен другог инхибитора, али у оба случаја пиридински прстен оба инхибитора је оријентисан у истом смеру иако је у случају једињења 7 прстен флексибилан, односно оба прстена су у SP1 подцепу, што се сматра добром карактеристиком једињења са инхибиторним потенцијалом према AKR1C3 (Adeniji et al., 2012; Flanagan et al., 2012).

Даља истраживања на овим инхибиторима би требала да обухвате пре свега утврђивање њихове специфичности у односу на преостале три изоформе протеина. У сваком случају представљају добру основу за даље испитивање и синтетисање једињења са сличним структурама. За сада изгледа да и фиксан и флексибилан пиридински прстен имају добру основу да се сместе у подцеп SP1, тако да даље модификовање може да буде како на супротним крајевима једињења тако можда и на В прстену, јер је у раду Аденија и сарадника установљено да велика или поларна функционална група на том прстену која је способна да интерагује са резидуама из SP1 подцепа има добру основу да представља добар селективни инхибитор према AKR1C3 изоформи (Adeniji et al., 2012). Такође, треба спровести и додатна истраживања са ефектом функционалне групе на C3 положају стероидног једињења. Препоклапањем ова два комплекса (протеина, кофактора и једињења AKR-7 или AKR-19) анализирани су и положаји молекула воде. Иако је генерално гледано мало оних који се препоклапају ипак у везујућем месту има молекула које су један поред другог, па самим тим имају потенцијал да представљају очуване положаје молекула воде, свакако би постојање додатних структура могло да додатно припомогне анализи. Ове добијене структуре ће унапредити даља моделовања и усидравања да буду прецизнија и још тачнија.

10. ЗАКЉУЧЦИ

У овој дисертацији је представљена оптимизација читавог процеса, од трансформације компетентних бактерија са одређеним плазмидом до добијања адекватних количина пречишћеног и активног ензима. Поред наведеног, представљена је и оптимизација ензимског есеја у оквиру ког су испитивани потенцијални лиганди и њихови ефекти на ензимску активност одређених хуманих изоформи протеина из подфамилије AKR1C, са акцентом на AKR1C3.

У оквиру ензимских есеја тестиране су неке комерцијалне хемикалије, затим биљни екстракти, а главни фокус су била синтетисана стероидна једињења. Ензимски есеји су показали да комерцијално једињење NSN има добар инхибиторни потенцијал. Од анализираних биљних екстраката, екстракт вирка се показао као обећавајући, а за њим и екстракт лишћа боровнице. Ови резултати указују на потенцијал и значај биљног диверзитета на овим просторима који може да представља одличан материјал за даља фармацеутска и терапијска истраживања.

Кроз ензимске есеје су се издвојила и синтетисана стероидна једињења која су се показала као добри инхибитори активности AKR1C3: AKR-1, -2, -3, -7, -9, -19 и -22. Једињења су по јачини инхибиције била у рангу са познатим инхибитором ибупрофеном или и боља од њега. Поређењем са литературним изворима испоставило се да нека од једињења могу да имају потенцијалну примену у терапијама различитих болести. Посебан значај би могла да имају у антиканцерогеним терапијама (на пример простате), било као део главне терапије или као адјувант. За једињење AKR-2 се испоставило да има потенцијал да буде дуални инхибитор у антиканцерогеним терапијама хормон-зависног канцера простате, јер инхибира два главна протеина у биосинтези андрогена, CYP17A1 и AKR1C3. Овакви резултати указују на велики значај ових једињења али представљају и одличну основу за даљи развој и испитивање сличних једињења.

Затим су рађени експерименти кокристализације протеина са једињењима која су показала добре инхибиторне карактеристике да би се установиле тачне молекуларне интеракције комплекса протеин-лиганд и са тим сазнањима указало на потенцијална даља модификовања лиганада у циљу унапређења инхибиторних карактеристика. Првим експериментима је модификован и оптимизован процес добијања AKR1C3 кристала са pET28 плазида *in situ* протеолизом. Као резултат наведених експеримената кокристализације успешно су добијени протеински кристали за све

комплексе протеина и седам наведених AKR-једињења са инхибиторним потенцијалом. Од седам комплекса за три су добијене и дифракције и решене структуре, а од тога две структуре су са лигандима у везном месту AKR1C3. Добијене резолуције су у рангу најбољих у Протеинској бази података (PDB), дакле, протеин без лиганда је имао резолуцију од 1,5 Å, док је протеин са лигандом AKR-19 имао 1,6 Å и протеин са AKR-7, 1,7 Å. Поред одличних вредности резолуције, решене структуре са инхибиторима унутар везног места су прве структуре са стероидним инхибитором у PDB-у, после само једне која је депозитована 2005. године. Структуре су показале да делови оба инхибитора окупирају део везног места ензима који се зове подцеп SP1, што се сматра кључном да би се једињење сматрало добрим инхибитор AKR1C3. Дакле, ово су први резултати успешне кристализације протеина, решавања структуре и утачњавања у којима је учествовао тим из Србије.

Резултати приказани у оквиру ове докторске дисертације представљају добру основу за све будуће *in vitro* и *in silico* експерименте. Значај свих ових резултата је у томе што су између осталог указали на потенцијал биљног материјала, обезбедили одличну основу за будућа дизајнирања и модификовања нових једињења и омогућили да даља моделовања и молекуларна усидравања буду прецизнија и још тачнија, а све то са циљем унапређења инхибиторних карактеристика једињења, потенцијалних терапеутика.

11. ЛИТЕРАТУРА

- Adeniji, A. O., Chen, M., & Penning, T. M. (2013). AKR1C3 as a target in castrate resistant prostate cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *137*, 136–149. <http://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.05.012>
- Adeniji, A. O., Twenter, B. M., Byrns, M. C., Jin, Y., Chen, M., Winkler, J. D., & Penning, T. M. (2012). Development of potent and selective inhibitors of aldo-keto reductase 1C3 (type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase) based on N-phenyl-aminobenzoates and their structure-activity relationships. *Journal of Medicinal Chemistry*, *55*(5), 2311–2323. <http://doi.org/10.1021/jm201547v>
- Ajduković, J. J., Djurendić, E. A., Petri, E. T., Klisurić, O. R., Čelić, A. S., Sakač, M. N., ... Penov-Gaši, K. M. (2013). 17(E)-Picolinylidene androstane derivatives as potential inhibitors of prostate cancer cell growth: Antiproliferative activity and molecular docking studies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *21*(23), 7257–7266. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.09.063>
- Ajduković, J. J., Penov-Gaši, K. M., Jakimov, D. S., Klisurić, O. R., Jovanović-Šanta, S. S., Sakač, M. N., ... Djurendić, E. A. (2015). Synthesis, structural analysis and antitumor activity of novel 17 α -picolyl and 17(E)-picolinylidene A-modified androstane derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *23*(7), 1557–1568. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.02.001>
- AKR Superfamily. (n.d.). Retrieved from <https://www.med.upenn.edu/akr/index.html>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410. [http://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Amano, Y., Yamaguchi, T., Niimi, T., & Sakashita, H. (2015). Structures of complexes of type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase with structurally diverse inhibitors: insights into the conformational changes upon inhibitor binding. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, *71*(4), 918–927. <http://doi.org/10.1107/S1399004715002175>
- Aquila, S., Sisci, D., Gentile, M., Middea, E., Catalano, S., Carpino, A., ... Andò, S. (2004). Estrogen Receptor (ER) α and ER β Are Both Expressed in Human Ejaculated Spermatozoa: Evidence of Their Direct Interaction with Phosphatidylinositol-3-OH Kinase/Akt Pathway. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *89*(3), 1443–1451. <http://doi.org/10.1210/jc.2003-031681>
- Atalla, A., Breyer-Pfaff, U., & Maser, E. (2000). Purification and characterization of oxidoreductases-catalyzing carbonyl reduction of the tobacco-specific nitrosamine 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human liver cytosol. *Xenobiotica*, *30*(8), 755–769. <http://doi.org/10.1080/00498250050119826>
- Baneyx, F. (2004). Protein Expression Technologies: Current Status and Future Trends (p. 532). Garland Science.
- Barski, O. A., Tipparaju, S. M., & Bhatnagar, A. (2009). The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification. *Drug Metabolism Review*, *40*(4), 553–624. <http://doi.org/10.1080/03602530802431439>.The
- Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L., & Berg, J. (2002). *Biochemistry: International version (hardcover)*.
- Berki, T., Boldizsar, F., Mariann, S., Talaber, G., & Varcza, Z. (2011). *Signal Transduction (Medical Biotechnology) / Digitális Tankönyvtár*. (Ferenc Boldizsá & Rita Bognár, Eds.). University of Pecs, Hungary.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., ... Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 235–242. <http://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>

