



Универзитет у Новом Саду
Природно-математички факултет
Департман за биологију и екологију



**ИДЕНТИФИКАЦИЈА ДЕРИВАТА ЖУЧНИХ
КИСЕЛИНА КАО ЛИГАНАДА ХУМАНЕ
РЕКОМБИНАНТНЕ 3α -ХИДРОКСИСТЕРОИД
ДЕХИДРОГЕНАЗЕ ТИПА 3 (3α ХСД-3) И
СТРУКТУРНЕ ОСНОВЕ МОДУЛАЦИЈЕ
ЕНЗИМСКЕ АКТИВНОСТИ**

Докторска дисертација

Ментор:
Проф. др Анђелка Ћелић

Кандидат:
Маја Мариновић

Нови Сад, 2022.

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Маја Мариновић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Др Анђелка Ћелић, ванредни професор, Департман за биологију и екологију, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду
Наслов рада:	Идентификација деривата жучних киселина као лиганада хумане рекомбинантне 3 α -хидроксистероид дехидрогеназе типа 3 (3 α ХСД-3) и структурне основе модулације ензимске активности
Језик публикације (писмо):	Српски језик (ћирилица)
Физички опис рада:	Страница 153 Поглавља 7 Литературних навода 144 Табела 11 Слика 59 Графикона 61 Прилога 2
Научна област:	Биологија
Ужа научна област (научна дисциплина):	Молекуларна биологија (структурна биологија – ензимологија)
Кључне речи / предметна одредница:	3 α -хидроксистероид дехидрогеназа, жучне киселине, протеин-лиганд интеракције, инхибиција ензимске активности, структура протеина, дизајн лекова на основу структуре протеина

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штапане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штапаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

Резиме на језику рада:	<p>Хумана 3α-хидроксистероид дехидрогеназа типа 3 (3αХСД-3) је ензим из потпородице АКР1Ц који у присуству кофактора NADPH катализује редукцију алдехидних и кето група различитих ендогених и екзогених супстрата међу којима су стероиди, простагландини и ксенобиотици. За овај ензим је карактеристичан висок афинитет за жучне киселине, које након везивања инхибирају његову активност. Ензим 3αХСД-3 је уплетен у развој различитих болести, укључујући неке форме канцера код којих доводи до развијања отпорности туморских ћелија на хемиотерапију. У овој дисертацији тестирана су једињења из библиотеке деривата жучних киселина: најпре је <i>in vitro</i> претрагом утврђено која једињења имају инхибиторно дејство на 3αХСД-3; потом је мерењем IC50 вредности и инхибиције активности сродног ензима 17βХСД-5 тестирана јачина, односно специфичност инхибиције; на крају је <i>in silico</i> и кристалографским студијама утврђена структурна основа везивања испитиваних једињења за 3αХСД-3 односно 17βХСД-5. За неколико испитиваних једињења је утврђено да се везују у активно место ензима. Везивању доприносе поларне групе лигананда, остварујући нековалентне везе са аминокиселинским остацима из активног места. Истовремено, активно место се малим померајима аминокиселинских остатака прилагођава лиганду. Овакво „индуковано” прилагођавање АКР ензима лигандима описано је у радовима неколико истраживачких група. На основу сазнања до којих се дошло у овој дисертацији могуће је дизајнирати нове инхибиторе који би се боље и специфичније везивали за 3αХСД-3, а који би у будућности нашли примену у основној науци, као и у терапији патолошких стања повезаних са нарушеном експресијом 3αХСД-3, укључујући и неке метастатске болести.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	17. 05. 2019.
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	<p>Председник: др Сузана Јовановић-Шанта, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан: др Наталија Половић, редовни професор, Хемијски факултет, Универзитет у Београду</p> <p>Члан: др Жељко Поповић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан: др Едвард Петри, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан (ментор): др Анђелка Ћелић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p>
Напомена	

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Ph.D. thesis
Author:	Maja Marinović
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Anđelka Ćelić, Ph.D., Associate Professor, Department of Biology and ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Thesis title:	Identification of bile acid derivatives as human type 3 3α -hydroxysteroid dehydrogenase (3α HSD-3) inhibitors and structural bases of enzymatic activity modulation
Language of text (script):	Serbian language (Cyrillic)
Physical description:	Pages 153 Chapters 7 References 144 Tables 11 Illustrations 59 Graphs 61 Appendices 2
Scientific field:	Biology
Scientific subfield (scientific discipline):	Molecular biology (structural biology – enzymology)
Subject, Key words:	3α -hydroxysteroid dehydrogenase, bile acids, protein-ligand interactions, inhibition of enzymatic activity, protein structure, structure-aided drug design

a² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

<p>Abstract in English language:</p>	<p>Human type 3 3α-hydroxysteroid dehydrogenase (3αHSD-3) is a member of the AKR1C subfamily of enzymes. Members of the AKR1C subfamily catalyze the reduction of aldehyde and keto groups of various endogenous and exogenous substrates including steroids, prostaglandins, and xenobiotics. AKR1C enzymes work in an NADPH-dependent manner. A distinctive characteristic of 3αHSD-3 is that it binds bile acids, which in return act as inhibitors of its enzymatic activity. 3αHSD-3 is involved in the development of certain pathological conditions including several types of cancer, where its overexpression has been proven to lead to chemotherapy resistance. In this thesis, a library of bile acid derivatives was put through <i>in vitro</i> screening for changes in 3αHSD-3 enzymatic activity. For compounds that have shown inhibitory potential towards 3αHSD-3, inhibition strength and specificity were estimated utilizing IC50 measurement and 17βHSD-5 inhibition screening. Finally, <i>in silico</i> and crystallographic data were combined to propose a structural model of binding and inhibition of enzymatic activity. Several compounds were found to bind to the 3αHSD-3 active site, and this binding was favored by polar contacts between hydrophilic groups of tested compounds and amino acid residues in the active site of the enzyme. Small changes in the position of certain residues were noticed, and these changes improved the fitting of ligands to the active site of 3αHSD-3. This 'induced fitting' of ligand to the active site of 3αHSD-3 has been observed by several research groups in the past. Results shown in this dissertation can lead to the synthesis of better inhibitors of 3αHSD-3, which could be used in fundamental science, but might as well lead to the development of new drugs that would serve as adjuvant therapy for the treatment of metastatic diseases and other conditions caused by 3αHSD-3 overexpression.</p>
<p>Accepted on Scientific Board on:</p>	<p>17. 05. 2019.</p>
<p>Defended: (Filled by the faculty service)</p>	
<p>Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)</p>	<p>President: Suzana Jovanović-Šanta, Ph.D., Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p> <p>Member: Natalija Polović, Ph.D., Full Professor, Faculty of Chemistry, University of Belgrade</p> <p>Member: Željko Popović, Ph.D., Associate Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p> <p>Member: Edward Petri Ph.D., Associate Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p> <p>Member (mentor): Anđelka Čelić, Ph.D., Associate Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p>
<p>Note:</p>	

Од срца се захваљујем

Професорима и истраживачима Лабораторије за Биохемију и молекуларну биологију. Част ми је што сам имала прилику да докторске студије проведем баш на Биохемији.



Професорици др Марији Сакач која ме је са осмехом примила у свој истраживачки тим.

Менторки проф. др Анђелки Ћелић и проф. др Едварду Петрију. Хвала вам на указаном поверењу, пренесеном знању и неизмерној помоћи током докторских студија.

Колегама са хемије, математике и физике, као и професорима и истраживачима других лабораторијама нашег департмана на несебичном дељењу својих знања и ресурса.

I express my deepest gratitude to our collaborators from Ljubljana, Bratislava, Minsk, Porto, and Prague for the experience and results acquired in working visits to their laboratories. I owe a special thanks to Dr. Pavlína Řezáčová and members of her team for making my dream of doing protein crystallography and solving protein structures come true.

Мојим другарима и колегама Немањи и Стефану на подршци из иностранства.

Мами која ме је од када знам за себе свим срцем бодрила да остварим циљеве које сам пред себе постављала. Баки Мари која више није са нама, али сам сигурна да са неког бољег места навија за мене, исто као што је радила за овоземаљског живота.

Мом Жељку, који је веровао у мене и када ја нисам.

Како је рекао Душко Радовић, на крају свих крајева – увек један нови почетак, тако одбрањен докторат не представља крај, већ почетак новог, за искуство богастијег поглавља у истраживачком раду.

САДРЖАЈ

1. УВОДНО РАЗМАТРАЊЕ	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	2
2.1. Место 3α ХСД-3 у суперфамилији алдо-кетол редуктаза (АКР)	2
2.2. Кинетика и механизам ензимске катализе алдо-кетол редуктаза	4
2.3. Место 3α -ХСД-3 у породици АКР1 и потпородици АКР1Ц	6
2.4. 3α -хидроксистероид дехидрогеназа типа 3: структура, функција, повезаност структуре и функције	9
2.4.1. Структурне карактеристике 3α ХСД-3	11
2.5. Функције 3α ХСД-3 у метаболизму	14
2.6. Улога 3α ХСД-3 у настанку и развоју патолошких стања	16
2.6.1. Канцер	16
2.6.2. Улога 3α ХСД-3 у настанку и развоју канцера дојке	18
2.6.3. Улога 3α ХСД-3 у настанку и развоју канцера простате	19
2.6.4. Улога 3α ХСД-3 у настанку ендометриозе	20
2.6.5. Улога 3α ХСД-3 у развоју отпорности на хемиотерапију	21
2.6.6. Улога 3α ХСД-3 у поремећајима синтезе неуростероида	23
2.7. Инхибиција 3α ХСД-3	24
2.7.1. Нестероидни противупални лекови као инхибитори АКР	24
2.7.2. Жучне киселине као инхибитори 3α ХСД-3	25
2.8. Теоријске основе техника коришћених у истраживању	27
2.8.1. Рекомбинантна хетерологна експресија протеина у <i>E. coli</i>	27
2.8.2. Праћење ензимске активности АКР мерењем потрошње NADPH	30
2.8.3. Утишавање флуоресценције триптофана у активном месту ензима	32
2.8.4. Молекулски докинг за превиђање протеин-лиганд интеракција	33
2.8.5. Молекулска динамика протеин-лиганд комплекса	35

2.8.6. Основе рендгенске кристалографије протеина	37
2.8.6.1. Кристализација протеина	37
2.8.6.2. Основе теорије дифракције x-зрака на кристалима	39
2.8.6.3. Одређивање структуре протеина	41
3. ЦИЉЕВИ РАДА	42
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	43
4.1. Материјал	43
4.1.1. Бактеријски сојеви коришћени за рекомбинантну експресију	43
4.1.2. Плазмиди коришћени за рекомбинантну експресију	43
4.1.3. Тестирана једињења	44
4.2. Методе рада	49
4.2.1 Експресија рекомбинантних 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5 у <i>E. coli</i>	49
4.2.1.1. Добијање хемијски компетентних бактерија <i>E. coli</i>	49
4.2.1.2. Трансформација бактерија	50
4.2.1.3. Пречишћавање плазмидне ДНК из ћелија <i>E. coli</i> соја DH5 α	52
4.2.1.4. Хетерологна експресија протеина у ћелијама <i>E. coli</i> соја BL21	53
4.2.2. Лизирање BL21 ћелија након хетерологне експресије протеина	53
4.2.3. Пречишћавање активних 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5 из бактеријског лизата .	54
4.2.4. Денатуришућа електрофореза у полиакриламидном гелу (SDS-PAGE) ..	56
4.2.5. Одређивање концентрације протеина	59
4.2.6. Одређивање активности ензима мерењем промене апсорбанце NADPH	60
4.2.7. Утишавање флуоресценције триптофана у активном месту ензима	62
4.2.8. Пречишћавање 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5 за кристалографске студије	63
4.2.9. Есеј термалног помераја за испитивање стабилности протеина	66
4.2.10. Рендгенска структурна анализа	68
4.2.10.1. Кристализација протеина	68

4.2.10.2. Снимање дифракционе слике за добијене кристале	72
4.2.10.3. Одређивање структуре добијених кристала	74
4.2.11. Молекулски докинг	76
4.2.12. Молекулска динамика	78
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	84
5.1. Ензимска активност хетерологно експримиране 3 α ХСД-3	84
5.1.1. Провера активности хетерологно експримиране 3 α ХСД-3	84
5.1.2. Инхибиција 3 α ХСД-3 дериватима жучних киселина	86
5.1.3. Јачина инхибиције 3 α ХСД-3 дериватима жучних киселина	96
5.1.4. Специфичност деривата жучних киселина према 3 α ХСД-3	99
5.1.5. Утишавање флуоресценције триптофана 3 α ХСД-3 једињењем ЈГ6	101
5.2. Молекулски докинг деривата жучних киселина у 3 α ХСД-3	103
5.3. Молекулска динамика 3 α ХСД-3 – NADP ⁺ са једињењем ЈГ6	109
5.4. Кристалографске студије у потпородици АКР1Ц	119
5.4.1. Кристализација ензима потпородице АКР1Ц	119
5.4.2. Структура 17 β ХСД-5 у апопротеинској форми	116
5.4.3. Структура 17 β ХСД-5 у комплексу са инхибитором ДС7	118
6. ЗАКЉУЧАК	128
7. ЛИТЕРАТУРА	130
ПРИЛОГ 1	141
ПРИЛОГ 2	143
БИОГРАФИЈА КАНДИДАТА	152

1. УВОДНО РАЗМАТРАЊЕ

Ензими из суперфамилије алдо-кето редуктаза (АКР) катализују редукцију алдехидних и кето група различитих супстрата, међу којима су простагландини, стероидни хормони и ксенобиотици. Имајући у виду широк спектар једињења која алдо-кето редуктазе прихватају као супstrate, јасно је да ови ензими играју значајну улогу у различитим физиолошким и патолошким стањима организма. У здравом организму, ови ензими учествују у метаболизму и сигналним путевима у ћелији, али при нарушеној хомеостазии, АКР су уплетене у различита патолошка стања, укључујући запаљенске процесе и метастатске болести. Неки чланови потфамилије АКР укључени су у метаболизам стероидних једињења, па се називају хидроксистероид дехидрогеназама (ХСД). Хумана 3 α -хидроксистероид дехидрогеназа типа 3 (3 α ХСД-3), позната и под називом алдо-кето редуктаза 1Ц2 (АКР1Ц2) је ензим који редукује активне стероидне хормоне (естрадиол, прогестерон, тестостерон, 5 α -дихидротестостерон) до мање потентних аналога и сигналних молекула. Даље, 3 α ХСД-3 учествује у метаболизму простагландина и ксенобиотика, међу којима су и неки широко коришћени хемиотерапеутици. Особина 3 α ХСД-3, по којој се издваја међу осталим АКР, јесте висок афинитет за везивање жучних киселина, које га након везивања инхибирају.

У наредном поглављу дат је преглед досадашњих сазнања о структури и функцији 3 α ХСД-3, вези између структуре и функције, као и повезаности овог ензима са различитим патолошким стањима. Идентификација нових лиганата 3 α ХСД-3, које је логично тражити међу дериватима жучних киселина, могла би да пружи основу за ближе расветљавање улоге овог ензима у физиолошким и патолошким процесима, при чему би се он јасно могао издвојити од других, структурно и функционално сродних ензима. Такође, нови лиганди би били основа за дизајн лекова који би се користили у терапији патолошких стања изазваних прекомерном експресијом или активношћу 3 α ХСД-3, као што су различити типови канцера или поремећаји хомеостазе стероидних хормона. Ова докторска дисертација комбинује неколико *in vitro* и *in silico* приступа за проучавање ензимске активности и протеин-лиганд интеракција 3 α ХСД-3 са кристалографским студијама сродног ензима 17 β ХСД-5 (17 β хидроксистероид дехидрогеназа типа 5), познатог и под називом алдо-кето редуктаза 1Ц3 (АКР1Ц3), да би се добио увид у структурне основе везивања деривата жучних киселина за 3 α ХСД-3 и утицај ових једињења на њену активност.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Место 3 α ХСД-3 у суперфамилији алдо-кето редуктаза (АКР)

Суперфамилија алдо-кето редуктаза (АКР) обухвата оксидоредуктазе које катализују редукцију широког спектра ендогених и екзогених алдехида и кетона до одговарајућих алкохола. Реч је о NADH или NADPH зависним ензимима укљученим у метаболизам различитих угљених хидрата, липида, простагландина, стероида и ксенобиотица, као што су полициклични ароматични угљоводоници (*Adeniji u cap. 2013, Penning 2015*).

Ензими из суперфамилије АКР су експримирани у ћелијама биљака, животиња, протозоа, гљива, еубактерија и археа. Реч је углавном о мономерним протеинима, молекулске масе 34–37 kDa. Суперфамилија обухвата 105 до данас идентификованих чланова, подељених у 16 породица које се обележавају бројевима (нпр. АКР1) (*Bohren u cap. 1989, Hyndman u cap 2003*).