- Berne, B. J., & Pecora, R. (2000). *Dynamic light scattering : with applications to chemistry, biology, and physics*. Dover Publications.
- Berne, R. (2004). *Physiology*. (M. N. Levy, B. M. Koeppen, & B. A. Stanton, Eds.) (fifth). Mosby.
- Brinkrolf, K., Schröder, J., Pühler, A., & Tauch, A. (2010). The transcriptional regulatory repertoire of *Corynebacterium glutamicum*: Reconstruction of the network controlling pathways involved in lysine and glutamate production. *Journal of Biotechnology*, 149(3), 173–182. <http://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2009.12.004>
- Bydal, P., Luu-The, V., Labrie, F., & Poirier, D. (2009). Steroidal lactones as inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5: Chemical synthesis, enzyme inhibitory activity, and assessment of estrogenic and androgenic activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(2), 632–644. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.03.020>
- Byrns, M. C., Jin, Y., & Penning, T. M. (2011). Inhibitors of type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3): Overview and structural insights. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 125(1–2), 95–104. <http://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.11.004>
- Byrns, M. C., Steckelbroeck, S., & Penning, T. M. (2008). An indomethacin analogue, N-(4-chlorobenzoyl)-melatonin, is a selective inhibitor of aldo-keto reductase 1C3 (type 2 3 β -HSD, type 5 17 β -HSD, and prostaglandin F synthase), a potential target for the treatment of hormone dependent and hormone independent. *Biochemical Pharmacology*, 75(2), 484–493. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.09.008>
- Carugo, O., & Argos, P. (1997). NADP-dependent enzymes. II: Evolution of the mono- and dinucleotide binding domains. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 28(1), 29–40. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(199705\)28:1<29::AID-PROT3>3.0.CO;2-E](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(199705)28:1<29::AID-PROT3>3.0.CO;2-E)
- Casali, N., & Preston, A. (2003). *E. coli plasmid vectors : methods and applications*. Humana Press.
- Chang, Y.-H., Wang, Y.-L., Lin, J.-Y., Chuang, L.-Y., & Hwang, C.-C. (2010). Expression, purification, and characterization of a human recombinant 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology*, 44(2), 133–9. <http://doi.org/10.1007/s12033-009-9221-5>
- Chayen, N. E., Shaw Stewart, P. D., Maeder, D. L., & Blow, D. M. (1990). An automated system for micro-batch protein crystallization and screening. *Journal of Applied Crystallography*, 23(4), 297–302. <http://doi.org/10.1107/S0021889890003260>
- Chen, M., Adeniji, A. O., Twenter, B. M., Winkler, J. D., Christianson, D. W., & Penning, T. M. (2012). Crystal structures of AKR1C3 containing an N-(aryl)amino-benzoate inhibitor and a bifunctional AKR1C3 inhibitor and androgen receptor antagonist. Therapeutic leads for castrate resistant prostate cancer. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22(10), 3492–3497. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.03.085>
- Chen, M., Jin, Y., & Penning, T. M. (2015). The rate-determining steps of aldo-keto reductases (AKRs), a study on human steroid 5 β -reductase (AKR1D1). *Chemico-Biological Interactions*, 234, 360–365. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.004>
- Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2013). *Molecular biology*. Academic Press.
- Collaborative Computational Project, N. 4. (1994). The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 50(5), 760–763. <http://doi.org/10.1107/S0907444994003112>
- Copeland, R. A. (2005). *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*. John Wiley and Sons, Inc.
- D’Arcy, A., Elmore, C., Stihle, M., & Johnston, J. E. (1996). A novel approach to crystallising proteins under oil. *Journal of Crystal Growth*, 168(1–4), 175–180. [http://doi.org/10.1016/0022-0248\(96\)00351-X](http://doi.org/10.1016/0022-0248(96)00351-X)

- Dallakyan, S., & Olson, J. A. (2015). Chemical Biology. *Chemical Biology: Methods and Protocols*, 1263(January 2015), 243–20. <http://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7>
- Daly, R., & Hearn, M. T. W. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 18(2), 119–138. <http://doi.org/10.1002/jmr.687>
- Date, M., Itaya, H., Matsui, H., & Kikuchi, Y. (2006). Secretion of human epidermal growth factor by *Corynebacterium glutamicum*. *Letters in Applied Microbiology*, 42(1), 66–70. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01802.x>
- Djurendić, E. A., Ajduković, J. J., Sakač, M. N., Čanadi, J. J., Kojić, V. V., Bogdanović, G. M., & Penov-Gaši, K. M. (2009). 17-Picolinylidene-substituted steroid derivatives and their antiaromatase and cytotoxic activity. *Arkivoc*, 2009(13), 311–323.
- Djurendić, E. A., Ajduković, J. J., Sakač, M. N., Čsanádi, J. J., Kojić, V. V., Bogdanović, G. M., & Penov-Gaši, K. M. (2012). Synthesis and cytotoxic activity of some 17-picolyl and 17-picolinylidene androstane derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 784–792. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.06.030>
- Djurendić, E. A., Daljev, J., Sakač, M., Čanadi, J., Šanta, S. J., Andrić, S., ... Gaši, K. P. (2008). Synthesis of some epoxy and/or N-oxy 17-picolyl and 17-picolinylidene-androst-5-ene derivatives and evaluation of their biological activity. *Steroids*, 73(1), 129–138. <http://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.09.005>
- Dong, A., Xu, X., & Edwards, A. (2007). In situ proteolysis for protein crystallization and structure determination. *Nat Methods*, 4(12), 1019–1021. <http://doi.org/10.1038/nmeth1118>.In
- Dortay, H., & Mueller-Roeber, B. (2010). A highly efficient pipeline for protein expression in *Leishmania tarentolae* using infrared fluorescence protein as marker. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-9-29>
- E. coli Growth and Induction with IPTG. (n.d.). Retrieved June 13, 2018, from <https://sbru.salamanderthemes.net/documents/e-coli-growth-and-induction-with-iptg/>
- Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015, July 22). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <http://doi.org/10.3390/molecules200713384>
- FinchTV. (n.d.). Geospiza, Inc., WA, USA.
- Flanagan, J. U., Yosaatmadja, Y., Teague, R. M., Chai, M. Z. L., Turnbull, A. P., & Squire, C. J. (2012). Crystal Structures of Three Classes of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Complex with Aldo-Keto Reductase 1C3. *PLoS ONE*, 7(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0043965>
- Forest, K., & Schutt, C. (1992). Protein engineering for structure determination. *Current Opinion in Structural Biology*, 2, 576–581.
- Genome Dictionary - Genetics Glossary - Definitions. (n.d.). Retrieved July 9, 2018, from <https://www.theodora.com/genetics/#cloningvector>
- Gerlach, M., Mueller, U., & Weiss, M. S. (2016). The MX beamlines BL14.1-3 at BESSY II. *Journal of Large-Scale Research Facilities JLSRF*, 2(0), 47. <http://doi.org/10.17815/jlsrf-2-64>
- Glen, R. C., & Allen, S. C. (2003). Ligand-protein docking: cancer research at the interface between biology and chemistry. *Current Medicinal Chemistry*, 10(9), 763–7. <http://doi.org/10.2174/0929867033457809>
- Glick, B. R., Pasternak, J. J., & Patten, C. L. (2010). *Molecular biotechnology : principles and applications of recombinant DNA*. ASM Press.