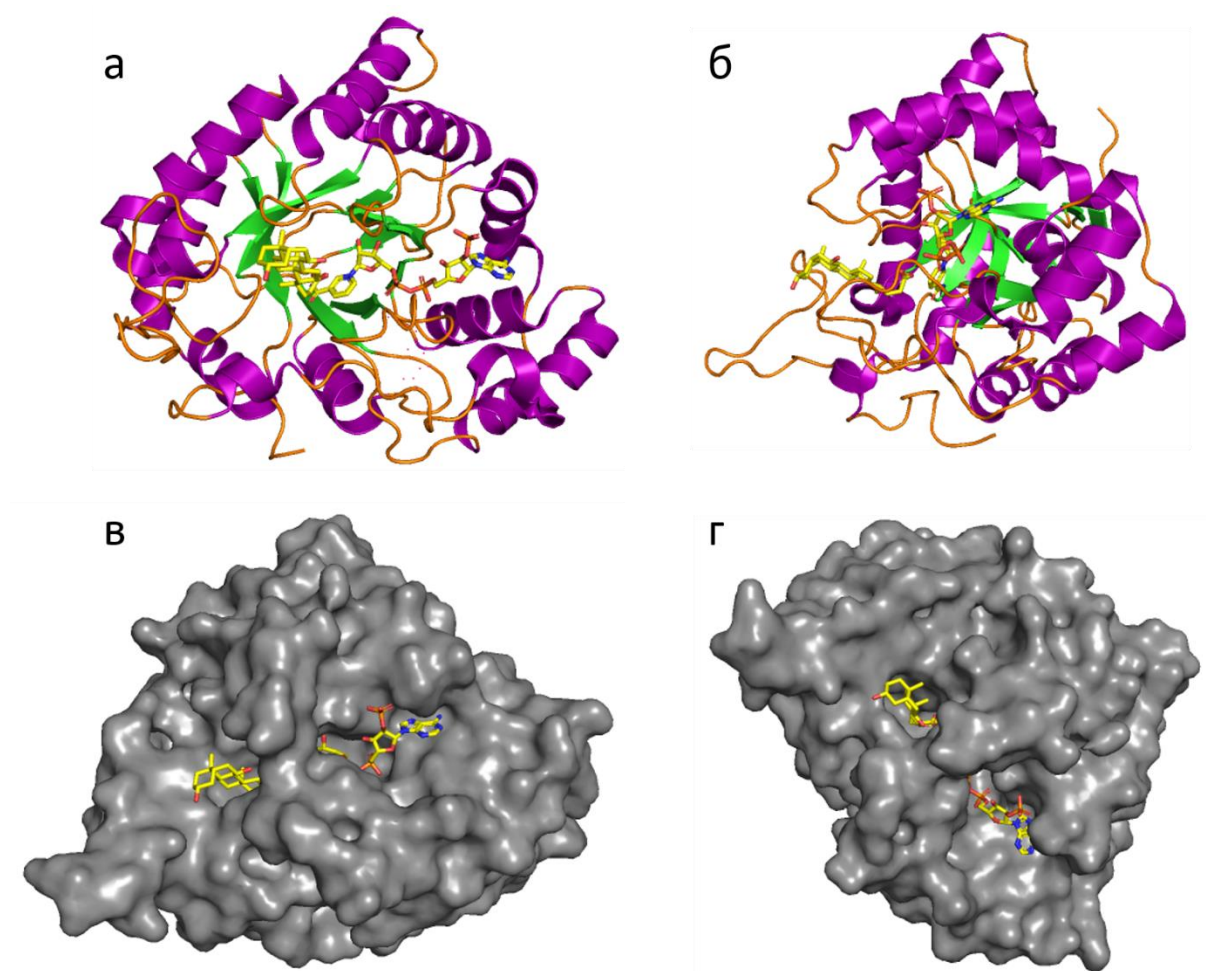
У оквиру фамилија издвајају се потфамилије чији чланови имају више од 60% сличности аминокиселинске секвенце. Потфамилије се обележавају словима абетеде након ознаке фамилије (нпр. АКР1Ц), док се поједини ензими обележавају арапским бројем након назива потфамилије (нпр. АКР1Ц2) (*Oppermann 2007, Penning 2015*).

Структурно, АКР су ензими који садрже очуван мотив буренцета триозо-фосфат изомеразе (*енгл. triose phosphate isomerase barrel – TIM barrel*). Овај мотив се састоји од 8 антипаралелно постављених β плоча, и 8 α хеликса који су позиционирани са спољашње стране плоча (слика 2.1). Код појединих чланова могуће је присуство додатних хеликса, а три петље на периферији буренцета укључене су у препознавање и специфичност према лигандима (*Penning 2015*).

У активном месту свих АКР је очувана каталитичка тетрада, која се састоји од остатака тирозина, лизина, аспартата и хистидина (*Jin u cap. 2001, Couture u cap. 2005*). Алдо-кето редуктазе садрже следеће регионе са очуваном аминокиселинском секвенцом: N крај са очуваном секвенцом LxxxGxxxPxxGxG и део активног места са очуваним GxxxxDxAxxY и LxxxxxxxxDxxxxH мотивима (*Pennig 2015*).

До данас је у ПДБ базу приложена 381 структура различитих алдо-кето редуктаза у апопротеинској форми или са лигандима (*Berman u cap. 2014*).

Иако АКР у *in vitro* условима функционишу као оксидоредуктазе, у *in vivo* условима функционишу готово искључиво као редуктазе. Њихова активност условљена је рН вредношћу средине у ћелији, као и већим афинитетом за редуковане форме кофактора (NADH или NADPH, у односу на NAD^+ или NADP^+), тако да ови ензими практично немају оксидазну активност у живом организму (Jez u Penning 2001).

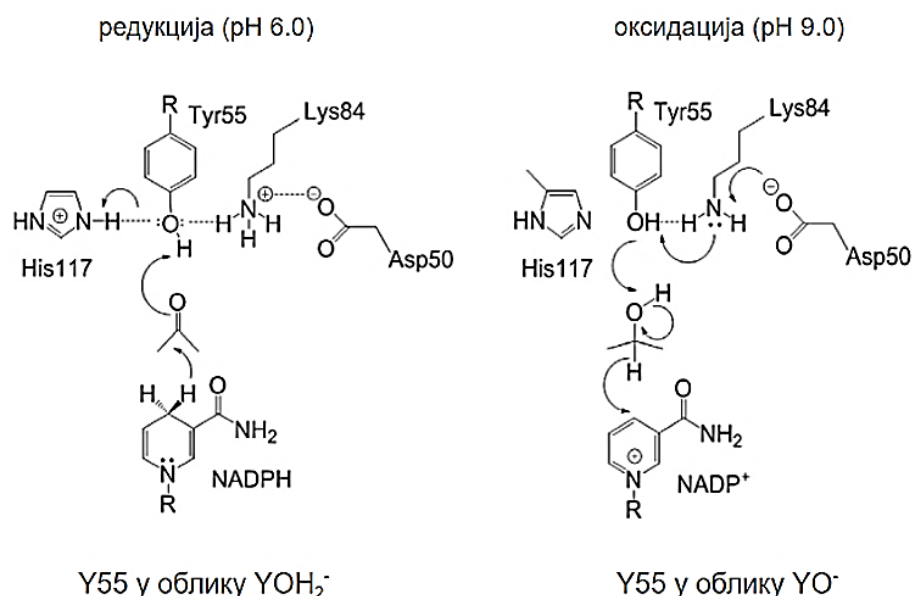


Слика 2.1. Структура АКР на примеру 3 α ХСД-3 у комплексу са NADP^+ и урсодеоксихолатом (приступни код у ПДБ бази: 1НН1, Jin u cap. 2001). Под а и б приказани су мотиви секундарне структуре: α хеликси (љубичасте спирале), β плоче (зелене стрелице чији смер показује оријентацију плоче) и петље (наранџасте линије које спајају α хеликсе и β плоче), са лигандима који су приказани у виду атома повезаних жутим штапићима. Под в и г из два угла је приказана Ван дер Валсова површина ензима из које вире жути штапићи који представљају молекуле кофактора и лиганда.

Једна од карактеристика активног места алдо-кето редуктаза јесте његова флексибилност, која омогућава прихватање широког спектра супстрата различите хемијске структуре. Међу различитим АКР ензимима очувани су делови активног места око каталитичке тетраде укључени у везивање кофактора, док је џеп за везивање лиганда тополошки много варијабилнији (Couture u cap. 2005).

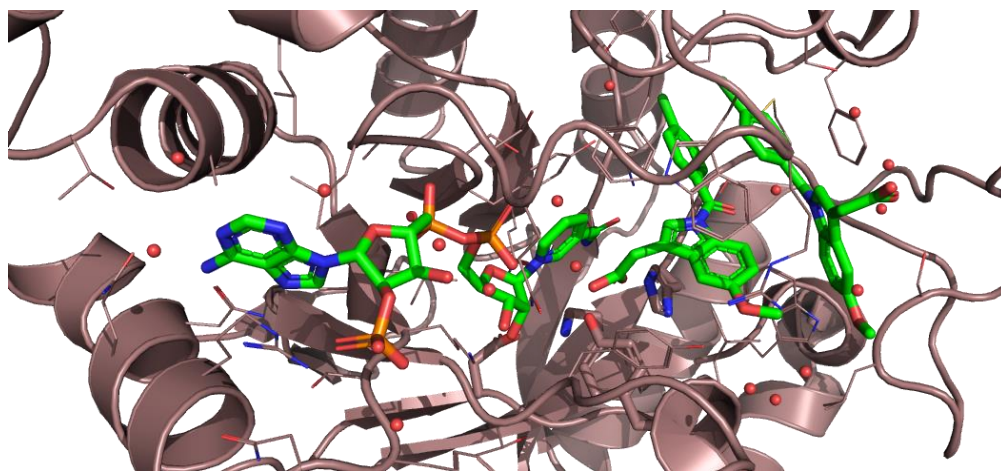
2.2. Кинетика и механизам ензимске катализе алдо-кето редуктаза

Механизам ензимске катализе код алдо-кето редуктаза је уређен би-би механизам (слика 2.2), где се кофактор први везује и последњи напушта активно место. Кофактор (NADH односно NADPH) се везује у издуженој конформацији, вирећи са С краја ензима, окренут никотинамидним прстеном ка активном месту алдо-кето редуктаза.



Слика 2.2. Механизам кисело-базне катализе алдо-кето редуктаза (прилагођено од Penning 2015).

Лиганд је у односу на кофактор оријентисан под правим углом (слика 2.3), тако да је у случају стероидног лиганда површина А прстена стероида, који носи хидроксилену или кето групу на свом С3 атому оријентисана ка никотинамидном прстену кофактора (Schlegel *u cap.* 1998, Sherbet *u cap.* 2007).

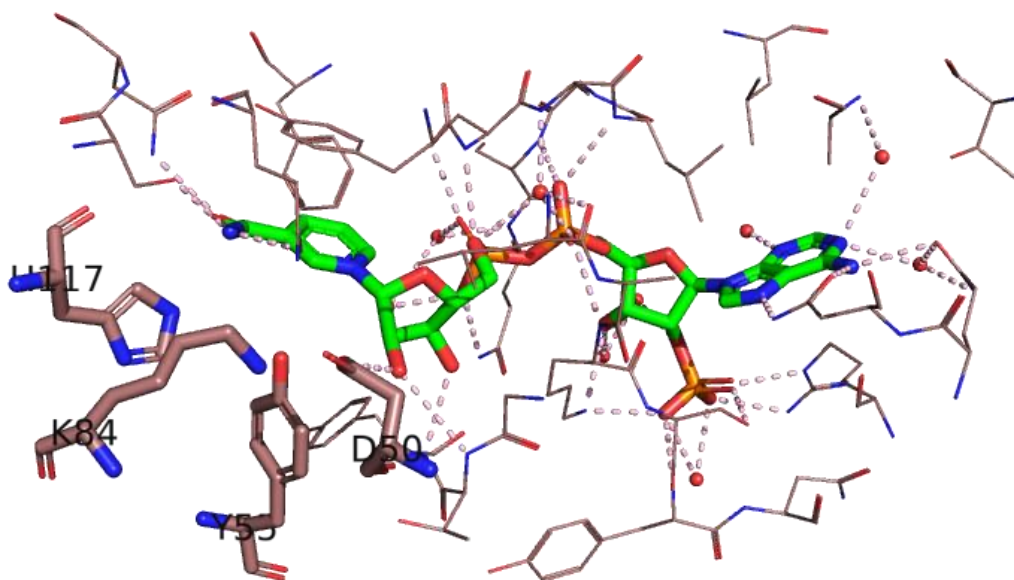


Слика 2.3. Активно место АКР приказано из структуре 17βХСД-5 под ПДБ приступним кодом 4DBW (Liedtke *u cap.* 2013). Зеленим штапићима су приказани кофактор NADP⁺ и два молекула 2'-дезметил индометацина као лиганди. Црвене лоптице представљају молекуле воде, који су нађени у активном месту у тренутку снимања дифракционе слике. Компоненте ензима су приказане у боји пудера.

Ограничавајући фактор брзине реакције редукције супстрата деловањем АКР ензима је корак везивања и ослобађања кофактора, с обзиром на то да се кофактор први везује за активно место ензима, а последњи га напушта (*Couture u cap. 2005*).

Цеп за везивање лиганда састоји се од оксианјонске рупе, у којој се налазе Y55 и H117 и у коју се смешта никотинамидни прстен кофактора, затим обода активног места, који садржи остатке A52, L54, W86 и F118 који одређују специфичност припадника потпородице АКР1Ц према врстама супстрата, као и петљи које употпуњавају активно место (*Schlegel u cap. 1998*).

Редукција супстрата подразумева 4-про- R хидридни трансфер са C4 атома никотинамидног прстена NADH односно NADPH на угљеник алдехидне или кето групе супстрата. Донор протона кофактору је Tyr55 из каталитичке тетраде. Реакција редукције алдо- и кето- супстрата до одговарајућих алкохола подразумева трансфер протона са редукованог кофактора на карбонилну групу супстрата посредством Y55. Каталитичку тетраду (слика 2.4) чине D50, Y55, K84 и H117. Остатак D50 није неопходан у катализи, али учвршћује везивање кофактора, а Y55 се понаша као општа киселина због близине H117 (који при редукцији прелази у протоновану форму), док се код оксидације понаша као база због близине D50 и K84 (*Penning 2015, Schlegel u cap. 1998*).



Слика 2.4. Кофактор NAD⁺ у каталитичкој тетради активног места 17 β ХСД-5. Штапићи означавају кофактор (зелено) и аминокиселинске остатке каталитичке тетраде (боја пудера), док су линијама обележени остаци осталих аминокиселина из активног места и околине активног места. Црвене лоптице представљају молекуле воде, а розе испрекидане линије водоничне везе које се остварују у активном месту (слика је направљена од структуре под ПДБ приступним кодом 4DBW, аутора *Liedtke u cap. 2013*).

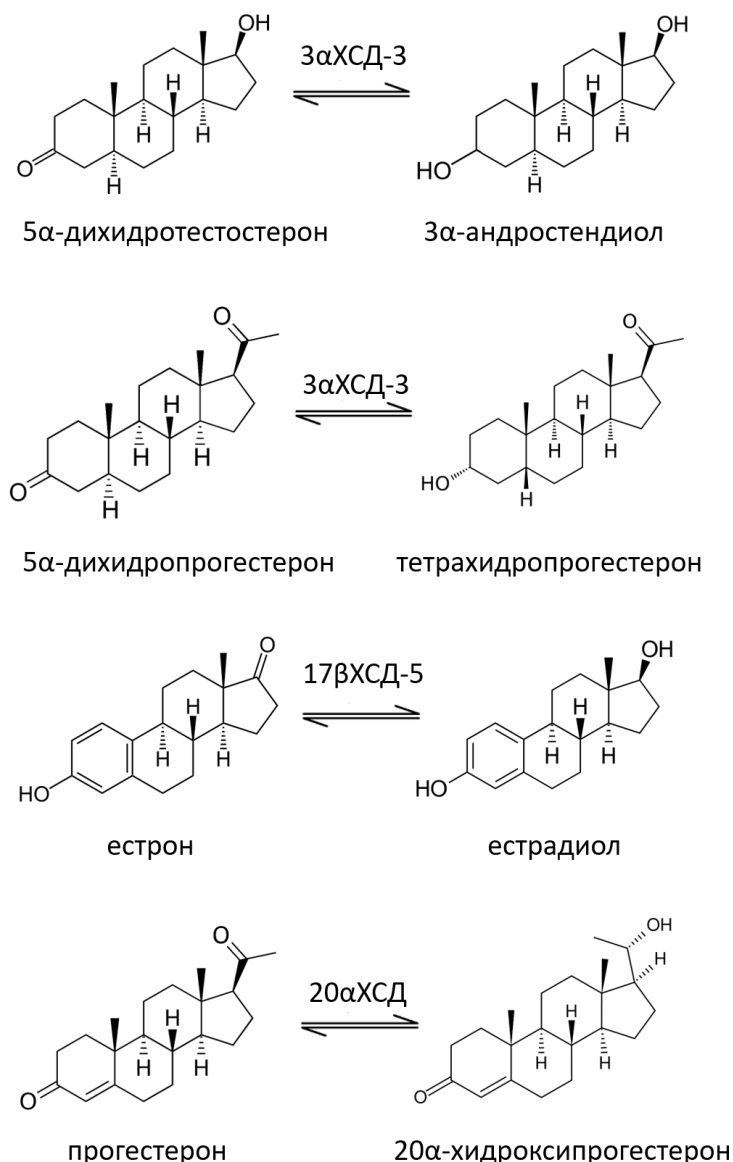
2.3. Место 3 α -ХСД-3 у породици АКР1 и потпородици АКР1Ц

Ензим 3 α ХСД-3 припада фамилији АКР1, потфамилији АКР1Ц. Потфамилија обухвата 4 цитосолна ензима: АКР1Ц4, који је експримиран искључиво у ћелијама јетре и АКР1Ц 1, 2 и 3, који имају широк спектар експресије у различитим ткивима. Ензими потпородице АКР1Ц учествују у редукцији 3–кето, 7–кето и 20–кето стероида до 3 α / β –, 17 β –, односно 20 α – хидроксистероида. Ниво структурне хомологије чланова потфамилије АКР1Ц је веома висок (84 – 98%, *Rižner u Penning 2014*).