- Glušćević, M. (2014). *Ekspresija , prećišćavanje i karakterizacija hum anog rekombinantnog proteina 17beta-hidroksisteroid dehidrogenaze tip 1*. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematićki fakultet.
- Gohlke, H., & Klebe, G. (2002). Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 41(15), 2644–76. [http://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020802\)41:15<2644::AID-ANIE2644>3.0.CO;2-O](http://doi.org/10.1002/1521-3773(20020802)41:15<2644::AID-ANIE2644>3.0.CO;2-O)
- Gomes, R. L., Meredith, W., Snape, C. E., & Sephton, M. A. (2009). Conjugated steroids: analytical approaches and applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(2), 453–458. <http://doi.org/10.1007/s00216-008-2451-8>
- Gonzalez1, F. J., & Gelboin1, H. V. Human Cytochromes P450: Evolution and cDNA-Directed Expression, 98 Environmental Health Perspectives 81–85 (1992).
- Gorrec, F. (2009). The MORPHEUS protein crystallization screen. *Journal of Applied Crystallography*, 42(6), 1035–1042. <http://doi.org/10.1107/S0021889809042022>
- Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J., & Lopez, R. (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, 38(Web Server), W695–W699. <http://doi.org/10.1093/nar/gkq313>
- Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18, 2714–2723.
- Guide to Understanding X-ray Crystallography. (n.d.). Retrieved July 10, 2018, from http://www.chem.ucla.edu/~harding/ec_tutorials/tutorial73.pdf
- Hägström, M., & Richfield, D. (2014). Diagram of the pathways of human steroidogenesis. *WikiJournal of Medicine*, 1(1). <http://doi.org/10.15347/wjm/2014.005>
- Hampton Research. (n.d.). Retrieved January 21, 2018, from https://hamptonresearch.com/tip_detail.aspx?id=16
- Hansen, L. H., Knudsen, S., & Sørensen, S. J. (1998). The Effect of the lacY Gene on the Induction of IPTG Inducible Promoters, Studied in Escherichia coli and Pseudomonas fluorescens. *Current Microbiology*, 36(6), 341–347. <http://doi.org/10.1007/s002849900320>
- Hanukoglu, I. (1992). Steroidogenic enzymes: Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 43(8), 779–804. [http://doi.org/10.1016/0960-0760\(92\)90307-5](http://doi.org/10.1016/0960-0760(92)90307-5)
- Hanwell M.D. Lonie D.C., Vandermeersch, T., Zurek E., Hutchison, G., C. D. E. (2012). Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualisation, and Analysis Platform. *Journal of Chemical Informatics*, 4.17, 1–17. [http://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)89080-5](http://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)89080-5)
- Hayat Khan, K. (2013). Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(2), 257–263. <http://doi.org/10.5681/apb>
- Hetényi, C., & Spoel, D. van der. (2011). Toward prediction of functional protein pockets using blind docking and pocket search algorithms. *Protein Science*, 20(5), 880–893. <http://doi.org/10.1002/pro.618>
- Heterologous expression - an overview | ScienceDirect Topics. (n.d.). Retrieved July 9, 2018, from <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/heterologous-expression>
- HUGO Gene Nomenclature Committee (AKR1C3). (n.d.). Retrieved from https://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=386
- Instruction Manual Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques*. (n.d.).

- Ishizaki, F., Nishiyama, T., Kawasaki, T., Miyashiro, Y., Hara, N., Takizawa, I., ... Takahashi, K. (2013). Androgen deprivation promotes intratumoral synthesis of dihydrotestosterone from androgen metabolites in prostate cancer. *Scientific Reports*, 3(1), 1528. <http://doi.org/10.1038/srep01528>
- Jamieson, S. M. F., Brooke, D. G., Heinrich, D. M., Atwell, G. J., Silva, S., Hamilton, E. J., ... Denny, W. A. (2012). 3-(3,4-Dihydroisoquinolin-2(1H)-ylsulfonyl)benzoic Acids: highly potent and selective inhibitors of the type 5 17- β -hydroxysteroid dehydrogenase AKR1C3. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(17), 7746–58. <http://doi.org/10.1021/jm3007867>
- Jevrić, L. R., Karadžić, M., Mandić, A. I., Podunavac Kuzmanović, S. O., Kovačević, S. Z., Nikolić, A. R., ... Stojanović, S. Z. (2017). Lipophilicity estimation and characterization of selected steroid derivatives of biomedical importance applying RP HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 134, 27–35. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.11.015>
- Jez, J. M., Bennett, M. J., Schlegel, B. P., Lewis, M., & Penning, T. M. (1997). Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *The Biochemical Journal*, 326 (Pt 3, 625–636. <http://doi.org/10.1042/bj3260625>
- Johnson, M. H., & Everitt, B. J. (2007). *Essential Reproduction* (sixth). Blackwell Publishing.
- Jorgensen, W. L. (1991). Rusting of the lock and key model for protein-ligand binding. *Science (New York, N.Y.)*, 254(5034), 954–5. <http://doi.org/10.1126/SCIENCE.1719636>
- Jovanović-Šanta, S. S., Petri, E. T., Klisurić, O. R., Szécsi, M., Kovačević, R., & Petrović, J. A. (2015). Antihormonal potential of selected D-homo and D-seco estratriene derivatives. *Steroids*, 97, 45–53. <http://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.08.026>
- Jovanović-Šanta, S. S., Petrović, J. A., Andrić, S., Kovačević, R., Đurendić, E., Sakač, M. N., ... Stanković, S. (2003). Synthesis, structure, and screening of estrogenic and antiestrogenic activity of new 3,17-substituted-16,17-seco-estratriene derivatives. *Bioorganic Chemistry*, 31(6), 475–484. [http://doi.org/10.1016/S0045-2068\(03\)00101-9](http://doi.org/10.1016/S0045-2068(03)00101-9)
- Jung, Y. J., Lee, E. H., Lee, C. G., Rhee, K. J., Jung, W. S., Choi, Y., ... Kang, K. (2017). AKR1B10-inhibitory Selaginella tamariscina extract and amentoflavone decrease the growth of A549 human lung cancer cells in vitro and in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, 202(March), 78–84. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.010>
- Kabsch, W. (2010). Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(2), 133–144. <http://doi.org/10.1107/S0907444909047374>
- Kim, J.-H., Kononenko, A., Erliandri, I., Kim, T.-A., Nakano, M., Iida, Y., ... Kouprina, N. (2011). Human artificial chromosome (HAC) vector with a conditional centromere for correction of genetic deficiencies in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(50), 20048–53. <http://doi.org/10.1073/pnas.1114483108>
- Kitanović, N. (2015). *In vitro i računarsko ispitivanje protein -ligand interakcija aldo-keto reduktaze 1C3 : primena u dizajnu novih inhibitora sa anti-tumorskim potencijalom*. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet.
- Komoto, J., Yamada, T., Watanabe, K., & Takusagawa, F. (2004). Crystal Structure of Human Prostaglandin F Synthase (AKR1C3). *Biochemistry*, 43(8), 2188–2198. <http://doi.org/10.1021/bi036046x>
- Koppitz, M., & Eis, K. (2006). Automated medicinal chemistry. *Drug Discovery Today*, 11(11–12), 561–8. <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.04.005>
- Kouprina, N., Earnshaw, W. C., Masumoto, H., & Larionov, V. (2013). A new generation of human artificial chromosomes for functional genomics and gene therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(7), 1135–1148. <http://doi.org/10.1007/s00018-012-1113-3>

- Kovačević, S. Z., Podunavac-Kuzmanović, S. O., Jevrić, L. R., Djurendić, E. A., & Ajduković, J. J. (2014). Non-linear assessment of anticancer activity of 17-picolyl and 17-picolinylidene androstane derivatives - Chemometric guidelines for further syntheses. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62, 258–266. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.05.031>
- Krazeisen, A., Breitling, R., Möller, G., & Adamski, J. (2001). Phytoestrogens inhibit human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 171(1–2), 151–162. [http://doi.org/S0303-7207\(00\)00422-6](http://doi.org/S0303-7207(00)00422-6) [pii]
- Lan, N. C., & Gee, K. W. (1994). Neuroactive Steroid Actions at the GABAA Receptor. *Hormones and Behavior*, 28(4), 537–544. <http://doi.org/10.1006/HBEH.1994.1052>
- Liedtke, A. J., Adeniji, A. O., Chen, M., Byrns, M. C., Jin, Y., Christianson, D. W., ... Penning, T. M. (2013). Development of potent and selective indomethacin analogues for the inhibition of AKR1C3 (type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase/prostaglandin F synthase) in castrate-resistant prostate cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(6), 2429–2446. <http://doi.org/10.1021/jm3017656>
- Liu, C., Armstrong, C. M., Lou, W., Lombard, A., Evans, C. P., & Gao, A. C. (2016). Inhibition of AKR1C3 activation overcomes resistance to abiraterone in advanced prostate cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(1), 35–44. <http://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0186>
- Lorber, B., Fischer, F., Bailly, M., Roy, H., & Kern, D. (2012). Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 40(6), 372–382. <http://doi.org/10.1002/bmb.20644>
- Lovering, A. L., Ride, J. P., Bunce, C. M., Desmond, J. C., Cummings, S. M., & White, S. A. (2004). Crystal Structures of Prostaglandin D2 11-Ketoreductase (AKR1C3) in Complex with the Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Flufenamic Acid and Indomethacin. *Cancer Research*, 64(5), 1802–1810. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2847>
- McPherson, A., & Gavira, J. A. (2014, January). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*. International Union of Crystallography. <http://doi.org/10.1107/S2053230X13033141>
- Mierendorf, R., Yeager, K., & Novy, R. (1994). The pET system: your choice for expression. *Innovations*, 1(1), 1–3.
- Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocrine Reviews*, 32(1), 81–151. <http://doi.org/10.1210/er.2010-0013>
- Möller, G., Deluca, D., Gege, C., Rosinus, A., Kowalik, D., Peters, O., ... Hillisch, A. (2009). Structure-based design, synthesis and in vitro characterization of potent 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors based on 2-substitutions of estrone and D-homo-estrone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(23), 6740–6744. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.09.113>
- Molnar, C., & Gair, J. (n.d.). Concepts of Biology - 1st Canadian Edition. Retrieved July 9, 2018, from <https://opentextbc.ca/biology/>
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., & Dodson, E. J. (1997, May 1). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. International Union of Crystallography. <http://doi.org/10.1107/S0907444996012255>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet]. (1988). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information [1988].
- Nevalainen, H., & Peterson, R. (2014). Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much? <http://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00075>

- Nikolić, A. R., Petri, E. T., Klisurić, O. R., Čelić, A. S., Jakimov, D. S., Djurendić, E. A., ... Sakač, M. N. (2015). Synthesis and anticancer cell potential of steroidal 16,17-seco-16,17a-dinitriles: Identification of a selective inhibitor of hormone-independent breast cancer cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(4), 703–711. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.12.069>
- Novac, N., & Heinzl, T. (2004). Nuclear receptors: overview and classification. *Current Drug Targets. Inflammation and Allergy*, 3(4), 335–46.
- Novotna, R., Wsol, V., Xiong, G., & Maser, E. (2008). Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto: Reductase (AKR) 1C3. *Toxicology Letters*, 181(1), 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.06.858>
- Oberthuer, D., Melero-García, E., Dierks, K., Meyer, A., Betzel, C., Garcia-Caballero, A., & Gavira, J. A. (2012). Monitoring and Scoring Counter-Diffusion Protein Crystallization Experiments in Capillaries by in situ Dynamic Light Scattering. *PLoS ONE*, 7(6), e33545. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0033545>
- Olczak, M., & Olczak, T. (2006). Comparison of different signal peptides for protein secretion in nonlytic insect cell system. *Analytical Biochemistry*, 359(1), 45–53. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2006.09.003>
- Pedretti, A., Villa, L., & Vistoli, G. (2004). VEGA - An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 18(3), 167–173. <http://doi.org/10.1023/B:JCAM.0000035186.90683.f2>
- Penning, T. M. (2011, May). Human hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation: Insights into inhibitor design and evaluation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. NIH Public Access. <http://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.01.009>
- Penning, T. M. (2014). Androgen biosynthesis in castration-resistant prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 21(4), T67–T78. <http://doi.org/10.1530/ERC-14-0109>
- Penning, T. M. (2015). The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-Biological Interactions*, 234(August 2014), 236–246. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.09.024>
- Penning, T. M. (2017). Aldo-Keto Reductase (AKR) 1C3 inhibitors: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 3776(September), 1–12. <http://doi.org/10.1080/13543776.2017.1379503>
- Penning, T. M., Burczynski, M. E., Jez, J. M., Hung, C. F., Lin, H. K., Ma, H., ... Ratnam, K. (2000). Human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1–AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *The Biochemical Journal*, 77(Pt 1), 67–77. <http://doi.org/10.1042/0264-6021:3510067>
- Penov-Gaši, K. M., Brenesel, M. D. D., Djurendić, E. A., Sakač, M. N., Čanadi, J. J., Daljev, J. J., ... Juranić, Z. D. (2007). Synthesis and biological evaluation of some 17-picolyl and 17-picolinylidene androst-5-ene derivatives. *Steroids*, 72(1), 31–40. <http://doi.org/10.1016/j.steroids.2006.10.002>
- Penov-Gaši, K. M., Oklješa, A. M., Petri, E. T., Čelić, A. S., Djurendić, E. A., Klisurić, O. R., ... Sakač, M. N. (2013). Selective antitumour activity and ER α molecular docking studies of newly synthesized D-homo fused steroidal tetrazoles. *Med. Chem. Commun.*, 4(2), 317–323. <http://doi.org/10.1039/C2MD20327H>
- Penov-Gaši, K. M., Stanković, S. M., Csanádi, J. J., Djurendić, E. A., Sakač, M. N., Medić Mijačević, L., ... Kovačević, R. (2001). New D-modified androstane derivatives as aromatase inhibitors☆. *Steroids*, 66(8), 645–653. [http://doi.org/10.1016/S0039-128X\(01\)00096-4](http://doi.org/10.1016/S0039-128X(01)00096-4)
- pET System Manual. (n.d.).
- Petrović, Đ. (1998). *Osnovi enzimologije*. Beograd: Zavod za izdavanje udžbenika.