У периферним ткивима АКР1Ц ензими, у првом реду АКР1Ц3 (17 β ХСД-5) учествују у редукцији мање потентних андрогена до главних и најјачих природних андрогена, тестостерона и 5 α -дихидротестостерона, као и у инактивацији 5 α -дихидротестостерона до неактивних метаболита (*Ji u cap. 2003*, слика 2.5). Чланови ове потфамилије такође редукују естрон до потентнијег естрадиола, а прогестерон до метаболита који могу подстаћи или спречити пролиферацију ткива дојке (*Ji u cap. 2003, Lewis u cap. 2004*, слика 2.5). Ензим АКР1Ц2 (3 α ХСД-3) редукује потентне стероидне хормоне, естрадиол и 5 α -дихидротестостерон до мање потентних хормона и метаболита (*Jin u cap. 2001*). Сви АКР1Ц ензими делују на α -прегнане у формирању алопрегненолона који је алостерни модулатор рецептора за ГАБА и НМДА у нервном систему, а АКР1Ц1 учествује у редукцији алопрегненолона до неактивних једињења (*Trauger u cap. 2002*, слика 2.5.). Ензим АКР1Ц4 учествује у синтези жучних киселина у јетри. Ензими АКР1Ц потфамилије учествују у припреми стероида за коњугацију и у редукцији коњугованих стероида (*Rižner u Penning 2014*). Многи синтетички стероиди, као што је тиболон, који се раније користио у третману ендометриозе и остеопорозе, метаболишу се АКР1Ц ензимима (*Ji u cap. 2003, Stecklebroeck u cap. 2004*). Мутације, нарушена експресија и активност АКР1 ензима, посебно оних из потфамилије АКР1Ц, потврђени су у ткивима канцера простате, дојке, дебелог црева, код леукемије, као и при упалним процесима и поремећајима синтезе неуростероида (*Penning 2015*).

Јединствена карактеристика цепа за везивање лиганда код алдо-кето редуктаза из потпородице АКР1Ц је присуство стероидног канала и три цепа: СП1, СП2 и СП3. Цеп СП1 садржи очуване остатке S118, N167, F306, F311 и Y319. Цеп СП2 садржи очуване остатке W86, C129, W227 и P311. Цеп СП3 садржи очуване Y24, E192, S217, S221, E22, W227 и F306. Чланови АКР1Ц имају оксианјонско место које представља каталитички центар ензима и садржи Y55 и H117.

Стероидни канал садржи W227 и L/V54 и кроз њега се регулише приступ лиганда активном месту ензима (*Byrns u cap. 2011, Flanagan u cap. 2012*).



Слика 2.5. Неке од реакција у метаболизму стероидних хормона које катализују АКР1Ц ензими који имају функцију хидроксистероид дехидрогеназа (ХСД, прилагођено од *Penning u cap. 2000*).

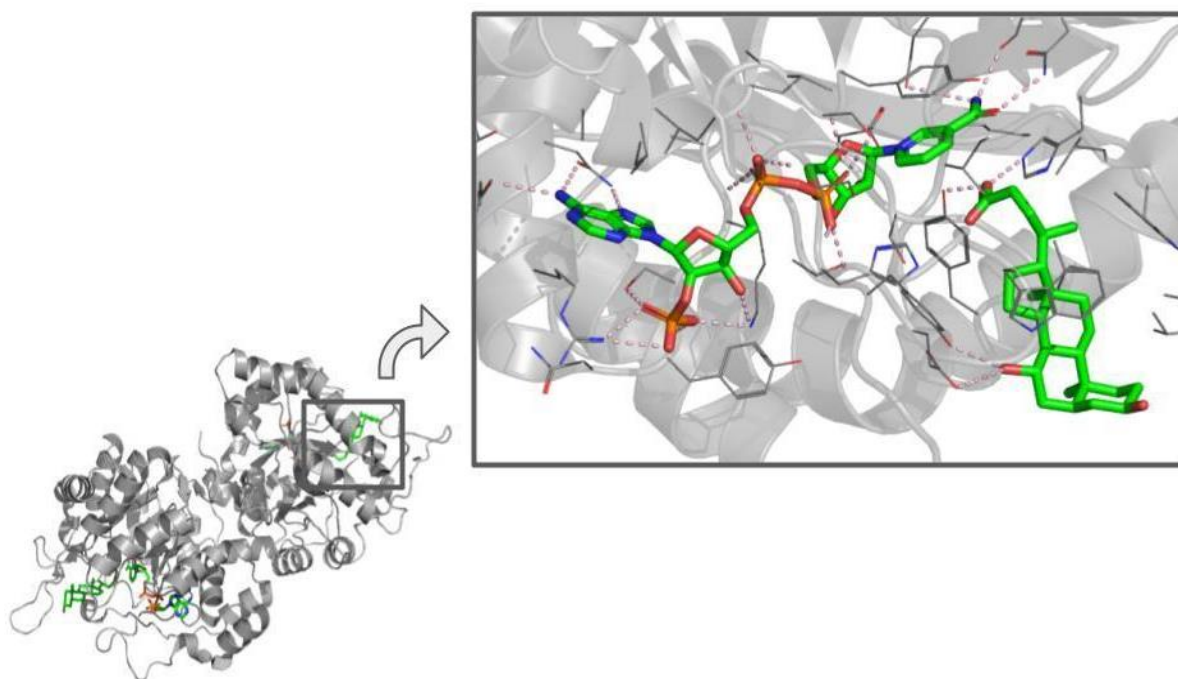
Ензими потфамилије АКР1Ц трансформишу 3- 17- и 20- кетостероиде до одговарајућих α (3-, 20-) односно β (3-, 17-) хидроксистероида. Имајући у виду улогу АКР1Ц у стероидогенези и метаболизму стероидних једињења, простагландина, ксенобиотика и других једињења, јасно је зашто су ови ензими повезани са настанком и развојем разних типова канцера, у првом реду канцера зависних од стероидних хормона као што су различити облици рака дојке и простате (*Penning 2015*).

Потфамилија АКР1Ц обухвата око 35 чланова са високим степеном структурне хомологије (84 – 98%). Чланови су сврстани у следеће изоформе:

- Ензим АКР1Ц1, односно 20 α -хидроксистероид дехидрогеназе (20 α ХСД), експримиране су у различитим ткивима. Својом 20-кетостероид редуказном активношћу учествују у трансформацији прогестерона до неактивног 20 α -хидроксипрогестерона, чиме се регулише концентрација, па тиме и могућност деловања активног хормона. Поремећена функција овог ензима може да доведе до превременог порођаја и ендометриозе (*Ji u cap. 2003*).
- Ензим АКР1Ц2, односно 3 α - хидроксистероид дехидрогеназа типа 3 (3 α ХСД-3), широко је експримиран у целом организму, а највиша стопа експресије уочена је у ткиву простате, материце и мозга. У ткиву простате 3 α ХСД-3 учествује у трансформацији 5 α -дихидротестостерона, најпотентнијег природног андрогена, до неактивног метаболита 5 α -андростен-3,17 β -диола. У нервном ткиву 3 α ХСД-3 редукује 5 β -хидроксипрогестерон до алопрегненолона. Алопрегненолон је неуростероид, алостерни модулатор рецептора за ГАБА и НМДА, а његов недостатак се доводи у везу са поремећајима расположења, посебно током предменструалног периода. Карактеристика 3 α ХСД-3 је да везује жучне киселине које притом инхибирају њену активност. Овај ензим способан је да разграђује различите ксенобиотице, међу којима су и неки цитостатици, тако да 3 α ХСД-3 смањује ефикасност терапије оваквим лековима и доводи до стицања отпорности ћелија канцера на лек (*Jin u cap. 2001, Ji u cap. 2003*).
- Ензим АКР1Ц3, односно 17 β -хидроксистероид дехидрогеназа типа 5 (17 β ХСД-5), такође је широко експримиран у организму, а највише у ткиву дојке, простате и мозга где учествује у редукцији Δ 4-андростен-3,17-диона у тестостерон, 5 α -андростен-3,17-диона у 5 α -дихидротестостерон, естрогена у естрадиол, као и простагландина ПГХ2 и ПГД2 у ПГФ2 односно 11 β ПГФ2 α . Прекомерна експресија овог ензима доводи се у везу са различитим облицима канцера, у првом реду канцера дојке и простате, чији је развој подстакнут синтезом активних форми полних хормона и сигналним путевима који су повезани са рецепторима за полне хормоне (*Lewis u cap. 2004, Penning 2015*).
- Ензим АКР1Ц4, односно 3 α ХСД-1 је ензим која је експримиран искључиво у хепатоцитима где учествује у биотрансформацијама и инактивацији стероидних хормона (*Penning 2015, Ugochukwu u cap. 2006*).

2.4. 3 α -хидроксистероид дехидрогеназа типа 3: структура, функција, повезаност структуре и функције

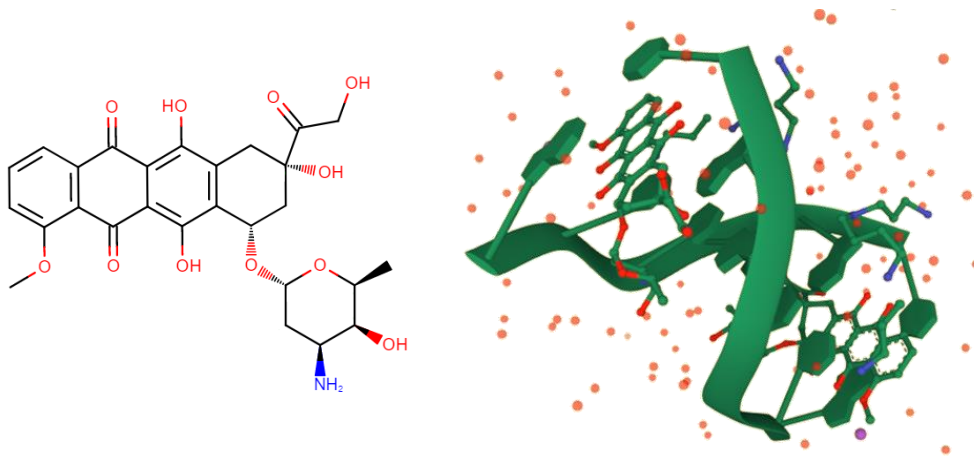
Хумана алдо-кето редуктаза типа 2 (АКР1Ц2) или 3 α -хидроксистероид дехидрогеназа типа 3 (3 α ХСД-3) је ензим из суперфамилије АКР, чија је јединствена карактеристика да везује жучне киселине, које потом делују као инхибитори овог ензима. Кристална структура комплекса 3 α ХСД-3 са кофактором NADP⁺ и лигандом урсодеоксихолатом одређена је до резолуције 3 Å и објављена 2001. године (*Jin u cap. 2001*, слика 2.6). Важно је напоменути да је 3 Å горња граница резолуције при којој је могуће проучавати протеин-лиганд интеракције. Овај ензим учествује у неколико реакција интерконверзије стероида: редукује 5 α -дихидропрогестерон до алопрегненолона, 17-хидрокси-5 α -дихидропрогестерон до 17-хидрокси-алопрегненолона и андростендиол до 5 α -дихидротестостерона (*Rižner u Penning 2014*). Наведене реакције представљају кораке у алтернативном путу биосинтезе 5 α -дихидротестостерона, најмоћнијег природног андрогена. Мутације у активном месту овог ензима доводе до једног типа синдрома андрогене неосетљивости (*Flück u cap. 2011, Hornig u Holterhus 2021*).



Слика 2.6. Структура хумане 3 α ХСД-3 у комплексу са кофактором NADP⁺ и лигандом – инхибитором урсодеоксихолатом: увећано је активно место са лигандом (приступни код у ПДБ бази 1НН1, *Jin u cap. 2001*). Зеленим тапићима су приказани кофактор и лиганд, а сивим линијама су приказани аминокиселински остаци у активном месту. Сиве спирале, стрелице и траке представљају мотиве секундарне структуре ензима.

Поремећена функција 3α ХСД-3 доводи се у везу са нарушеном функцијом рецептора за ГАБА због којих долази до различитих поремећаја расположења (*Trauger u cap. 2002*). У ћелијама јетре овај ензим трансформише синтетисане жучне киселине како би их припремио за транспорт и екскрецију. У ћелијама канцера простате детектовани су повишени нивои АКР1Ц2 транскриптата, чији протеински производи могу да учествују и у синтези и у инактивацији 5α -дихидротестостерона, што отвара још један терапијски правац за лечење канцера простате (*Ji u cap. 2003*).

Речено је да алдо-кето редуктазе, укључујући и 3α ХСД-3, имају улогу у деградацији ксенобиотика и детоксификацији организма. Имајући у виду присуство и штетне ефекте ксенобиотика на живе организме, обично се о овом ефекту АКР ензима говори са позитивног аспекта (*Barski u cap. 2008*). Међутим, у неким ситуацијама деградација ксенобиотика може бити непожељна. Цитостатици су лекови који ометају ћелијску деобу, чија је стопа највећа код малигнућ ћелија, тако да се ова група лекова користи у терапији канцера. Један од најпознатијих, најефикаснијих и најчешће коришћених цитостатика широког спектра је доксорубин (слика 2.7).



Слика 2.7. Доксорубин, структура (лево) и комплекс са молекулом ДНК (десно) (*Frederick u cap. 1990*, приступни код у ПДБ бази 1D12). Извор: ПДБ база (*Berman u cap. 2014*).

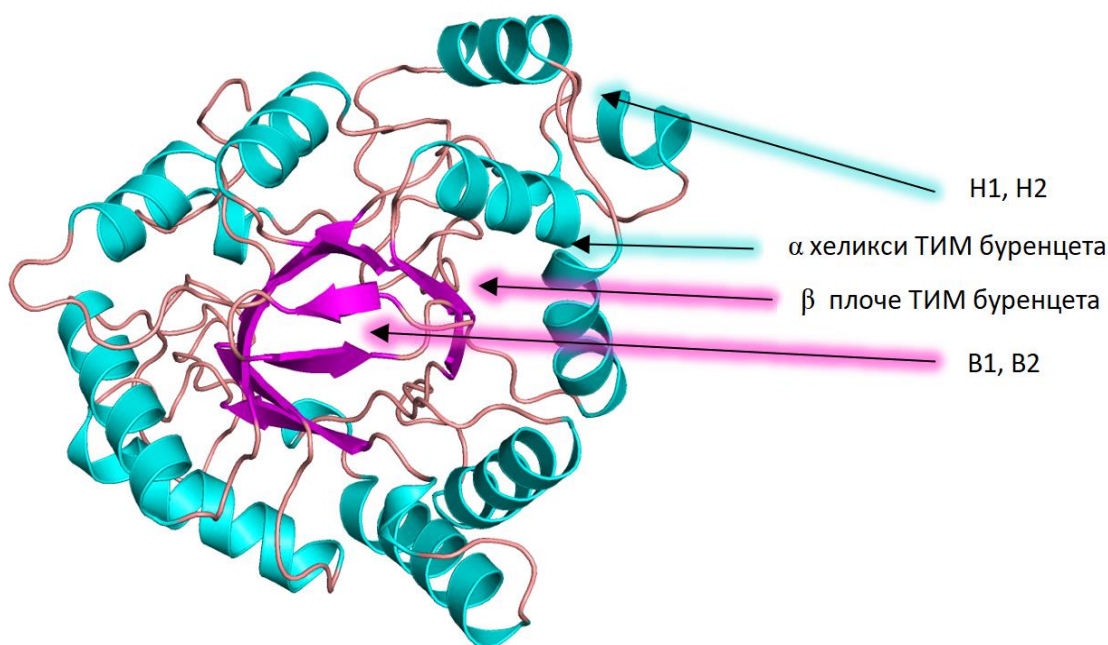
Велики проблем при употреби доксорубина, као и многих других цитостатика, представља отпорност на лек коју ћелије канцера врло брзо развијају, а која је узрокована повећаном експресијом АКР1Ц ензима у малигнућ ћелијама. Утврђено је да се инхибицијом 3α ХСД-3 неким од инхибитора широког спектра (нестероидни противупални лекови, нпр. ибупрофен) осетљивост малигнућ ћелија на доксорубин врло брзо враћа. Специфични инхибитори 3α ХСД-3 могли би се користити као допунска терапија у третману канцера, а та специфичност допринела би лакшем постизању жељеног ефекта и минимизовању споредних ефеката (*Huang u cap. 2012*).

2.4.1. Структурне карактеристике 3 α ХСД-3

Аминокиселинска секвенца хумане 3 α -ХСД-3 дата је у ФАСТА формату (енгл. fast alignment – FASTA) (Altschul *u cap.* 1990, Donkor *u cap.* 2014):

```
>NP_995317.1 aldo-keto reductase family 1 member C2 isoform 1  
[Homo sapiens] MDSKYQCVKLNDSGHFMPVLGFGTYAPAEVPKSKALEAVKLAIEAG  
FHHIDSAHVYNNEEQVGLAIRSKIADGSVKREDIFYTSKLWSNSHRPELVLPALERSLKNLQ  
LDYVDLYLIHFVSVKPGEEVIPKDENGKILFDTVDLCATWEAMEKCKDAGLAKSIGVSNFN  
HRLLEMILNKPGLKYKPVSNQVECHPYFNQRKLLDFCKSKDIVLVAYSALGSHREEPWVDPN  
SPVLLEDPVLCALAKKHKRTPALIALRYQLQRGVVVLAKSYNEQRIRQNVQVFEFQLTSEEM  
KAIDGLNRNVRYLTLDIFAGPPNYPFSDY
```

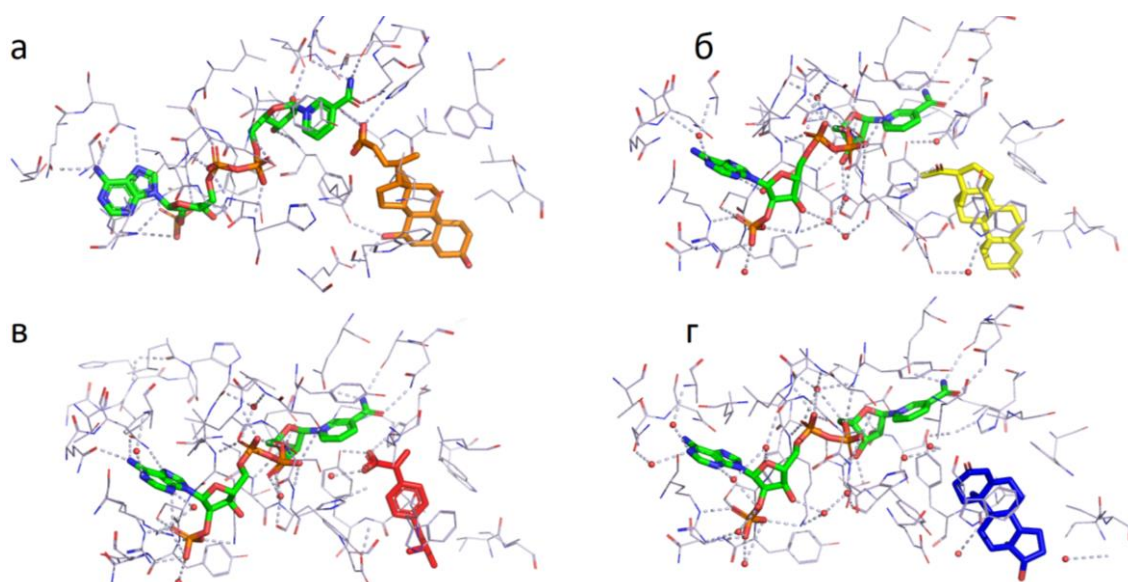
Ензим 3 α ХСД-3, као и остали чланови суперфамилије АКР, поседује карактеристичан мотив (α/β)₈ буренцета (триозо изомеразе – ТИМ буренцета), које је изграђено од 8 антипаралелно постављених β плоча у унутрашњости, окружених са 8 α хеликса, као и три петље које делимично покривају С крај протеина. Поред ових мотива секундарне структуре, на N крају ензима налазе се две β плоче (B1, B2) које формирају N терминално дно буренцета, а на С крају ензима налазе се два терминална α хеликса (H1, H2) који затварају С терминално дно буренцета (Jin *u cap.* 2001, слика 2.8).



Слика 2.8. Мотиви секундарне структуре 3 α ХСД-3 (слика је направљена коришћењем структуре под приступним кодом у ПДБ бази 1НН1, Jin *u cap.* 2001).

Анализом структуре ПН1 (*Jin u cap. 2001*) могу се уочити детаљи везивања урсодеокихолата, једне од жучних киселина, у активно место ензима. Кофактор (NADP^+) и инхибитор (урсодеокихолат) везују се у активно место $3\alpha\text{ХСД-3}$ тако да је никотинамидни прстен кофактора окренут ка карбоксилатном анјону на С23 атому стероидног молекула. Оријентација кофактора и инхибитора је таква да је инхибитор окренут ка С крају, док кофактор вири из N краја ензима. Оваква оријентација урсодеокихолата осигурана је захваљујући тродимензионалној структури овог једињења, заснованој на *cis* конформацији А и В прстенова. Кофактор и инхибитор постављени су тако да је раван инхибитора паралелна са осом симетрије ТИМ буренцета, док је раван кофактора паралелна у односу на раван инхибитора.

Позиција лиганда и кофактора која је описана за структуру $3\alpha\text{ХСД-3}$ у комплексу са урсодеокихолатом карактеристична је и за друге објављене структуре овог ензима са различитим стероидним и нестероидним лигандима (слика 2.9). Даље, исти начин везивања лиганда може се уочити и код ензима $17\beta\text{ХСД-5}$, на пример, у комплексу са стероидним инхибитором коме је додељен назив ЕМ1404 (приступни код у ПДБ бази: 1ZQ5). Корен средњег квадратног растојања (*енгл.* root mean square deviation – RMSD) између ове две структуре је 0,8 Å, са 320 Са атома који се поклапају, док се већа одступања бележе између првих 6 N терминалних остатака, као и у структури петље лиганд везујућег места (*Jin u cap. 2001, Qiu u cap. 2007*).



Слика 2.9. Везивање различитих стероидних и нестероидних лиганда у активно место $3\alpha\text{ХСД-3}$ (линије) у односу на кофактор NADP^+ (зелени штапићи): а - урсодеокихолат (наранџасти штапићи, ПДБ приступни код: ПН1, *Jin u cap. 2001*), б - прогестерон (жути штапићи, ПДБ приступни код: 4L1W, *Zhang u cap. 2014*), в - ибупрофен (црвени штапићи, ПДБ приступни код: 4JTR, *Yosaatmadja u cap. 2006*), г - тестостерон (ПДБ приступни код: 1J96, *Nahoum u cap. 2001*).

За ензимску катализу неопходно је да се орбитале интерагујућих атома лиганда и кофактора преклапају. Ово је могуће када је угљеник кето или алдехидне групе супстрата на удаљености око 3 Å од С4 пиридинског прстена кофактора и када равни ова два атома заклапају угао од око 100°. За 3 α ХСД-3 и многе друге АКР карактеристичан је механизам индукованог уклапања при везивању кофактора и супстрата за активно место ензима, што значи да се аминокиселински остаци и лиганди у активном месту ензима позиционирају тако да се једни другима прилагођавају у циљу бољег везивања (*Couture u cap. 2005, Heredia u cap. 2003*).

При везивању тестостерона за активно место АКР1Ц долази до мање конформационе промене у петљи А. Мења се оријентација бочих остатака Val54, Val128, Ile129, Trp227, Leu306 и Leu308 да би се активно место прилагодило за прихватање тестостерона (*Nahoum u cap. 2001, Sotriffer u cap. 2004*).

Цеп за везивање лиганда 3 α ХСД-3 састоји се од 6 петљи (Н означава α хеликсе, а В β плоче): између Н1 и В1, између Н2 и В2, између Н3 и В3 као и петље А, В и С. Већина интеракција које се остварују између лиганда и протеина су хидрофобне природе, и оне се остварују између хидрофобног језгра стероида и остатака Tyr24, Val54, Tyr55, Trp86, His117, Val128, Ile129, Trp227 и Lys308 активног места ензима. Поред хидрофобних интеракција, инхибитор у активном месту одржавају и водоничне везе са поларним групама на С23 и С7 атомима стероида. Хидроксилна група на С3 атому стероида формира водоничну везу са кисеоником бочног остатка Tyr24. На С17 атому налази се бочни низ на чијем крају карбоксилатни анјон формира водоничне везе са ОН групом Tyr55 и NH групом His117 каталитичке тетраде (*Couture u cap. 2005, Jin u cap. 2001*).

Коензим се везује у активно место на начин који је очуван у суперфамилији АКР. Никотинамидни прстен кофактора одржава се у центру активног места молекуларним слагањем (*енгл. stacking* интеракције) са Tyr216, као и водоничним везама са остацима Ser166 и Asn167. Пирофосфатни мост кофактора држи се водоничним везама и јонским мостовима за остатке Ser217, Lys219, Ser221 и Lys270. Кофактор NADPH има јачи афинитет везивања за ензим у односу на NADH захваљујући водоничним везама и јонским мостовима које 2' фосфат аденозина формира са Lys270, Ser271, Tyr272 и Arg276. Аденински прстен и хидроксилне групе рибозе остварују водоничне везе са Gln279 и Asn280 (*Jin u cap. 2001*).

Током покушаја кристализације апопротеинске форме 3 α ХСД-3 (*Couture u cap. 2005*) у активно место ензима ушао је цитрат, који је био једна од компоненти раствора за кристализацију. Цитрат је био окружен аминокиселинским остацима који иначе формирају хидрофобне интеракције са супстратом: Tyr24, Ala25, Val54, Tyr55, Trp86, His117, Ile129, Asn167, Tyr216, His222, Glu224, Trp227, Leu306, Leu308, Ile310 и Phe311. У случају комплекса 3 α ХСД-3 са кофактором и цитратом, наведени остаци су се оријентисали тако да формирају узак цеп за везивање лиганда. У делу активног места у ком се при везивању стероида везује кето група супстрата сместио се карбоксилатни анион ацетата и формирао водоничне везе са ОН групом из Tyr55 и НН из прстена His117. Притом је угљеник ацетата био удаљен 3,3 Å од С4 никотинамидне јединице кофактора. Мутацијом Arg301 и Arg304 смањује се могућност ензима да катализује редукцију андрогена, што је праћено повећањем Михаелис-Ментенове константе (Km).

2.5. Функције 3 α ХСД-3 у метаболизму

Андрогени хормони се синтетишу у стероидогеним ћелијама тестиса, оваријума и коре надбубрежне жлезде. Секреција андрогена омогућава развој и одржавање нормалне функције мушких репродуктивних ткива, па и испољавање примарних и секундарних сексуалних карактеристика мужјака. Нарушена хомеостаза андрогена води ка стањима као што су синдром андрогене неосетљивости и хипогонадизам у случају смањења, или хиперплазије ткива простате и канцера простате у случају повећања биосинтезе ове класе стероида. Ензими АКР су укључени у биосинтезу андрогена, а 3 α ХСД-3 преводи потентне андрогене хормоне у мање потентне метаболите: 5 α -дихидротестостерон се у активном месту овог ензима редукује до слабог андрогена 5 α -андростен-3 α -17 β -диола. Одлика 5 α -андростен-3 α -17 β -диола је да се везује за естрогени рецептор β и активира сигналне путеве који полазе од естрогеног рецептора β , који могу имати анти-онкогено дејство (*Flück u cap. 2011, Rižner i Penning, 2014*).

У тзв. женске полне хормоне спадају естрогени хормони (естрон, естрадиол, естриол, именовани по броју хидроксилних група у основном стероидном молекулу) и прогестерон. Синтетишу се у оваријумима, тестисима и кортексу надбубрега. Прекурсори у синтези естрогена су андрогени, који су супстрат за ензим ароматазу. Ароматаза врши конверзију алифатичног А прстена са кето групом у ароматични А прстен са хидроксилном групом (*Simpson u cap. 2002*). Естрогени су одговорни за одржавање примарних и секундарних сексуалних карактеристика код женки, у које спада

и одржавање трудноће и нормалног еструсног/менструалног циклуса женки/жена. Ензим 3α ХСД-3 катализује редукцију најпотентнијег природног естрогена, естрадиола до естрона. Прогестерон се редукује до мање потентног 5α -дихидропрогестерона дејством других АКР1Ц, а 5α -дихидропрогестерон се дејством 3α ХСД-3 редукује до алопрегненолона, модулятора рецептора за ГАБА и НМДА (*Nelson u Bulun. 2001, Trauger u cap. 2002*).

Када говоримо о стероидним хормонима, битно је рећи да сви настају од холестерола као прекурсора, као и да су андрогени у одређеној мери потребни здравом женском организму, као што су и естрогени и прогестини секретовани у одређеној мери код мужјака/мушкараца. Сигнални путеви који воде од њихових рецептора се некада укрштају па долази до унакрсне активације или активације одређеног рецептора алтернативним сигналним путем од другог стероидног рецептора (*Miller u cap. 2011*).

Простагландини су сигнални молекули који се синтетишу од арахидонске киселине и делују као аутокрини и паракрини регулатори многих процеса у организму, у првом реду запаљенских процеса и контракције глатке мускулатуре. Ензим 3α ХСД-3 редукује простагландин ПГХ2 у ПГФ2 и ПГД2 у 11β ПГФ2 α . Простагландин Х2 се секретује у јетри, бубрезима и слезини одакле одлази у циркулацију, где је задужен за контракцију глатке мускулатуре крвних судова и дисајних путева (*Ricciotti u Fitzgerald 2011*).

Појам ксенобиотици обухвата једињења која доспевају у организам, а нису природно присутна у њему. У ксенобиотике спадају лекови и токсини, као и разне друге супстанце пореклом из околине. Ензим 3α ХСД-3 може да прими у своје флексибилно активно место различите ксенобиотике, чијом редукцијом се може смањити или појачати њихова биолошка активност. У дувану је присутан 4-метилнитрозамино-1-(3-пиридил)-1-бутанон, који је јак канцероген и који се редукује у јетри дејством АКР1Ц и АКР1Б ензима, међу којима је и 3α ХСД-3 (*Atalla u cap. 2000*). Различити лекови могу се инактивирати редукцијом, што је детаљније објашњено на примеру неколико хемиотерапеуских лекова у тексту који следи, док се неки лекови могу унети у организам у неактивној, прекурсорској форми (*енгл. prodrug*) и постати активни тек након модификације одређеним ензимом у одређеном ткиву (*Denny 2001*).

2.6. Улога ЗаХСД-3 у настанку и развоју патолошких стања

2.6.1. Канцер

Канцер или рак спада у групу најчешћих болести модерног доба. Процењује се да ће једна од три особе током свог живота оболети од неког облика рака. Канцерогенеза је појам који представља процес трансформације здраве ћелије у малигну. Овај процес је вишестепен, подразумева промене на више ћелијских сигналних путева, и под утицајем је многобројних фактора из унутрашње и спољашње средине организма. Данас је превазиђено мишљење да је канцер једна болест, већ се овај назив односи на групу поремећаја, које карактерише нерегулисана пролиферација ћелија и њихова инвазија и миграција на друга места у организму. Око 85% типова канцера потиче од измењених ћелија епидермалних ткива и они се називају карциномима. Канцери пореклом од мезодерма називају се саркомима. Сваки тип канцера има своје карактеристике, факторе који у мањој или већој мери доприносе његовом настанку, сигналне путеве укључене у овај процес и најчешће обрасце метастазирања у друга ткива (*Pecorino 2012*).

Карактеристика малигнух тумора, по којој се разликују од бенигнух је инвазивност и ширење на друга ткива. Бенигни тумори немају способност инвазије и не доводе до настанка канцера. Ови тумори су углавном опасни само уколико се нађу на локацији где ометају битне функције организма (нпр. мозак, срце; *Pecorino 2012*).

Hanahan и Weinberg су 2000. године дефинисали шест обележја већине, ако не и свих типова канцера (слика 2.10). Преживљавање и пролиферацију ћелија канцера омогућавају аутономна производња пролиферативних сигнала са једне стране, и избегавање анти-пролиферативних сигнала у комбинацији са избегавањем апоптозе и имунског одговора са друге стране. Ћелије канцера имају неограничен репродуктивни потенцијал, а енергетски метаболизам ткива у коме се налазе се преусмерава у корист њиховог раста, преживљавања и репродукције. Овим особинама у новије време додате су још две: геномска нестабилност и упални процеси које доприносе развоју неопластичног ткива. Ове две особине су неопходне за развој шест претходно дефинисаних карактеристика већине малигнух промена (*Weinberg и Hanahan 2011*).

Малигни тумори расту и метастазирају захваљујући брзој пролиферацији ћелија. Већина канцерогених агенаса су заправо мутагени који свој ефекат испољавају индукујући мутације у молекулу ДНК. У туморским ћелијама нагомилавају се бројне мутације,

од једноставних тачкастих мутација, до великих прекида у молекулу ДНК, као и хромозомских транслокација и дупликација.



Слика 2.10. Особине канцера (модификовано из Pecorino 2012 по Hannahan и Weinberg 2000 и 2011). Илустрације су преузете са сајта <https://openclipart.org/> и имају Creative Commons лиценцу.

Мутације се накопљају и током времена доводе до настанка тумора, што објашњава зашто се тумори чешће јављају међу старијом популацијом, као и зашто се њихова инциденца повећава кроз историју, као што се продужава и просечан животни век људи. За један мали број тумора, међутим, довољна је једна мутација да доведе до њиховог настанка. Процењено је да 5-10% мутација хуманог генома доводи до оваквих облика канцера. Данас се канцер сматра генском болешћу на ћелијском нивоу. Онкогене мутације су наследне уколико захвате герминативне ћелије. Обично оне не изазивају рак одмах, али представљају фактор ризика за његов настанак (Vargo-Gogola и Rosen 2007).

Број ћелија одређен је стопом ћелијског раста односно пролиферације, стопом програмиране ћелијске смрти односно апоптозе, и у изузетним случајевима, стопом некрозе и стопом диференцијације. Током диференцијације ћелије могу ући у G0 фазу мировања, при чему даље неће доприносити укупном броју ћелија. Диференцијација је битна за развој неких облика канцера као што је леукемија, где незрели прекурсори леукоцита масовно улазе у циркулацију (Pecorino 2012).