- pGEX-2T - Addgene Vector Database (Plasmids, Expression Vectors, etc). (n.d.). Retrieved January 30, 2018, from <https://www.addgene.org/vector-database/2868/>
- Plavša, J. J., Režáčová, P., Kugler, M., Pachel, P., Brynda, J., Voburka, Z., ... Škerlová, J. (2018). In situ proteolysis of an N-terminal His tag with thrombin improves the diffraction quality of human aldo-keto reductase 1C3 crystals. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 74(5). <http://doi.org/10.1107/S2053230X18005721>
- Proteau, A., Shi, R., & Cygler, M. (2010). Application of Dynamic Light Scattering in Protein Crystallization. In *Current Protocols in Protein Science* (Vol. Chapter 17, p. 17.10.1-17.10.9). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <http://doi.org/10.1002/0471140864.ps1710s61>
- Qiu, W., Zhou, M., Labrie, F., & Lin, S.-X. (2004). Crystal Structures of the Multispecific 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 5: Critical Androgen Regulation in Human Peripheral Tissues. *Molecular Endocrinology*, 18(7), 1798–1807. <http://doi.org/10.1210/me.2004-0032>
- Qiu, W., Zhou, M., Mazumdar, M., Azzi, A., Ghanmi, D., Luu-The, V., ... Lin, S.-X. (2007). Structure-based inhibitor design for an enzyme that binds different steroids: A potent inhibitor for human type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 282(11), 8368–8379. <http://doi.org/10.1074/jbc.M606784200>
- Retallack, D. M., Jin, H., & Chew, L. (2012). Reliable protein production in a *Pseudomonas fluorescens* expression system. *Protein Expression and Purification*, 81(2), 157–165. <http://doi.org/10.1016/j.pep.2011.09.010>
- Rhodes, G. (2006). *Crystallography made crystal clear : a guide for users of macromolecular models*. Elsevier/Academic Press.
- Rižner, T. L., & Penning, T. M. (2014, January). Role of aldo-keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism. *Steroids*. NIH Public Access. <http://doi.org/10.1016/j.steroids.2013.10.012>
- Rosano, G., & Ceccarelli, E. A. (2014, April 17). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media SA. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rosenblum, G., & Cooperman, B. S. (2013). Engine out of the Chassis: Cell-Free Protein Synthesis and its Uses. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.016>
- Rossmann fold vs TIM barrel. (n.d.). Retrieved May 29, 2018, from https://openwetware.org/wiki/File:JCA_StrucBiolTour6.jpg
- Rupp, B. (2009). *Biomolecular crystallography: Principles, practice, and application to structural biology*. Garland Science. Garland Science.
- Sakač, M. N., Miljković, D. A., Penov-Gaši, K. M., Popsavin, M., Klisurić, O. R., Stanković, S. M., ... Kovačević, R. (2005). Synthesis, X-ray Crystal Structure and Antiestrogenic Activity of 17-Methyl-16,17-secoestra-1,3,5(10)-triene Derivatives. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 70(1), 63–71. <http://doi.org/10.1135/cccc20050063>
- Sands, D. (1988). *Introduction to Crystallography*. Dover.
- Savić, M. P., Ajduković, J. J., Plavša, J. J., Bekić, S. S., Čelić, A. S., Klisurić, O. R., ... Djurendić, E. A. (2018). Evaluation of A-ring fused pyridine D-modified androstane derivatives for antiproliferative and aldo-keto reductase 1C3 inhibitory activity. *MedChemComm*. <http://doi.org/10.1039/C8MD00077H>
- Savić, M. P., Djurendić, E. A., Petri, E. T., Čelić, A., Klisurić, O. R., Sakač, M. N., ... Penov-Gaši, K. M. (2013). Synthesis, structural analysis and antiproliferative activity of some novel D-homo lactone androstane derivatives. *RSC Advances*, 3(26), 10385. <http://doi.org/10.1039/c3ra41336e>
- Scapin, G. (2006). Structural biology and drug discovery. *Current Pharmaceutical Design*, 12(17), 2087–97. <http://doi.org/10.2174/138161206777585201>

- Schlegel, B. P., Jez, J. M., & Penning, T. M. (1998). Mutagenesis of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase reveals a “push -pull” mechanism for proton transfer in aldo-keto reductases. *Biochemistry*, 37(10), 3538–3548. <http://doi.org/10.1021/bi9723055>
- Schlick, T. (2010). *Molecular modeling and simulation : an interdisciplinary guide*. Springer Science+Business Media, LLC.
- Schuster, D., Kowalik, D., Kirchmair, J., Laggner, C., Markt, P., Aebischer-Gumy, C., ... Adamski, J. (2011). Identification of chemically diverse, novel inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 and 5 by pharmacophore-based virtual screening. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 125(1–2), 148–161. <http://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.01.016>
- Shorter, E. (2005). *A historical dictionary of psychiatry*. Oxford University Press.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., ... Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 539–539. <http://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Sigstedt, S. C., Hooten, C. J., Callewaert, M. C., Jenkins, A. R., Romero, A. E., Pullin, M. J., ... Steelant, W. F. A. (2008). Evaluation of aqueous extracts of *Taraxacum officinale* on growth and invasion of breast and prostate cancer cells. *International Journal of Oncology*, 32(5), 1085–1090.
- Skarydova, L., Hofman, J., Chlebek, J., Havrankova, J., Kosanova, K., Skarka, A., ... Wsol, V. (2014). Isoquinoline alkaloids as a novel type of AKR1C3 inhibitors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 143, 250–258. <http://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.04.005>
- Srivastava, D. P., Waters, E. M., Mermelstein, P. G., Kramár, E. A., Shors, T. J., & Liu, F. (2011). Rapid estrogen signaling in the brain: implications for the fine-tuning of neuronal circuitry. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(45), 16056–63. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4097-11.2011>
- Stanczyk, F. Z. (2003). All progestins are not created equal. *Steroids*, 68(10–13), 879–890. <http://doi.org/10.1016/j.steroids.2003.08.003>
- Strain - DH5 α . (n.d.). Retrieved January 28, 2018, from <https://cgsc2.biology.yale.edu/Strain.php?ID=43509>
- Strelow, J., Dewe, W., Iversen, P. W., Brooks, H. B., Radding, J. A., McGee, J., & Weidner, J. (2012). *Mechanism of Action Assays for Enzymes. Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Structural Biology - National Institute of General Medical Sciences. (2017). Retrieved January 23, 2018, from https://www.nigms.nih.gov/education/pages/factsheet_structuralbiology.aspx
- Summary of Protein Crystallography. (n.d.). Retrieved January 28, 2018, from <https://www.jic.ac.uk/staff/david-lawson/xtallog/summary.htm>
- Szabó, N., Ajduković, J. J., Djurendić, E. A., Sakač, M. N., Ignáth, I., Gardi, J., ... Szécsi, M. (2015). Determination of 17 α -hydroxylase-C 17,20 -lyase (P450 17 α) enzyme activities and their inhibition by selected steroidal picolyl and picolinylidene compounds. *Acta Biologica Hungarica*, 66(1), 41–51. <http://doi.org/10.1556/ABiol.66.2015.1.4>
- The crystal robot. (n.d.). Retrieved January 21, 2018, from <https://www.eurekaalert.org/features/doe/2000-12/drnl-tcr061902.php>
- The PyMOL Molecular Graphic System. (n.d.). Portland, OR, USA: Schrodinger LLC.
- Tirabassi, R. (n.d.). How to Identify Supercoils, Nicks and Circles in Plasmid Preps - Bitesize Bio. Retrieved June 13, 2018, from <https://bitesizebio.com/13524/how-to-identify-supercoils-nicks-and-circles-in-plasmid-preps/>