У области канцерогенезе дефинисано је неколико појмова који се односе на гене чија се функција доводи у везу са настанком канцера. Онкоген је онај ген чији се протеински производ услед мутације производи у већој количини и/или измењеном облику, у ком стимулише развој тумора. Тумор супресори су они гени чији протеински производи учествују у процесима као што је регулација ћелијског циклуса и поправљање оштећења молекула ДНК, и на тај начин штите ћелију од неопластичне трансформације. Мутације којим тумор супресори губе или смањују активност доприносе настанку рака. Тумор супресорске мутације које доводе до настанка рака су углавном рецесивне, док онкогени најчешће имају доминантан ефекат (*Hanahan u Weinberg 2011*).

Све туморске ћелије једног канцера потичу од једне мајке ћелије, односно имају клонално порекло. Недавно је доказано присуство тзв. матичних ћелија тумора. Неки тумори могу настати од адултних матичних ћелија, при чему неки од клонова губе особине матичних ћелија, док их други задржавају, обезбеђујући туморском ткиву популацију матичних ћелија са самообнављајућим потенцијалом (*Pecorino 2012*).

2.6.2. Улога 3 α ХСД-3 у настанку и развоју канцера дојке

Поред меланома, најчешћи тип канцера код жена је канцер дојке. Ова болест је сложена и њен настанак и развој карактерише велики број ендогених и егзогених фактора који делују преко сложене мреже сигналних путева у ћелији. Као и за већину других типова канцера, ни код канцера дојке се не говори о једној болести, него о различитим типовима канцера дојке, чији је развој заснован у мањој или већој мери на одређеним сигналним путевима у ћелији. Сигнални путеви који полазе од рецептора за естрогене хормоне и прогестерон играју кључну улогу код већине типова канцера дојке, са изузетком троструко негативног канцера дојке (*енгл. triple negative breast cancer – TNBC*) за који је карактеристично одсуство естрогених рецептора, прогестеронског рецептора и рецептора за хумани епидермални фактор раста 2 (*енгл. human epidermal growth factor 2 receptor – HER2, Judes u cap. 2016, Sun u cap. 2017*).

Естрогени хормони се сматрају фактором ризика за настанак канцера дојке, док прогестерон може имати про- или анти- онкогено дејство, у зависности од контекста других сигналних путева у ћелији. Сматра се да редуковани 5 α - метаболити прогестерона, који настају у ткивима која експримирају 5 α -редуктазу, имају пролиферативни, миграторни и стимулишући ефекат на ћелије канцера, док су нивои

3 α -хидроксипрогестерона и 20 α -дихидропрогестерона виши у здравом ткиву у односу на малигно и испољавају антиканцерогене ефекте (*Hudis u Gianni 2011, Sun u cap. 2017*).

Ензим 3 α ХСД-3 има улогу у редукцији естрадиола, најјачег природног естрогена до слабијег естрона, као и у инактивацији прогестерона до неактивног метаболита 5 α -дихидропрогестерона. У узорцима ткива и на ћелијским културама примећено је да код неких типова канцера дојке долази до смањења експресије и активности 3 α ХСД-3 заједно са 20 α ХСД (АКР1Ц1), насупрот 17 β ХСД-5, чија експресија може бити непромењена или стимулирана. Повећана експресија 3 α ХСД-3 код мишева успорила је развој канцера дојке у присуству прогестерона, путем инактивације прогестерона до мање активних метаболита. Ензим 3 α ХСД-3 има улогу у инактивацији циркулишућих естрогена и прогестерона и њиховој конверзији у мање потентне облике, док 17 β ХСД-5 има супротан ефекат и фаворизовањем продукције естрадиола може активирати сигналне путеве који подстичу канцерогенезу (*Ji u cap. 2003, Lewis u cap. 2004*).

Поменуто је да ћелије троструко негативног канцера дојке не експримирају ни естрогени ни прогестеронски рецептор, као ни HER2 рецептор за хумани епидермални фактор раста. Ипак, доказана је улога андрогених хормона у настанку и развоју овог канцера. Улога андрогена код троструко негативног канцера дојке може бити стимулативна или супресивна, што углавном зависи од структуре андрогеног хормона. Уколико је реч о тестостерону, он може да се ароматизацијом А прстена преведе у естрадиол, па да покрене естрогени про-онкогени сигналинг, док се за 5 α -дихидротестостерон сматра да преко других сигналних путева може да супресује пролиферативну активност ћелија. Ови наводи нису сасвим расветљени, а још мање је доказана улога 3 α ХСД-3 у описаним процесима, тако да у будућности можемо очекивати разјашњавање овог проблема. Познато је да се сигнални путеви посредовани једарним рецепторима могу преплитати, па је тако могуће да се деси да естрогени сигналинг утиче на андрогени, или да се глукортикостероидни сигналинг умеша у прогестеронски, и обрнуто (*Hudis u Gianni 2011, Ordóñez-Morán u Muñoz 2009*).

2.6.3. Улога 3 α ХСД-3 у настанку и развоју канцера простате

Рак простате је тренутно други водећи узрок смрти код мушкараца. Ова болест, пореклом од епителијалних ћелија, сложене је етиологије и зависи од бројних ендогених и екзогених фактора који доприносе њеном развоју. Повећан ниво циркулишућих андрогена, у првом реду 5 α -дихидротестостерона, сматра се једним од главних фактора

који доприносе настанку и развоју хиперплазије и канцера ткива простате. Ови хормони свој ефекат остварују везујући се за андрогени рецептор који активира мрежу сигналних путева који стимулишу пролиферативну активност ћелија (*Rawla 2019*).

У ћелијама канцера простате показана је смањена транскрипција гена за 3 α ХСД-3, на супрот повећаној транскрипцији гена за 17 β ХСД-5. Такође, показана је директна корелација у концентрацији 5 α -дихидротестостерона и експресији 3 α ХСД-3, па је могуће да се 3 α ХСД-3 у простати експримира као регулаторни механизам којим се спречава превелик ефекат циркулишућих андрогена. Код канцера простате експресија 3 α ХСД-3 се смањује, и изостаје одговор на појачану синтезу 5 α -дихидротестостерона. Ензим 3 α ХСД-3 учествује у деактивацији тестостерона и 5 α -дихидротестостерона, 17 β ХСД-5, с друге стране, подстиче пролиферативну активност ћелија, тако што фаворизује синтезу потентнијих андрогена (*Adenji u cap. 2013, Ji u cap. 2003*).

Запажено је да се стопа оболевања и смртности од рака код мушкараца пореклом са Азијског континента повећава када емигрирају у Сједињене Америчке Државе. Поред повећаног уноса масти и смањене количине влакана у исхрани, значајна разлика између северноамеричке и азијске кухиње огледа се у присуству односно одсуству одређених традиционалних зачина. Многи од ових зачина имају антиоксидативна својства и могу донекле штитити од настанка канцера. Једно од оваквих једињења је куркумин, који је у последње време у фокусу многих истраживања. Претходно је показано на ћелијским културама канцера да куркумин промовише апоптозу, а у клиничким истраживањима показано је да третман куркумином доводи до снижавања нивоа антигена специфичног за простату (*енгл. prostate specific antigen – PSA*), који је један од маркера хиперплазије простате. Експресија транскрипта за 3 α ХСД-3 индукована је куркумином, док овај ефекат није запажен за 17 β ХСД-5 (*Ide u cap. 2018*).

2.6.4. Улога 3 α ХСД-3 у настанку ендометриозе

Експресија транскрипта за 3 α ХСД-3 повећана је у ткиву ендометриозе јајника у поређењу са здравим ткивом ендометријума материце. Претпоставља се да се развој ендометриозе заснива на деловању 3 α ХСД-3, који инактивира прогестерон чија је улога да „смирује” ткиво ендометријума и балансира пролиферативни ефекат естрогених хормона (*Rižner u Penning 2014*).

2.6.5. Улога 3 α ХСД-3 у развоју отпорности на хемиотерапију

Канцер плућа је један од водећих узрока смрти у свету и чини 20% од укупних смртних случајева од канцера. Чак и у случајевима када се рано открије, прогноза за овај тип рака је лоша. Један од главних разлога за лошу прогнозу је то што ћелије ове врсте канцера брзо стичу отпорност на хемиотерапеутике и радиотерапију, па нема начина да се њихов раст заустави или ограничи. За ову отпорност у великој мери су одговорни АКР1Ц ензими, међу њима и 3 α ХСД-3 (*Bade u Cruz 2020, Pan u cap. 2005*).

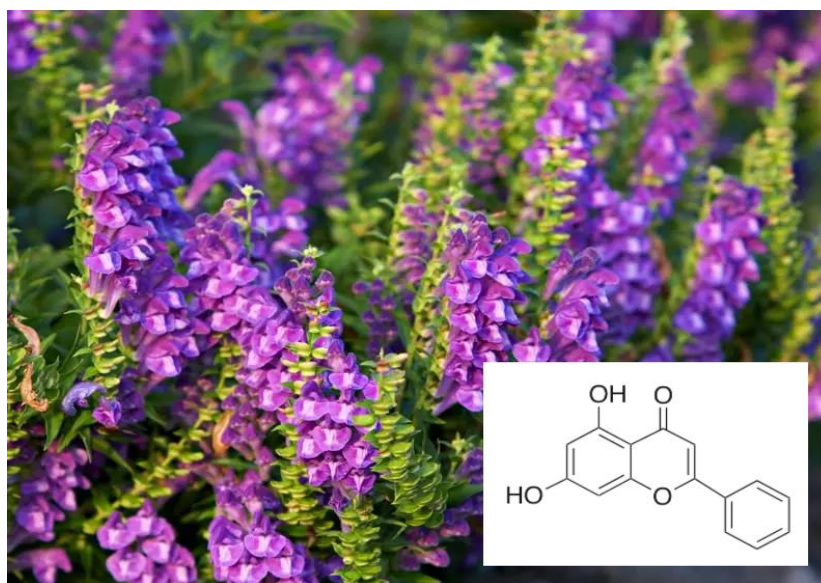
У терапији рака плућа најчешћи избор су хемиотерапеутици широког спектра међу којима се налази доксорубицин. Овај лек спречава репликацију ДНК молекула тако што инхибира топоизомеразу 2 и на тај начин спречава нормално одвијање репликације ДНК, јер долази до нагомилавања њених суперспирализованих делова (*Frederick u cap. 1990*).

Код канцера плућа, повећан број транскрипата за 3 α ХСД-3, као и за остале АКР1Ц се сматра за лош прогностички фактор. Експресија АКР1Ц ензима се доводи у везу са поспешивањем и одржавањем запаљенских процеса који су део канцерогенезе, али и хроничних запаљенских болести (*Kuang u cap. 2006*). Показано је да у ћелијама канцера плућа проинфламаторни интерлеукини, као што је ИЛ6, стимулишу експресију 3 α ХСД-3. С друге стране, 3 α ХСД-3 може у своје активно место да прими различита једињења, међу којима су и различити хемиотерапеутици као што су доксорубицин, винкрестин и цисплатин (*Penning u cap. 2021*). Редукција доксорубицина АКР1Ц ензимима доводи до његове инактивације и настанка отпорности ћелија канцера на терапију (*Veitch u cap. 2009*). С друге стране, у ћелијама рака бешике показано је да је стопа отпорности на цисплатин директно пропорционална нивоу експресије 3 α ХСД-3, вероватно јер 3 α ХСД-3 смањује ниво реактивних кисеоничних врста које настају у ћелији услед терапије цисплатином (*Shirato u cap. 2014*). У оба наведена случаја у ћелијама канцера смањује се експресија фактора за индукцију апоптозе (*енгл. apoptosis inducing factor – AIF*). Ефекте ИЛ6 могуће је донекле зауставити инхибиторима протеин киназе Ц, која је један од ефекторних молекула ИЛ6 (*Wakabayashi u Yasui 2000, Penning u cap. 2021*).

Повећана експресија ензима из потфамилије АКР1Ц регистрована је и код рака дебелог црева, јетре, плућа и једњака, и код свих се сматра лошим прогностичким фактором. Поред канцера, ови ензими су високо експримирани и код јаких упала једњака. Имајући у виду појачану експресију АКР1Ц у ткивима канцера, као и корелацију са експресијом проинфламаторних цитокина као што су циклооксигеназа 2 (COX-2) и ИЛ6, дошло се до

закључка да би АКР1Ц ензими могли бити веза између хроничног запаљења као стања које претходи канцеру, и самог канцера (*Kuang u cap. 2006, Wakabayashi u Yasui 2000, Woo u cap. 2005*).

Биљка кинеска капица (*Scutellaria baicalensis*, слика 2.11) се у Азијској народној медицини користи у лечењу алергијских и упалних стања. Садржи неколико једињења која спречавају стимулацију експресије 3 α ХСД-3 посредовану интерлеукином 6, као и активност самог ензима 3 α ХСД-3. У ову групу једињења спадају баикалин, баикалеин, вогонин, вогонозид, апигенин, хризин и skutелареин (*Wang u cap. 2007*).



Слика 2.11. *Scutellaria baicalensis* и један од њених активних метаболита, хризин (5,7-дихидроксифлавоон) (извор: <https://www.eistria.com/>).

Проинфламаторни цитокин ИЛ6 везује се за свој рецептор преко кога активира сигналне путеве преко ЈАК (Јанус киназе), МАРК (митогеном активирани протеин киназе), PI3K (фосфатидил-инозитол-3 киназе) и протеин киназе Ц (РКС). Флавоонска једињења, међу којима су и флавоноиди *Scutellaria baicalensis*, инхибирају бројне протеинске киназе, па се на тај начин могу објаснити њихови антиупални ефекти, укључујући и спречавање експресије 3 α ХСД-3 стимулисане сигналним путевима који полазе од рецептора за ИЛ6 (*Wakabayashi u Yasui 2000, Woo u cap. 2005*).

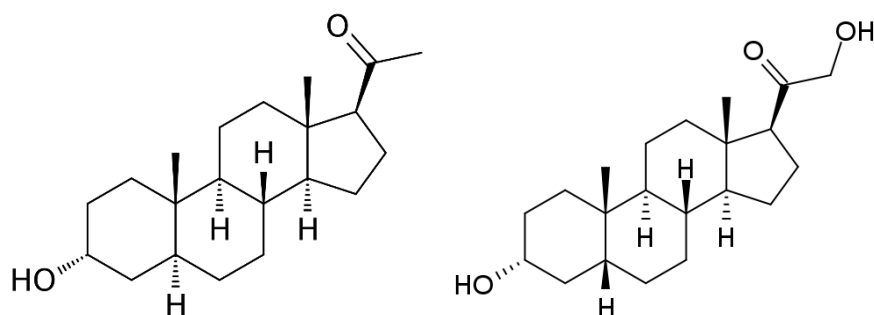
Гени за АКР1Ц протеине садрже секвенцу елемента који одговара на антиоксиданте (*енгл. antioxidant response element – ARE*). Овај елемент се активира везивањем транскрипционих фактора као што је Nrf2 (*енгл. nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). Транскрипциони фактор Nrf2 је једна од мета протеин киназе Ц, која га ослобађа комплекса са инхибитором, те му омогућава транслокацију у једру где постаје активан.

Регулаторни елементи ARE су карактеристични за гене чији протеински производи учествују у деградацији ксенобиотика. Инхибицијом протеин киназе Ц поништава се ефекат IL6 на појачавање експресије 3 α ХСД-3 (Wang *u cap.* 2007).

2.6.6. Улога 3 α ХСД-3 у поремећајима синтезе неуростероида

Алопрегненолон (слика 2.12) је неуростероид који је неопходан за регулацију функције рецептора за ГАБА и НМДА. Потенцијацијом ових рецептора постиже се анксиолитички и антиконвулзивни ефекат на централни нервни систем. Смањена концентрација алопрегненолона уочена је у различитим поремећајима расположења, посебно током предменструалног периода, али и код стања као што је посттрауматски стресни поремећај (Agís-Balboa *u cap.* 2006, Pinna 2020, Reddy *u Rogawski* 2002).

Синтеза алопрегненолона од прогестерона одвија се у два корака: прво се прогестерон редукује до 5 α -дихидропрогестерона дејством ензима 5 α -редуктазе, а затим се 5 α -дихидропрогестерон редукује до алопрегненолона (5 α -прегнан-3 α -ол-20-он) дејством 3 α ХСД-3. Ова реакција одвија се у ткиву мозга, јајника и коре надбубрежне жлезде. Показано је да неки селективни инхибитори усвајања серотонина (*енгл.* selective serotonin reuptake inhibitors – SSRI), као што су флуоксетин и пароксетин, који се користе у терапији депресије и сродних поремећаја, могу да алостерно активирају 3 α ХСД-3. Ипак, резултати различитих истраживачких група још увек нису усаглашени па их треба узети са резервом. Потенцијални механизам активације ензима је смањење K_m ензима према 5 α -дихидропрогестерону (Griffin *u Mellon*, 1999, Pinna 2020).



Слика 2.12. Неуростероиди алопрегненолон (лево) и тетрахидродеоксикортикостерон (десно).

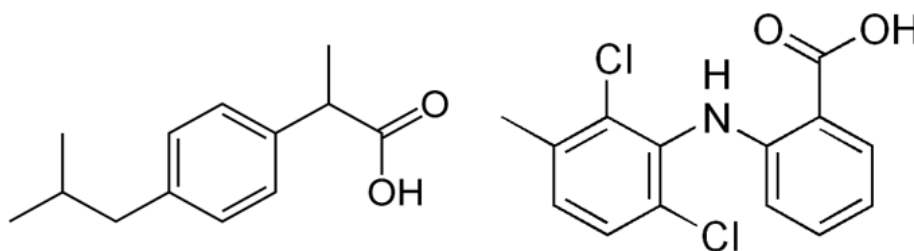
Поред алопрегненолона, 3 α ХСД-3 учествује и у синтези других неуростероида, као што је тетрахидродеоксикортикостерон (слика 2.12). Ово једињење се синтетише од деоксикортикостерона као прекурсора, истим низом реакција као при синтези алопрегненолона. Тетрахидродеоксикортикостерон је позитивни алостерни модулатор

ГАБА α рецептора и има седативна, анксиолитичка и антиконвулзивна својства, па се његов недостатак доводи у везу са стањима анксиозности, депресије и епилепсије. Ефекат недостатка алопрегненолона и тетрахидродеоксикортикостерона посебно је уочљив током предменструалног периода и трудноће, када се дешавају природне варијације концентрације овог неуростероида (*Crawley u cap. 1986, Trauger u cap. 2002*).

2.7. Инхибиција 3 α ХСД-3

2.7.1. Нестероидни противупални лекови као инхибитори АКР

Нестероидни противупални лекови (*енгл.* non steroidal anti-inflammatory drugs – NSAID, слика 2.13) су хетерогена група једињења дизајнирана да сузбије стања грознице, повишене температуре, упале и бола. Примарни механизам деловања нестероидних противупалних лекова подразумева инхибицију ензима циклооксигеназе 2 (COX-2), која учествује у синтези простагландина, главних медијатора запаљенских процеса (*Desmond u cap. 2003, Díaz-González u Sánchez-Madrid 2015*).



Слика 2.13. Структуре ибупрофена (лево) и диклофенака (десно) као представника нестероидних противупалних лекова.

У последње време је показано да COX-2 није једина мета нестероидних противупалних лекова у организму. Наиме, примећена је антитуморска активност ових лекова, до тада коришћених за третирање бенигну стања попут упала и повишене температуре. Један од механизма деловања нестероидних противупалних лекова као антитуморских агенаса је супресија запаљенских процеса, с обзиром на то да су упални процеси једна од основних појава током канцерогенезе (*Díaz-González u Sánchez-Madrid 2015*). Наиме, ова једињења могу сузбити функцију Л-селектина у неутрофилима и на тај начин ометати процес адхезије ћелија који је саставни део запаљенског процеса. Други начин на који нестероидни противупални лекови могу остваривати своје антитуморско дејство је инхибиција АКР ензима, укључујући и 3 α ХСД-3. Ензими АКР су широко експримирани у различитим ткивима организма, где поједини чланови делују супресивно на диференцијацију и стимулативно на пролиферацију ћелија. Нестероидни противупални

лекови делују као инхибитори АКР уз врло мало нежељених ефеката. Ова једињења се могу везивати у оксианјонску рупу активног места АКР, или алостерно, ван активног места. До данас су објављене структуре ензима 3 α ХСД-3 у комплексу са различитим нестероидним антиреуматицима у активном месту: ибупрофен, флурбипрофен, напроксен, индометацин, деривати индол-сирћетне киселине, диклофенак и други (*Lovering u cap. 2004, Yosaatmadja u cap. 2006*).

2.7.2. Жучне киселине као инхибитори 3 α ХСД-3

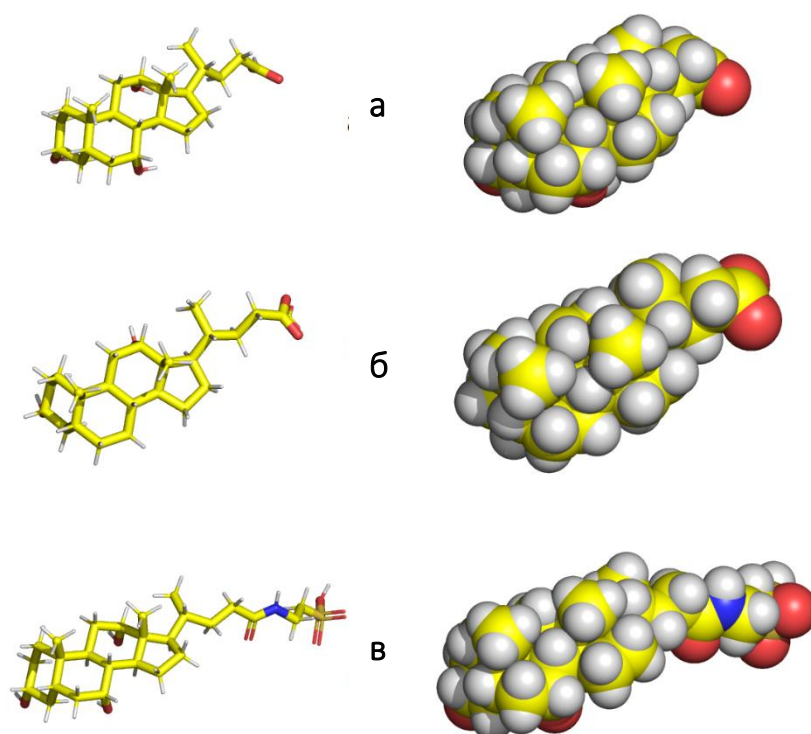
Жучне киселине представљају групу амфифилних органских киселина са стероидним циклопентаноперхидрофенантренским језгром. Полазно једињење за биосинтезу жучних киселина, као и свих других стероидних једињења у организму човека је холестерол, док највећи део дневног промета холестерола у организму заузима биосинтеза жучних киселина. Жучне киселине се синтетишу у јетри кичмењака, одакле одлазе у жуч. Жучне киселине формирају амидне коњугате са таурином, глицином или сумпорном киселином, те формирају жучне соли. Жучне киселине настале у јетри синтезом од холестерола називају се примарним, док секундарне жучне киселине настају у процесима коњугације и дехидроксијације. Распоред и оријентација хидрокслиних група, као и карбоксилна функционална група у бочном ланцу стероидног језгра, чине жучне киселине специфичним и неопходним у процесима варења и апсорпције липида (*Nelson u cap. 2008*).

Већина жучних киселина се реапсорбује у танком цреву и враћа у јетру порталним системом и тако се рециклира. У људском организму најзаступљеније жучне киселине су таурохолна, гликохолна, таурохенодеоксихолна и гликохенодеоксихолна, док су у мањој мери присутне и деоксихолна и литохолна киселина (*Staels u Fonseca 2009*).

Жучне киселине синтетисане у јетри се активно транспортују кроз мембране хепатоцита и уливају у жучне каналиће, који се настављају на хепатични канал којим се жучни сок допрема до жучне кесе, а по потреби се излива у дуоденум. Значајна улога жучних киселина се испољава управо у дуоденуму где ова једињења учествују у емулговању липида током варења хране. Поред тога, жучне киселине функционишу као битни сигнални молекули (*Li u Chiang. 2014*).

У људском организму примарне жучне киселине су холна и хенодеоксихолна киселина (слика 2.14). Бактерије интестиналног система врше дехидроксијацију примарних

жучних киселина, које су у физиолошким условима јонизоване те егзистирају у облику натријумових и других соли. У секундарне жучне киселине спадају литохолна и деоксихолна киселина (слика 2.14).



Слика 2.14. Структуре неких жучних киселина: а - холна, б - деоксихолна, в - таурохолна (структуре су преузете са ПДБ базе, *Berman u cap. 2014*).

Регулаторна функција жучних киселина огледа се у процесима регулације метаболизма липида, глукозе, ксенобиотика, као и у модулацији имунског одговора. Оне могу да се везују за фарнезоидни рецептор (FXR), X прегнански рецептор (PXR), рецептор за витамин Д (VDR), као и неке рецепторе везане са Г-протеином (*енгл. G-protein coupled receptor – GPCR*). Модулација синтезе жучних киселина показала се као могућа терапија метаболичких поремећаја и запаљенских процеса (*Li u Chiang, 2012, Li u Chiang, 2014*).

Синтеза жучних киселина регулисана је негативном повратном спрегом коњугованих жучних киселина на биосинтезу холестерола у јетри (*Staels u Fonseca 2009*).

Ензим 3 α ХСД-3 назива се и протеином који везује жучне киселине и по томе је јединствен међу хуманим хидроксистероид дехидрогеназама и алдо-кето редуктазама. Жучне киселине на 3 α ХСД-3 делују као јаки инхибитори, а константе дисоцијације између 3 α ХСД-3 и жучних киселина су значајно веће у односу на константе дисоцијације за неке друге протеине који везују жучне киселине, као што су глутатион-

S-трансферазе и везујући протеини за масне киселине. Овај податак указује на то да би 3 α ХСД-3 могао бити укључен у транспорт жучних киселина. Такође, специфична инхибиција 3 α ХСД-3 жучним киселинама могла би се користити у терапији патолошких стања код којих је деловање овог ензима непожељно, а у истраживачком раду може бити алат у расветљавању специфичне функције 3 α ХСД-3 и разграничавању његове активности од активности других АКР са којима дели велики проценат структурне хомологије и могућих супстрата (*Jin u cap. 2001, Li u Chiang 2012*).

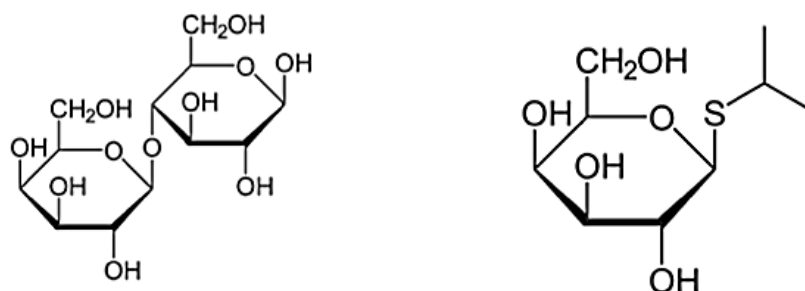
2.8. Теоријске основе техника коришћених у истраживању

2.8.1. Рекомбинантна хетерологна експресија протеина у *E. coli*

Хомологна експресија протеина је природан процес који подразумева протеинску експресију у ткивима којима је она природно својствена. За потребе истраживања и терапије најчешће није могуће пречистити довољне количине жељеног протеина на овај начин. Хетерологна рекомбинантна експресија протеина заснива се на технологији рекомбинантне ДНК, којом се ген који кодира жељени протеин клонира у вектор, а потом уноси у организам који експримира жељени протеин, иако му ова експресија није својствена у природним условима. Системи који се најчешће користе за хетерологну експресију су *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, инсекатске и сисарске ћелије. Када год је то могуће, тежи се експресији протеина коришћењем *E. coli* као домаћина. Код овог организма однос цене и ефикасности је најповољнији, поред тога геном *E. coli* је одавно секвенциран и добро проучен. Некада експресија функционалног протеина у бактеријским ћелијама није могућа, па се као домаћини користе ћелије квасца, или у сложенијим случајевима инсекатске и сисарске ћелије. То је најчешће случај када протеин захтева еукариотске посттранслационе модификације. Вектори који се користе у рекомбинантној експресији морају одговарати домаћину који треба да их прими, а уколико су у питању еукариотски системи, вектор се прво умножава коришћењем *E. coli*, а затим употребљава за хетерологну експресију (*Vaneux 1999*).

Функционисање система за хетерологну експресију објашњено је на примеру који је коришћен за потребе експеримената ове дисертације. Реч је о експресији коришћењем *E. coli* као домаћина и рЕТ28b(+) плаزمида. Плазмиди рЕТ садрже Лас оперон који функционише као регулатор експресије. Лас оперон је под контролом Лас промотора, који се у природним условима активира у присуству лактозе, а одсуству глукозе.

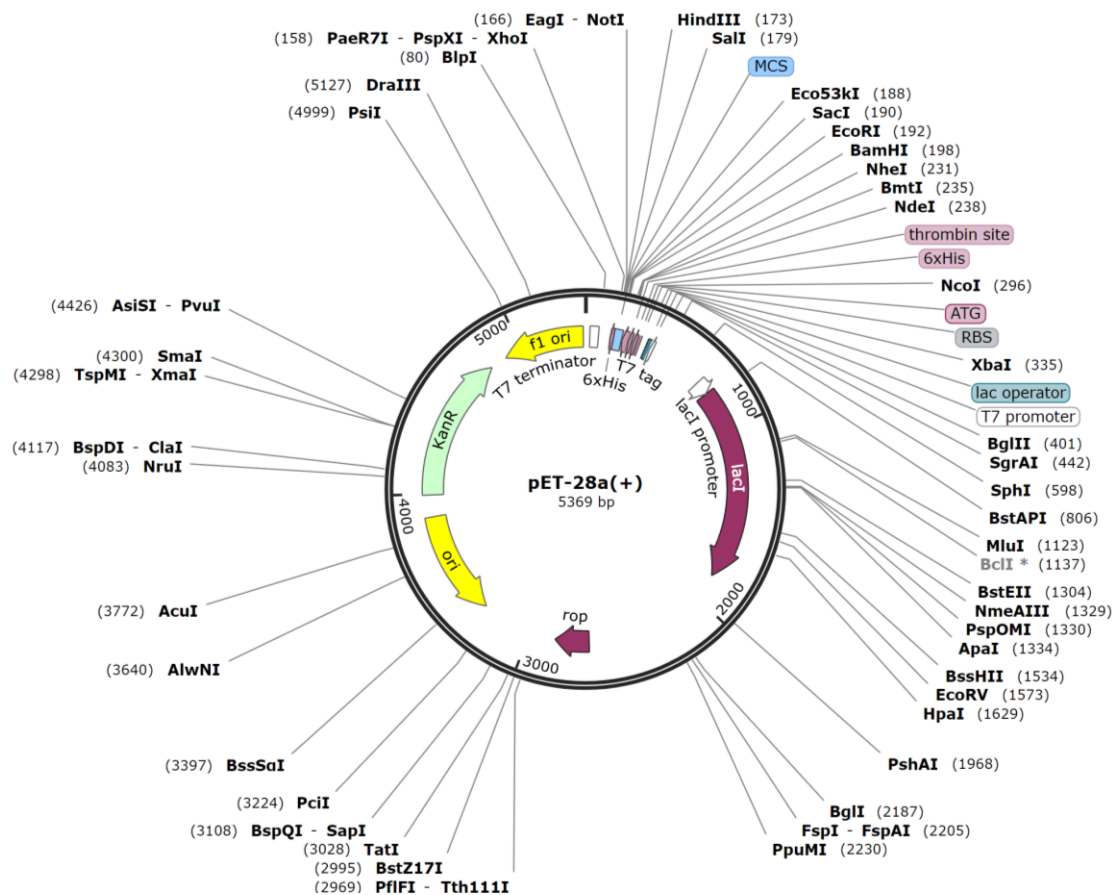
Лас оперон је у рекомбинантним системима мутиран да би функционисао и у присуству глукозе и означава се као LacUV5. Под контролом Lac промотора налазе се три гена: LacA, LacY и LacZ, чија експресија доводи до синтезе ензима који учествују у метаболизму лактозе у бактеријској ћелији: β -галактозид трансацетилаза, β -галактозид пермеаза и β -галактозидаза. Поред ових гена у вектор је додато место за клонирање (енгл. multiple cloning site – MCS), које представља низ секвенци које препознају различите рестрикционе ендонуклеазе. На овај начин је могуће клонирати секвенцу гена за жељени протеин, тако да његова експресија буде под контролом IPTG оперона. За покретање рекомбинантне експресије може се користити лактоза, али се чешће користи IPTG – изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (слика 2.15). Ово једињење је аналог галактозе и везује се за Lac промотор, активирајући експресију гена под његовом контролом, међутим бактерије га не користе као извор енергије, па му концентрација у ћелији остаје константна. У оквиру Lac оперона, поред наведених елемената налазе се и одређени обележивачи који олакшавају пречишћавање (His₆, малтозо-везујући протеин, глутатион-S-трансфераза), као и места препознавања различитих протеаза која омогућавају уклањање обележивача (*Browning u cap. 2019, Hansen u cap. 1998*).



Слика 2.15. Структуре молекула лактозе и IPTG (преузето са <http://www.measurebiology.org/>).

Вектори pET садрже и ген чији протеински производ обезбеђује отпорност на антибиотике, што омогућава селекцију успешно трансформисаних бактерија гајењем на селективном медијуму са антибиотиком. Вектор такође садржи почетно место репликације, које омогућава његову репликацију унутар бактеријске ћелије. Плазмид pET28b(+) (слика 2.16), коришћен у овој тези, поседује T7-Lac промотор, MCS, N-терминални хексахистидински обележивач (енгл. his tag), место препознавања за тромбин, C-терминални хексахистидински обележивач, ген за отпорност на канамицин и F1 место за почетак репликације (*Rosano u Ceccarelli 2014, pET System Manual*).

Компатибилност вектора и домаћина у рЕТ системима обезбеђује се системом промотора Т7 бактериофага. Ген LacUV5 налази се иза промотора који препознаје РНК полимеразу бактериофага. Ова полимеразу се експримира преко другог плаزمида или је интегрисана у бактеријски геном (λ DE3 профаг), тако да само бактерије које поседују Т7 РНК полимеразу могу да експримирају жељени протеин. Lac промотор активира транскрипцију Т7 РНК полимеразе након додатка раствора IPTG, а Т7 полимеразу активира Т7 промотор који покреће транскрипцију жељеног гена (*pET System Manual*).