- Totrov, M., & Abagyan, R. (2001). Protein-ligand docking as an energy optimization problem. In *Drug-receptor thermodynamics: Introduction and experimental applications* (pp. 603–624). John Wiley and Sons: New York.
- Tulinsky, A. (1996). The Protein Structure Project, 1950–1959: First Concerted Effort of a Protein Structure Determination in the US. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 31, 357–366.
- Vagin, A. A., & Teplyakov, A. (2000). An approach to multi-copy search in molecular replacement. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 56(Pt 12), 1622–4. <http://doi.org/10.1107/S0907444900013780>
- Veliça, P. (2010). Comparison of human and mouse AKR1C enzymes : implications for modeling human cancer, (April).
- Veliça, P., Davies, N. J., Rocha, P. P., Schrewe, H., Ride, J. P., & Bunce, C. M. (2009). Lack of functional and expression homology between human and mouse aldo-keto reductase 1C enzymes: implications for modelling human cancers. *Molecular Cancer*, 8(1), 121. <http://doi.org/10.1186/1476-4598-8-121>
- Wallace, E., Dranow, D., Laible, P. D., Christensen, J., & Nollert, P. (2011). Monoolein Lipid Phases as Incorporation and Enrichment Materials for Membrane Protein Crystallization. *PLoS ONE*, 6(8), e24488. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0024488>
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189–1191. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Wernimont, A., & Edwards, A. (2009). In Situ proteolysis to generate crystals for structure determination: An update. *PLoS ONE*, 4(4). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0005094>
- What is a synchrotron? Retrieved January 28, 2018, from <http://www.esrf.eu/about/synchrotron-science/synchrotron>
- Wikipedia contributors. Hydroxylation of estradiol. https://en.wikipedia.org/wiki/Hydroxylation_of_estradiol
- Wikipedia contributors. lac operon. July 9, 2018, https://en.wikipedia.org/wiki/Lac_operon
- Wikipedia contributors. Protein production. December 4, 2017, https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Protein_production&oldid=799577319
- X-Ray Crystallography - Crystal Production. January 28, 2018, <http://my.yetnet.ch/dergutemensch/crystallography/crystalproduction.htm>
- X-ray Diffraction. Retrieved July 10, 2018, http://pruffle.mit.edu/atomiccontrol/education/xray/xray_diff.php
- Yepuru, M., Wu, Z., Kulkarni, A., Yin, F., M. Barrett, C., Kim, J., ... Narayanan, R. (2013). Steroidogenic enzyme AKR1C3 is a novel androgen receptor-selective coactivator that promotes prostate cancer growth. *Clinical Cancer Research*, 19(20), 5613–5625. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1151>
- Zhao, Y., Zheng, X., Zhang, H., Zhai, J., Zhang, L., Li, C., ... Hu, X. (2015). In vitro inhibition of AKR1Cs by sulphonylureas and the structural basis. *Chemico-Biological Interactions*, 240, 310–315. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.09.006>

12. ПРИЛОЗИ

Прилог 1. Аминокиселинске секвенце хуманих изоформи подфамилије AKR1C и 17 β HSD1

>NP_001344.2 aldo-keto reductase family 1 member C1 [Homo sapiens]
MDSKYQCVKLNDGHFMPVLGFGTYAPAEVPSKALEATKLAIEAGFRHIDSAHLYNNEEQVGLAIRSK
IADGSVKREDIFYTSKLCNSHRPELVRPALERSLKNLQLDYVDLYLIHFVSVKPGEEVIPKDENGK
ILFDTVDLCATWEAVEKCKDAGLAKSIGVSNFNRRQLEMI LNKPGLKYKPV CNQVECHPYFNQRKLLD
FCKSKDIVLVAYSALGSHREEPWVDPNSPVLLEDVLCALAKKHKRTPALIALRYQLQRGVVVLAKSY
NEQRIRQNVQVFEFQLTSEEMKAIDGLNRNVRYLTLDIFAGPPNYPFSDEY

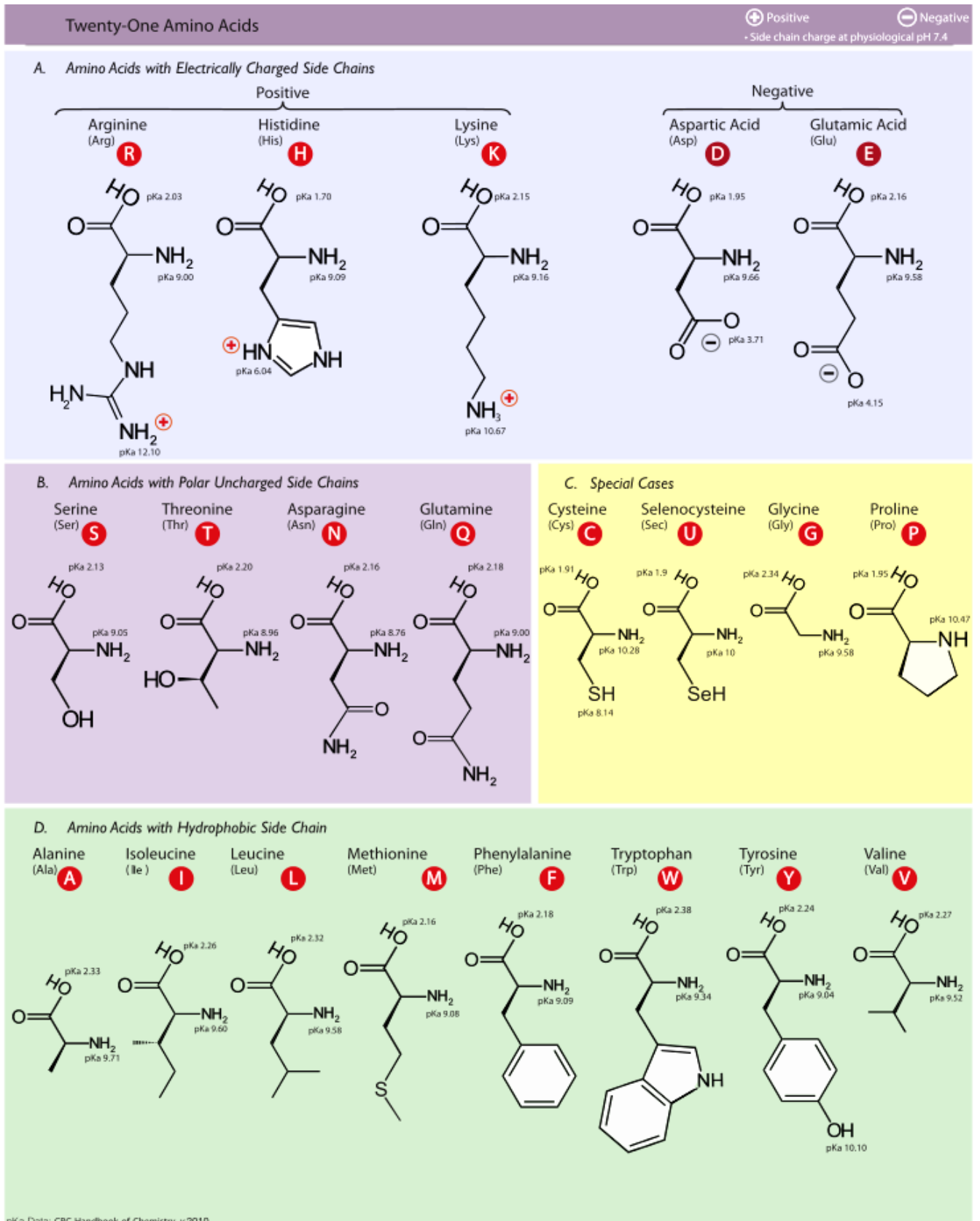
>NP_995317.1 aldo-keto reductase family 1 member C2 isoform 1 [Homo sapiens]
MDSKYQCVKLNDGHFMPVLGFGTYAPAEVPSKALEAVKLAIEAGFHHIDSAHVYNNEEQVGLAIRSK
IADGSVKREDIFYTSKLSNSHRPELVRPALERSLKNLQLDYVDLYLIHFVSVKPGEEVIPKDENGK
ILFDTVDLCATWEAMEKCKDAGLAKSIGVSNFNHRLLEMI LNKPGLKYKPV CNQVECHPYFNQRKLLD
FCKSKDIVLVAYSALGSHREEPWVDPNSPVLLEDVLCALAKKHKRTPALIALRYQLQRGVVVLAKSY
NEQRIRQNVQVFEFQLTSEEMKAIDGLNRNVRYLTLDIFAGPPNYPFSDEY