Слика 2.16. Мапа рЕТ28b(+) вектора. Извор: Novagen *pET System Manual*, SnapGene software.

За потребе хетерологне експресије потребно је умножити жељени плазмид, а потом са њега експримирати жељени протеин, што се постиже употребом различитих сојева ћелија. У сваком случају, плазмид као страни тело мора ући у ћелију, што се постиже коришћењем компетентних ћелија. Компетентне ћелије су модификоване тако да постану способне да усвоје страни плазмид из спољашње средине. Хемијска компетентност постиже се третирањем ћелија калцијум-хлоридом на ниским температурама. Поред овог начина, страна ДНК може се у ћелије унети и електропорацијом, где се ћелије третирају електричном струјом да би се повећала

пропустљивост мембране, односно да би се формирале привремене поре кроз које ДНК може да уђе. У оба случаја ћелијски зид и ћелијска мембрана постају порозни и омогућава се усвајање стране ДНК (*Chan u cap. 2013*).

За потребе експеримената у овој дисертацији коришћене су бактерије *E. coli* соја DH5 α . Овај сој садржи три кључне мутације: RecA1, EndA1 и LacZM15. Прва мутација спречава активност рекомбиназе RecA, која врши хомологну рекомбинацију са усвојеном ДНК. Друга мутација погађа ген EndA1, који кодира унутарћелијску ендонуклеазу и његова деактивација спречава разградњу усвојене плазмидне ДНК. Трећа мутација је на гену за β -галактозидазу, у који се уноси место препознавања за рестрикционе ендонуклеазе, па се ова мутација користи за плаво-бели тест присуства жељеног инсерта у вектору. Наиме, ћелије трансформисане вектором који садржи инсерт остају беле боје на X-гал подлози, док ћелије трансформисане вектором без инсерта постају плаве, јер ензим разграђује хромогени супстрат X-гал (5-бромо-4-хлоро-3-индолил- β -D-галактопиранозид) који се налази у подлози, па као резултат настаје обојени продукт плаве боје. Ћелије које су трансформисане вектором са жељеним геном имају нефункционалну галактозидазу, јер један њен сегмент бива прекинут местом за препознавање рестрикционих ендонуклеаза (*Rosano u Ceccarelli 2014*).

За оптималну хетерологну експресију жељених протеина креиран је BL21 (DE3) сој *E. coli*. Овај сој садржи копију T7 РНК полимеразе, која омогућава покретање транскрипције гена под T7-LacUV5 промотером у оквиру DE3 λ профага. Овај сој има деактивирани гени за *lon* и *ompT* протеазе које би деградирале хетерологно експримирани протеин (*Rosano u Ceccarelli 2014*).

2.8.2. Праћење ензимске активности АКР мерењем потрошње NADPH

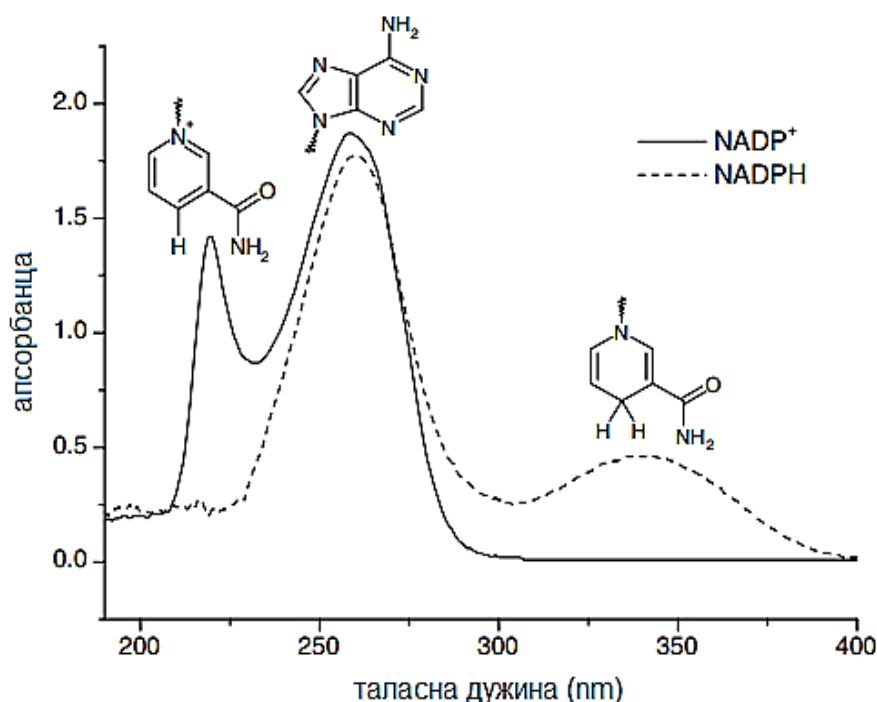
Алдо-кето редуктазе су ензими који као кофактор користе NADPH, што омогућава праћење њихове активности преко праћења потрошње кофактора. У овој тези је за одређивање активности пречишћеног активног ензима коришћен фенантренхинон (PQ), једињење које је супстрат за све АКР (*Veliça 2010*). Концентрација PQ у реакцијама, уколико није и сама предмет истраживања, треба да се одржава близу Михаелис-Ментенове константе за испитиван ензим.

Михаелис-Ментенова константа представља ону концентрацију супстрата при којој се постиже половина максималне брзине ензимске реакције и за сваки ензим се одређује експериментално:

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

где је v брзина реакције, v_{max} максимална брзина реакције, K_m Михаелис-Ментенова константа, а $[S]$ концентрација супстрата (Nelson *u cap.* 2008).

Као кофактор користи се NADPH који има карактеристичан максимум апсорпције на 340 nm (слика 2.17), по чему се редукована форма кофактора разликује од оксидоване форме, NADP⁺. Оксидована форма коензима на 340 nm не апсорбује светлост у значајнијој мери, односно не показује максимум апсорпције на тој таласној дужини. Праћењем апсорбанце на 340 nm може се одредити релативна активност ензима у различитим условима: приликом промене температуре, рН вредности раствора, концентрације супстрата или увођењем потенцијалних инхибитора у реакцију и варирањем њихових концентрација (De Ruyck *u cap.* 2007, Velića 2010).



Слика 2.17. Апсорпциони спектри NADP⁺ и NADPH (De Ruyck *u cap.* 2007).

Спектрофотометријско одређивање концентрације једињења засновано је на Ламбер-Беровом закону:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

где је A апсорбанца, ε представља моларни екстинкциони коефицијент једињења у датом растварачу, c је концентрација једињења, а l дужина пута коју светлост пређе у течности. На овај начин могуће је на основу измерене апсорбанце и познатог екстинкционог коефицијента одредити концентрацију испитиваног једињења (*Mayerhöfer u Popp 2019*). Сукцесивним мерењем апсорбанце и приказивањем њене промене током времена могуће је пратити релативну концентрацију једињења, у овом случају кофактора, па индиректно и релативну активност ензима који тај кофактор користи (*Velica 2010*).

2.8.3. Утишавање флуоресценције триптофана у активном месту ензима

Ова метода за мерење активности ензима је заснована на природној флуоресценцији протеина пореклом од ексцитације ароматичних аминокиселина, у првом реду триптофана. Поред триптофана, ароматичне аминокиселине су и фенилаланин и тирозин, али фенилаланин има низак удео у укупној флуоресценцији протеина, док се флуоресценција тирозина углавном утишава природно. Триптофан се у протеинима најчешће налази у хидрофобним џеповима, где са лигандима најчешће остварује π - π тип интеракција молекуларног слагања (*енгл. stacking*). Триптофан се може специфично ексцитовати излагањем узорка протеина светлости таласне дужине 295 nm, при чему даје емисиони спектар са максимумом емисије на 355 nm. Структурне промене у близини остатака триптофана, које настају као резултат протеин-лиганд интеракција, као и промене терцијарне структуре могу довести до промена интензитета флуоресценције или померити максимум емитоване светлости. Приликом везивања лиганда, триптофан остварује хидрофобне интеракције са лигандом, тако да долази до смањења интензитета флуоресценције или до померања емисионог максимума ка плавом делу спектра (*Yammine u cap. 2019*).

Гашење флуоресценције триптофана може се употребити за израчунавање константе равнотеже везивања лиганда (L) за протеин (P):



Константа асоцијације (K_a) дефинише се изразом:

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]}$$

где је [x] концентрација протеина, лиганда, односно протеин-лиганд комплекса.

Константа дисоцијације (K_d) представља реципрочну вредност константи асоцијације (Yammine *u cap.* 2019):

$$K_d = \frac{1}{K_a} = \frac{[P][L]}{[PL]}$$

У активном месту 3αХСД-3 налазе се два остатка триптофана, на позицијама W86 и W227, па је стога мерење утишавања природне флуоресценције триптофана погодно за испитивање везивања лиганда за овај ензим (Jin *u cap.* 2001).

2.8.4. Молекулски докинг за превиђање протеин-лиганд интеракција

Молекулски докинг је *in silico* метода за испитивање интеракција између протеина и лиганда или између два протеина. Основне предности молекулског докинга су економичност (нема употребе хемикалија нити експерименталних организама), као и брзина и могућност тестирања великог броја кандидата у исто време (*енгл.* high throughput), па се зато ова метода често користи у првим корацима дизајнирања лекова на основу структуре (*енгл.* structure-based drug design, Meng *u cap.* 2011).

Молекулски докинг полази од структуре протеина – рецептора, која је најчешће представљена кристалном структуром протеина. Уколико не постоји решена структура жељеног протеина, прибегава се коришћењу модела добијених хомологим или *ab initio* предвиђањем. Једињење – мали молекул чије се везивање за рецептор испитује, означава се као лиганд. Као резултат молекулског докинга добијају се предвиђене оријентације и конформације лиганда, на основу којих је могуће предвидети структурну основу протеин-лиганд интеракције, као и проценити афинитет рецептора према лиганду изражен кроз енергију везивања или промену слободне енергије (ΔG). Рецептор испољава највећи афинитет према лиганду који има најнижу енергију везивања у симулацији молекулског докинга (Dias *u cap.* 2008, Shoichet *u cap.* 2002).

Симулације молекулског докинга одвијају се у циклусима, на основу одређених алгоритама, где сваки циклус представља корак ближе ка стању најниже енергије везивања. У сваком циклусу излазни подаци се вреднују функцијама вредновања (*енгл.* scoring functions). С обзиром на то да постоји велики број степени слободне система, у молекулском докингу се уводе ограничења, као што су ригидност рецептора и ограничавање флексибилности лиганда (*Dias u cap. 2008*).

Резултате молекулског докинга треба узети са резервом, с обзиром на то да је реч о *in silico* приступу, који се користи у раним фазама испитивања протеин-лиганд интеракција. У сврху потврде резултата најчешће се ради контролни докинг, где се узимају координате лиганда из кристалне структуре и лиганд се подвргава коришћеним алгоритмима докинга да би се видело да ли ће заузети очекивани положај, што се квантификује кроз RMSD (*енгл.* root mean square deviation). Вредност RMSD представља корен средњег квадратног одступања сваког атома од почетног положаја и израчувана се према формули:

$$RMSD_{\alpha}(t_j) = \sqrt{\frac{\sum_{\alpha=1}^n (\vec{r}_{\alpha}(t_j) - \langle \vec{r}_{\alpha} \rangle)^2}{N_{\alpha}}}$$

где је N_{α} број атома чије се позиције пореде, n број временских корака за које се позиције пореде, $\vec{r}_{\alpha}(t_j)$ позиција атома α у моменту t_j , а $\langle \vec{r}_{\alpha} \rangle$ релативна позиција атома α у односу на коју се атом у моменту t_j пореди. Она се добија по следећој једначини [3]:

$$\langle \vec{r}_{\alpha} \rangle = \frac{1}{N_t} \sum_{j=1}^{N_t} \vec{r}_{\alpha}(t_j)$$

(*Dias u cap. 2008, Shoichet u cap. 2002*)

Имајући у виду да молекулски докинг поседује бројна ограничења (ригидност рецептора, одсуство растварача, ентропијски ефекти), за реалнију конформациону анализу и праћење понашања протеин-лиганд система током времена користи се *in silico* молекулска динамика.

2.8.5. Молекулска динамика протеин-лиганд комплекса

Молекулска динамика представља *in silico* методу за праћење еволуције система атома током времена. У симулацијама молекулске динамике најчешће се истражује понашање биополимера као што су протеини и нуклеинске киселине, као и њихови комплекси (Karplus и McCammon 2002, Philips и сар. 2005).

Сваки атом система креће се поштујући други Њутнов закон:

$$m_{\alpha} \ddot{\vec{r}}_{\alpha} = - \frac{\partial}{\partial \vec{r}_{\alpha}} U_{\text{укупно}}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_n), \alpha \in N$$

где је маса атома α m_{α} , позиција атома α \vec{r}_{α} , а U представља укупну потенцијалну енергију система. Потенцијална енергија је у симулацијама молекулске динамике представљена кроз поља силе (енгл. force field) и рачуна се математички као сума интеракција између сваког пара атома. За сваки атом у систему се претпоставља да на њега делује сила дефинисана одређеним пољем силе, која представља резултанту интеракција са другим атомима. Укупна потенцијална енергија система састоји се од следећих компоненти: енергије везе, енергије углова, енергије диедара, као и Ван дер Валсовог и Кулоновог потенцијала. Енергија везе одређује истезање, енергија углова ротацију, а енергија диедара торзију веза између два (везе, углови) или три (диедри) атома. Компоненте потенцијалне енергије система рачунају се као сума енергија свих атома система по следећим обрасцима:

$$U_{\text{веза}} = \sum_{\text{везе } i} k_i^{\text{веза}} (r_i - r_0)^2$$

где је U потенцијална енергија везе, i индекс i -те везе, k константа везе, а r_i и r_0 представљају тренутну и почетну дужину везе између два атома, и

$$U_{\text{углова}} = \sum_{\text{угла } i} k_i^{\text{угла}} (\theta_i - \theta_0)^2$$

где је U потенцијална енергија угла, i индекс i -тог угла, k константа угла, а θ и θ_0 представљају тренутни и почетни угао који заклапају три атома, и

$$U_{\text{диедара}} = \sum_{\text{диедра } i} \begin{cases} k_i^{\text{диедра}} [1 + \cos(n\varphi_i - \gamma_i)], & \text{ако } n_i \neq 0 \\ k_i^{\text{диедра}} (0_i - \gamma_i)^2, & \text{ако } n = 0 \end{cases}$$

где је U потенцијална енергија диедара, i индекс i -тог диедра, k константа диедра, φ и γ просторни углови који чине диедар, а n је природан број који означава периодичност.

Ван дер Валсов и Кулонов потенцијал односе се на атоме који нису међусобно везани:

$$U_{vdw} = \sum_i \sum_{j>i} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$

$$U_{Coulomb} = \sum_i \sum_{j>i} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}$$

где је U потенцијал Ван дер Валсових односно Кулонових интеракција, i и j су индекси два несуседна атома, q је наелектрисање дате честице, r је растојање између две дате честице, ϵ представља диелектричну константу средине а ϵ_0 диелектричну константу вакуума. Ознака σ представља Ленард-Џонсов потенцијал између два несуседна атома. Ван дер Валсове силе апроксимирају се Ленард-Џонсовим потенцијалом, а Кулонове интеракције електростатичким потенцијалом (*Nelson u cap. 1996, Philips u cap. 2005*).

За сваки атом у симулацији неопходно је обезбедити одговарајуће параметре за поље силе. Ови параметри зависе од типа атома, односно његових интеракција са суседним атомима. Параметри за сваки атом се добијају полуемпиријски, квантно механичким израчунавањима, а данас је доступан велики број рачунарских сервера, који ова рачунања изводе на нижем нивоу теорије, а који је прикладан за већину симулација. Добијени параметри за одређене типове атома проверавају се у симулацијама система малих органских молекула чије је понашање познато (*Philips u cap. 2005*).

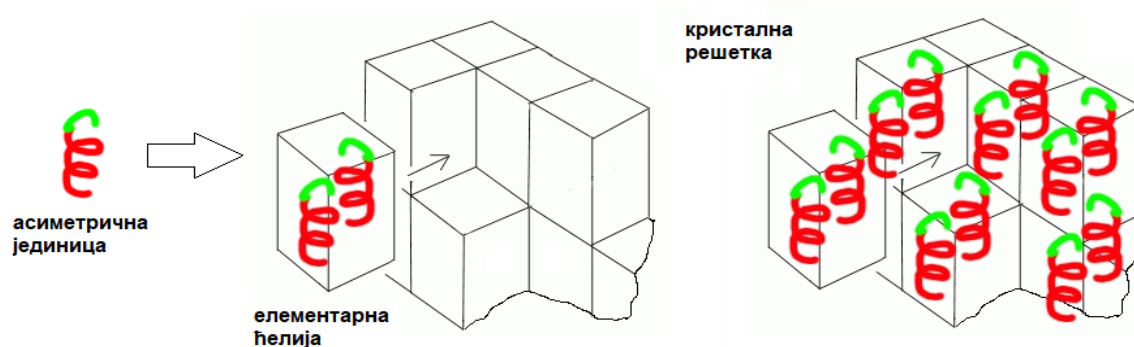
У симулацијама молекулске динамике се тежи избегавању ефеката површинског напона, па се прибегава коришћењу периодичних граничних услова, што подразумева умножавање система транслацијом, да би систем био окружен идентичним системима. Ако нека честица напусти систем, њено место се употпуњује истом честицом из суседног система. У теорији, при постављању периодичних граничних услова постоји бесконачно много оваквих идентичних система. С обзиром на то да су сви системи једнаки, довољно је њихова својства дефинисати само једном. У сваком систему који користи периодичне граничне услове дефинише се *cut off* вредност на коју се лимитира дејство Ван дер Валсових интеракција (*Philips u cap. 2005*).