>NP_003730.4 aldo-keto reductase family 1 member C3 isoform 1 [Homo sapiens]
MDSKHQCVKLNDGHFMPVLGFGTYAPPEVPRSKALEVTKLAIEAGFRHIDSAHLYNNEEQVGLAIRSK
IADGSVKREDIFYTSKLVSTFHRPELVRPALENSLKKALDYVDLYLIHSPMSLKPGEELSPTDENGK
VIFDIVDLCTTWEAMEKCKDAGLAKSIGVSNFNRRQLEMI LNKPGLKYKPV CNQVECHPYFNRSKLLD
FCKSKDIVLVAYSALGSRDKRWVDPNSPVLLEDVLCALAKKHKRTPALIALRYQLQRGVVVLAKSY
NEQRIRQNVQVFEFQLTAEDMKAIDGLDRNLHYFNSDSFASHPNYPYSDEY

>NP_001809.3 aldo-keto reductase family 1 member C4 [Homo sapiens]
MDPKYQRVELNDGHFMPVLGFGTYAPPEVPRNRAVEVTKLAIEAGFRHIDSAYLYNNEEQVGLAIRSK
IADGSVKREDIFYTSKLVCTFFQPQMVQPALESSLKKLQLDYVDLYLLHFPMALKPGETPLPKDENGK
VIFDTVDLSATWEVMEKCKDAGLAKSIGVSNFNCRQLEMI LNKPGLKYKPV CNQVECHPYLNQSKLLD
FCKSKDIVLVVAHSALGTQRHKLWVDPNSPVLLEDVLCALAKKHKRTPALIALRYQLQRGVVVLAKSY
NEQRIRENIQVFEFQLTSEDMKVL DGLNRNYRYVVMDFLMDHPDY PFSDEY

>gi|313104233|sp|P14061.3|DHB1_HUMAN AltName: Full=17-beta-
hydroxysteroid dehydrogenase type 1;
MARTVVLITGCSSGIGLHLAVRLASDPSQSFKVYATLRDLKTQGRWLWEAARALACPPGSLETQLDVR
DSKSVAAARERVTEGRVDVLCNAGLGLLGPLEALGEDAVASVLDVNVVGTVRMLQAFPLPDMKRRGSG
RVLVTGSGVGLMGLPFNDVYCASKFALEGLCESLAVLLLPFGVHLSLIECGPVHTAFMEKVLGSPPEEV
LDRTDIHTFHRFYQYLAHSKQVFREAAQNPEEVAEVFLTALRAPKPTLRYFTTERFLPLLRMLDDPS
GSNYVTAMHREVF GDVPAKAEAGAEAGGGAGPGA EDEAGRGA VGDPELGDPPAAPQ

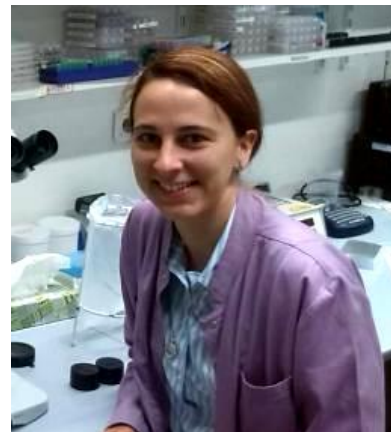
Прилог 2. Номенклатура и структуре аминокиселина са једно- и трословном ознаком (https://en.wikipedia.org/wiki/Proteinogenic_amino_acid)



Den Cojocari, Department of Medical Biophysics, University of Toronto, 2010

Биографија

Јована Плавша је рођена 21.05.1989. године у Суботици. У Новом Саду је завршила основну школу и гимназију као носилац Вукове дипломе. Основне студије биологије је уписала 2008. године на Природно-математичком факултету у Новом Саду и завршила 2012. са просеком 9.65, исте године је уписала мастер студије на модулу молекуларни биолог и завршила их 2013. са просеком 10. Затим, уписује и докторске студије, смер доктор биолошких наука, све испите је положила са просечном оценом 10.00.



Године 2014. је изабрана у звање истраживач-приправник за ужу научну област молекуларна биологија, док је 2017. изабрана у звање истраживач-сарадник у Лабораторији за биохемију и молекуларну биологију. За време докторских студија учествовала је у извођењу практичне наставе на курсевима Биохемија, Молекуларна биологија еукариота, Методе у структурној биологији и другим.

Током студија била је стипендиста Министарства просвете Републике Србије и Министарства за спорт и омладину. Вишеструки је добитник Изузетне награде Универзитета у Новом Саду за постигнут успех у претходним годинама студија и Изузетне награде за завршене студије. Добитник је награде „Иван Ђаја“, за најбољи мастер рад из области биохемије и физиологије животиња, коју додељује Универзитет у Београду.

За време својих студија боравила је и радила на Универзитету у Лозани, у Швајцарској, у Центру за интегративну геномику, затим у оквиру пројеката за време докторских студија је боравила и радила на Факултету за хемију и хемијску технологију у Љубљани, у Словенији и више пута на Институту за органску хемију и биохемију, у Прагу, у Чешкој. Поред истраживачких боравака, Јована је своје образовање обогатила и различитим међународним курсевима из макромолекуларне кристалографије и протен-лиганд интеракција организованих под покровитељством Федерације европских биохемичара и за сваки курс била награђена стипендијом. Затим, на курсевима о дизајнирању лекова у Чешкој и на TRAIN курсевима за усавршавање академског особља на Универзитету у Новом Саду.

Аутор и коаутор је четири рада у међународним часописима, три рада у домаћим научним часописима и 18 саопштења са домаћих и међународних конференција. Добитник је и награде за најбољи постер на 25. Конференцији српског кристалографског друштва, а исте године је добила и стипендију од Међународне уније кристалографа за учешће на наведеној конференцији.

Члан је Српског биолошког друштва, Биохемијског друштва Србије, Удружења за протеомику, Српског кристалографског друштва и Српског друштва за молекуларну биологију.

Нови Сад, 2018.

Јована Плавша(-Пуж)

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБ:	
Идентификациони број, ИБР	
Тип документације, ТД:	Монографска документација
Тип записа, ТЗ:	Текстуални штампани материјал
Врста рада, ВР:	Докторска дисертација
Аутор, АУ	Јована Плавша
Ментор, МН:	др Едвард Петри, ванредни професор
Наслов рада, НР:	Идентификација и анализа потенцијалних супстрата и инхибитора хуманих протеина подфамилије 1С алдо-кето редуктаза (AKR1C) добијених рекомбинантном експресијом
Језик публикације, ЈП:	Српски, ћирилица
Језик извода, ЈИ:	Српски/Енглески
Земља публикавања, ЗП:	Република Србија
Уже географско подручје, УГП:	Војводина
Година, ГО:	2018
Издавач, ИЗ:	Ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Нови Сад, Трг Доситеја Обрадовића 2
Физички опис рада, ФО:	12 поглавља, 170 страна, 162 лит. цитата, 17 табела, 85 слике и графика, 2 прилога
Научна област, НО:	Биолошке науке
Научна дисциплина, НД:	Молекуларна биологија
Предметна одредница, кључне речи, ПО:	Алодо-кето редуктазе, инхибитори, ензимски есеј, кристалографија X-зрацима, рекомбинанти протеин
УДК:	
Чува се, ЧУ:	У библиотеци Природно-математичког факултета у Новом Саду, Трг Доситеја Обрадовића 2, 21000 Нови Сад
Важна напомена, ВН:	Нема
Извод, ИЗ:	Истраживање има фокус на хуманим ензимима из суперфамилије алдо-кето редуктаза, које имају велики метаболички значај за хомеостатско функционисање организма. Неки од чланова подфамилије 1С алдо-кето редуктаза (AKR1C) имају улогу у развоју одређених патолошких стања, као што су леукемија, тумори простате, дојке и ендометријума, као и у смањивању ефекта хемотерапија. До сада није регистрован лек који директно утиче на протеине ове групе и самим тим је акценат на изналажењу специфичних лиганата (супстрата, инхибитора), који би могли да имају фармаколошку примену, али и на утврђивању везе између структуре и функције испитиваних лиганата према ензиму. Теза је имала фокус на протеину AKR1C3. У овој дисертацији је представљена оптимизација ензимског есеја и испитивање потенцијалних лиганата и њиховог ефекта на ензимску активност одређених хуманих изоформи протеина из подфамилије AKR1C. Тестирана су синтетисана стероидна једињења, комерцијална једињења и биљни екстракти. Стероидни лиганди (AKR-1, -2, -3, -7, -9, -19 и -22) који су показали добре инхибиторне карактеристике су детаљније описани одређеним добијеним кинетичким параметрима и затим су кокристализовани са протеином и кофактором. Од 7 различитих комплекса протеина са најбољим

	инхибитором, за два комплекса су добијене дифракције са инхибитором и решене кристалне структуре са лигандом у везном месту и врло добром резолуцијом, AKR-7: 1.7 Å, AKR -19: 1.6 Å . Ови резултати представљају прве протеинске кристале чију су структуру решили истраживачи из Србије, а у научном смислу и одличну основу за даљи дизајн и тестирање једињења и кокристализације.
Датум прихватања теме од стране Сената, ДП:	13.04.2017.
Датум одбране:	
Чланови комисије, КО: Председник:	др Данијела Којић, ванредни професор, Департман за биологију и екологију, ПМФ, Нови Сад
Члан:	др Душко Благојевић, научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Београд
Члан:	др Анђелка Ћелић, ванредни професор, Департман за биологију и екологију, ПМФ, Нови Сад
Члан:	др Јелена Пураћ, ванредни професор, Департман за биологију и екологију, ПМФ, Нови Сад
Члан (Ментор)	Др Едвард Петри, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number, AN:	
Identification number, INO:	
Document type, DT:	Monograph type
Type of record, TR:	Printed text
Contents code, CC:	PhD thesis
Author, AU:	Jovana Plavša
Mentor, MN:	Dr Edward Petri, associate professor
Title, TI:	Identification and analysis of potential substrates and inhibitors of human protein subfamily 1C aldo-keto reductase (AKR1C) obtained by recombinant expression
Language of text, LT:	Serbian
Language of abstract, LA:	Serbian/English
Country of publication, CP:	Republic of Serbia
Locality of publication, LP:	Vojvodina
Publication year, PY:	2018
Publisher, PU:	Author's reprint
Publication place, PP:	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2
Physical description, PD:	12 chapters, 170 pages, 85 figures, 17 tables, 162 references
Scientific field, SF:	Biology
Scientific discipline, SD:	Molecular biology
Subject, Key words, S/KW:	Aldo-keto reductase, inhibitors, enzymatic assay, X-ray crystallography, recombinant protein
UC	
Holding data, HD:	Library of Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad
Note, N:	None
Abstract, AB:	<p>This research focuses on human enzymes of the aldo-keto reductase superfamily, whose functions have a significant metabolic impact on organism homeostasis. Some members of the 1C aldo-keto reductase (AKR1C) subfamily play role in the development of specific pathological conditions, such as leukaemia, prostate cancer, breast cancer and endometrial cancer, as well as reducing the effectiveness of chemotherapy. However, currently there are no approved and registered drugs that directly affect proteins from this subfamily. Therefore our main aim was to screen for specific ligands (substrates, inhibitors) with potential pharmacological applications, and to establish structure-activity relationships for these ligands and enzymes. This thesis mainly focuses on isoform AKR1C3. In this dissertation, optimization of an enzymatic assay and testing of potential ligands and their effects on the enzymatic activity of specific human isoforms of proteins from subfamily AKR1C are presented. Tested ligands include synthetic steroidal compounds, commercial compounds and plant extracts. Steroid compounds, AKR-1, -2, -3, -7, -9, -19 and -22, were found to be good inhibitors of AKR1C3, and further kinetic studies were conducted. Finally, cocrystallization of protein AKR1C3 with cofactor and these inhibitors was accomplished. From 7 different complexes of protein with inhibitors, two structures were solved to very high resolution, AKR-7: 1.7 Å, AKR -19: 1.6 Å. These results represent the first protein crystal structures solved by researchers from Serbia, and results provide an excellent basis for further</p>

	design and testing of new inhibitors.
Accepted on Scientific Board on, AS:	13.04.2017.
Defended, DE:	
Thesis defend board, DB:	
President:	Dr Danijela Kojić Associate professor, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Novi Sad
Member:	Dr Duško Blagojević Principal research fellow, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Beograd
Member:	Dr Anđelka Čelić, Associate professor, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Novi Sad
Member:	Dr Jelena Purać Associate professor, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Novi Sad
Member (mentor):	Dr Edward Petri, Associate professor, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Novi Sad