Изазов симулација молекулске динамике је добити што прецизније резултате употребом разумне количине компјутерских ресурса у ограниченом времену, иако се ради о системима који се састоје од стотина хиљада атома, које је потребно посматрати кроз милионе временских корака. Ово се постиже коришћењем апроксимација које донекле смањују прецизност трајекторије, чувајући поузданост резултата. У симулацијама молекулске динамике користе се различити системи у којима се константним држе одређени параметри: за NVE то је број честица, запремина система и енергија, код NVT уместо енергије константна је температура, а код NPT система константни су број атома, притисак и температура. У истраживањима описаним у овој тези коришћен је NVT систем (*Nelson u cap. 1996, Philips u cap. 2005*).

2.8.6. Основе рендгенске кристалографије протеина

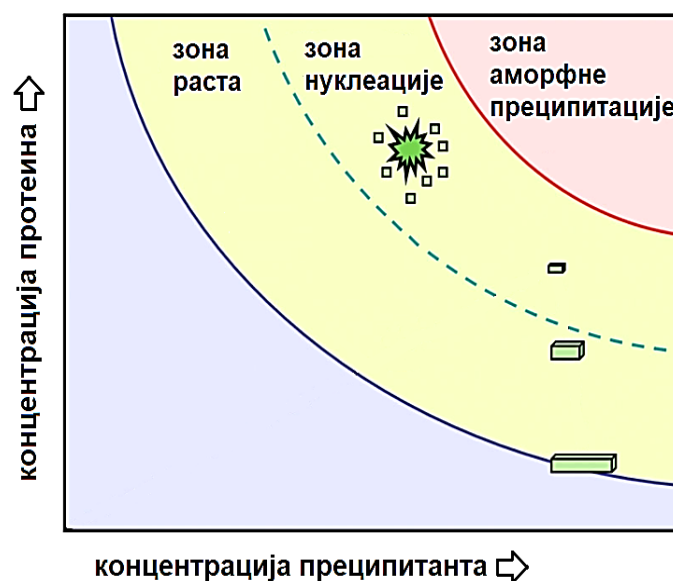
2.8.6.1. Кристализација протеина

Процес кристализације је одређен термодинамичким и кинетичким факторима, под којима се молекули протеина организују у уређене тродимензионалне решеткасте структуре са понављајућим елементима, које називамо елементарним ћелијама (слика 2.18). Кристализација подразумева две фазе: нуклеацију и раст кристала. Нуклеација је почетна фаза, где молекули протеина из раствора почињу да се скупљају у регионе који имају већу концентрацију протеина у односу на околину и који заузимају термодинамички метастабилно стање. Овакви региони расту и уколико достигну одређену критичну величину, постају стабилна језгра кристала. Нека језгра неће достићи критичну величину и раствориће се. Да ли ће доћи до нуклеације, зависи од спољашњих фактора као што је температура, састав преципитирајућег раствора (pH раствора, адитиви, преципитанти), као и од концентрације протеина (*Bergfors 2009*).



Слика 2.18. Структура кристалне решетке протеина (*Rupp 2009*).

За потребе кристализације протеин је најчешће потребно пречистити до најмање 90% чистоће, али некада је и сама кристализација корак у пречишћавању протеина. Обично се полази од концентрације протеина 10 mg/ml, а концентрација при којој долази до кристализације зависи од својстава протеина, тако да ће за протеине који су више растворљиви бити потребна већа концентрација да би дошло до кристализације. Да би дошло до кристализације било ког молекула, па и протеина, неопходно је да се тај молекул нађе у стању суперсатурације (слика 2.19, *Bergfors 2009*). Суперсатурација протеина представља термодинамички нестабилно стање у којем је количина молекула у раствору већа од растворљивости дате супстанце, па у циљу успостављања равнотеже долази до преципитације односно таложења. Кристализација је посебан вид преципитације у којем се протеински молекули организују у понављајуће јединице везане нековалентим интеракцијама. Током кристализације долази до негативне промене ентропије (ΔS) и позитивне промене Гибсове слободне енергије система (ΔG) чиме систем постаје термодинамички фаворизован (*Rhodes 2006*).



Слика 2.19. Фазни дијаграм кристализације протеина (дифузија испаравањем) (*Rupp 2009*).

Растворљивост протеина зависи од много фактора који утичу на интеракције протеина са компонентама раствора. Већина протеина је растворљива у физиолошким условима, па се за потребе кристализације тежи смањењу растворљивости. То се може постићи додавањем соли у високој концентрацији, изменама рН вредности раствора, варирањем температуре, додавањем преципитаната, нуклеаната и адитива, али и смањењем концентрације соли испод оне која погодује растворљивости протеина. За сваки протеин у сваком од ових услова потребно је наћи одговарајућу концентрацију при којој ће се

формирати кристали. При недовољној концентрацији протеина неће доћи до агрегације, док ће при превисокој концентрацији доћи до преципитације аморфног талога. Да би дошло до кристализације, протеин који се кристалише треба да буде задовољавајуће чистоће, да буде хомоген и да није деградиран. У одређеним условима као што је, на пример, висока температура, ће доћи до појачане нуклеације, па ће се формирати сферулити, микрокристали, иглице или жежеви. Овакви налази говоре у прилог томе да је истраживач на добром путу да добије кристале који дифрактују, али сами по себи нису од користи за кристалографске студије (*Bergfors 2009*).

Да би кристал протеина био употребљив у кристалографским студијама потребно је да то буде чист, уређен, довољно велик монокристал и да нема артефаката који би ометали дифракцију. Појединачни остаци аминокиселина као и протеин-лиганд интеракције могу се уочити при резолуцији нижој од 3 Å (*Rhodes 2006*).

Постоји неколико метода за добијање кристала, а најчешће се користи метода дифузије испаравањем (*енгл. vapour diffusion*). У овој методи, капљица која садржи пречишћен протеин у одговарајућем пуферу и раствор за кристализацију се еквилибрише према тзв. резервоару. Постављају се висеће или седеће капи раствора протеина помешаног са раствором за кристализацију у затвореном систему са резервоаром. Резервоар представља раствор за кристализацију вишеструко веће запремине од запремине капљице. У таквом систему дешава се еквилибрација до момента изједначавања осмотског притиска у капљици и резервоару, тако да се преципитант и протеин концентрују у капљици, док вода одлази у резервоар. Уколико су услови одговарајући, доћиће до суперсатурације и стварања кристала протеина. Добијени кристал протеина се хвата из капљице у којој је израстао најлонском петљом одговарајуће величине, провлачи се кроз раствор криопротектанта и складишти у течном азоту до тренутка снимања дифракционе слике (*Sands 1993*).

2.8.6.2. Основе теорије дифракције x-зрака на кристалима

Када посматрамо протеинске кристале или модел кристалне структуре, посматрамо директан или реалан простор. Атоми у овом простору су дефинисани реалним координатама x , y и z и формирају електронску густину $\rho(x,y,z)$. Да би се одредила структура кристалисаног протеина, кристал се поставља на гониометар уређаја за снимање дифракције. То може бити дифрактометар, где се као извор x-зрака најчешће користи ротирајућа бакарна анода, или синхротрон, где су извор зрака електрони који се

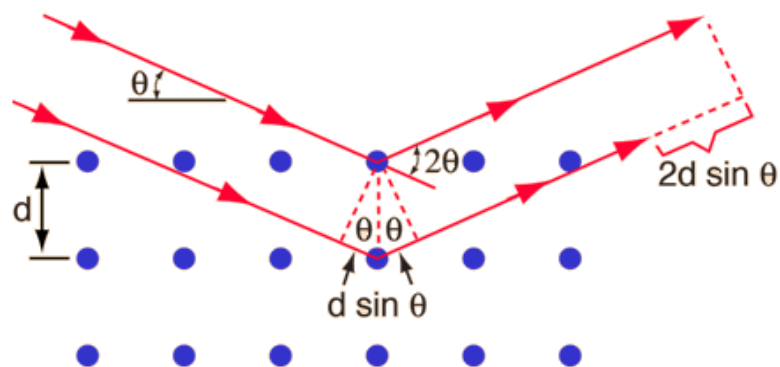
кружно убрзавају и при таквом кретању емитују x-зраке (Rupp 2009). Кристал протеина поставља се на гониометар тако да кроз њега пролази сноп x-зрака. X-зраци се усмеравају са извора, пролазе кроз монохроматор и наилазе на кристал. При интеракцији електричног и магнетног поља x-зрака са материјом један део зрака пролази кроз кристал, други део се апсорбује и изазива фотоелектрични ефекат, док се један део расејава у различитим правцима. Овакви зраци интерферирају (конструктивна или деструктивна интерференција) и као резултат на детектору се добија низ тачака које представљају дифракциону слику (Rhodes 2006, Rupp 2009).

Дифраковани x-зраци падају на детектор и настају тачке дифракције – рефлексије, које се бележе и чији интензитети се одређују софтверски. Рефлексије под малим угловима дају ниску резолуцију, док рефлексије под великим углом дају високу резолуцију. Кристал се ротира да би се дводимензионалне слике дифракције објединиле у тродимензионални модел (Rupp 2009).

Дифракциона слика је резултат интерференције дифракованих x-зрака по Браговом закону (слика 2.20):

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

где је θ угао дифракције, d растојање између две кристалне равни, λ таласна дужина x-зрака, а n је природан број (Rhodes 2006).



Слика 2.20. Брагов закон (преузето са <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/>).

Као резултат снимања дифракције добијамо низ дводимензионалних слика дифракције, које настају снимањем из различитих углова и које се обједињују у тродимензионалну слику. Ова слика се састоји из низа тачака различитих позиција и интензитета, које се називају рефлексијама. Слика дифракције је у реципрочном простору, а јединичне ћелије у њој су приказане као реципрочне ћелије (Rhodes 2006).

Директан и реципрочан простор у потпуности корелирају и могуће је трансформисати један приказ у други. Ово се постиже математички применом Фуријеових трансформација. Иако на слици дифракције можемо да измеримо интензитет сваке тачке, током снимања се губи податак о фази таласа (φ) и овај фазни проблем се мора решити да би превођење реципрочног у директан простор и решавање структуре било могуће. Фазни проблем најчешће се решава молекулском заменом (*енгл.* molecular replacement – MR), када постоји решена структура сличног протеина. У овом случају користе се фазе познате структуре и оне се комбинују са интензитетима непознате. Када ово није могуће прибегава се некој од других метода као што је обележавање протеина тешким атомима (*Rhodes 2006, Rupp 2009*).

Решавањем Фуријеовог низа дифракционе слике (софтверски) добија се мапа електронских густина:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl=-\infty}^{\infty} |F(hkl)| e^{-2\pi i[hx+ky+lz-\varphi(hkl)]}$$

где лева страна једнакости представља електронску густину у реалном простору (x, y, z), $F(hkl)$ је структурни фактор за раван расејања описану Милеровим индексима h, k и l (векторски збир зрака дифрактованих са сваког атома елементарне ћелије у датом правцу). Даље, $\varphi(hkl)$ представља фазе структурних фактора дифракције, а V је запремина јединичне ћелије (*Rupp 2009*).

2.8.6.3. Одређивање структуре протеина

Након добијања мапе електронских густина модел се утачњава и врши се минимизација енергије. Током утачњавања води се рачуна да координате атома одговарају електронској густини, али и да енергетски и други параметри система буду повољни. Потребно је наћи компромис између повољне дужине веза и углова, конформација које су дозвољене Рамачандрановим дијаграмом и термодинамички фаворизованих стања енергије. За ове потребе доступно је неколико софтверских пакета. Као резултат целог процеса добија се модел структуре протеина. Модели кристалних структура депонују се у ПДБ базу у виду .pdb фајла који садржи координате сваког атома, и .mtz фајла, који садржи мапу електронских густина добијену након Фуријеових трансформација дифракционих слика (*Bergfors 2009*).

3. ЦИЉЕВИ РАДА

У центру истраживања ове дисертације налази се ензим 3 α -хидроксистероид дехидрогеназа типа 3 (3 α ХСД-3). Познавање структуре и функције овог ензима, као и њихове међусобне повезаности доприноси фундаменталним сазнањима у области биологије, али може бити корисно и у биомедицинским наукама, с обзиром на повезаност 3 α ХСД-3 са настанком и развојем различитих болести, у првом реду канцера. Узимајући у обзир диверзитет метастатских болести, комплексност сигналних путева укључених у њихов настанак, као и честе мутације у геному туморских ћелија, неопходно је константно проналазити нове мете за лекове, који би се користили као једна од стратегија у лечењу малигних болести. Имајући у виду све наведено, циљеви истраживања која су урађена у оквиру ове дисертације били су:

- Хетерологно експримирати хуману 3 α ХСД-3 коришћењем *E. coli* и изоловати и пречистити активан ензим за ензимска и кристалографска испитивања,
- Идентификовати нове инхибиторе 3 α ХСД-3 тестирањем *in vitro* ензимске активности у присуству једињења из библиотеке деривата жучних киселина,
- Проценити јачину инхибиције ензимске активности најбољих кандидата из библиотеке мерењем вредности IC50, као и њихову специфичност, поређењем са јачином инхибиције сродног ензима 17 β ХСД-5,
- Утврдити структурне основе инхибиције 3 α ХСД-3 једињењима идентификованим у претходним корацима *in silico* методама молекулског докинга и молекулске динамике, као и студијама протеинске кристалографије,
- Наћи везу између структуре инхибитора и јачине инхибиције, односно креирати модел молекулских основа инхибиције 3 α ХСД-3 дериватима жучних киселина.

У сврху реализације наведених циљева приступило се *in vitro* и *in silico* тестирању ензимске активности и кристалографским студијама 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5. Издвојена су једињења која би могла модулисати активност 3 α ХСД-3, чиме је отворен пут за синтезу јачих и специфичнијих инхибитора овог ензима. Методе које су током рада оптимизоване биће коришћене за тестирање нових једињења, која би могла модулисати активност 3 α ХСД-3 и специфично деловати на процесе и стања одређене његовом функцијом у односу на друге, структурно и функционално сродне ензиме.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Материјал

4.1.1. Бактеријски сојеви коришћени за рекомбинантну експресију

За потребе експеримената рекомбинантне експресије коришћене су бактерије *E. coli* соја DH5 α за умножавање плаزمида, односно соја BL21 (DE3) за експресију рекомбинантних протеина. Изворне бактеријске ћелије ових сојева су купљене од Invitrogen-а (данас ThermoFisher Scientific, <https://www.thermofisher.com/>) и од тада су сојеви одржавани у виду основних („шток“) раствора у глицеролу који су повремено обнављани гајењем нових бактерија из глицеролског штока. За потребе експеримената рекомбинантне експресије бактерије су третиране тако да постану хемијски компетентне.

4.1.2. Плазмиди коришћени за рекомбинантну експресију

Плазмиди коришћени за експерименте описане у овој дисертацији као основу имају pET28b+ вектор, у који су клониране генске секвенце које кодирају хумане 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5. Плазмиди су добијени љубазношћу професора др Криса Банса (Chris Bunce, Бирмингемски унверзитет, Уједињено Краљевство). Ови плазмиди су послати за Нови Сад тако што је неколико микролитара раствора сваког плазмида нанесено на филтер папир, окружено графитном оловком и остављено да се осуши. По приспећу, исечени су обележени комадићи папира и потопљени у пуфер за елуцију плазмида (10 mM Tris HCl, 0,1 M EDTA, pH 8,5). Након неколико часова инкубације у топлој води садржај микротубица је центрифугиран 10 минута на 10 000 g, и део пуфера изнад папира сакупљен је за даље коришћење. Папири са остатком пуфера су сачувани на -20 °C. Овако изоловани плазмиди умножени су у DH5 α ћелијама, а плазмидне ДНК изоловане минипреп методом, да би се припремили аликвоти за даљу употребу.

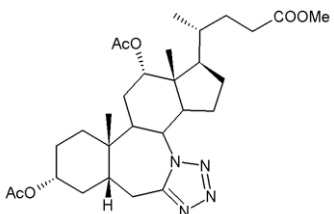
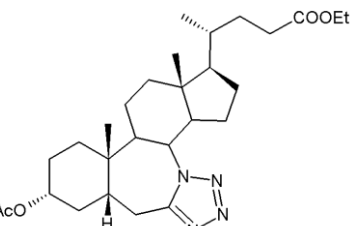
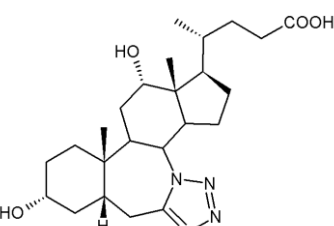
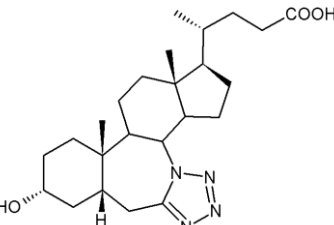
4.1.3. Тестирана једињења

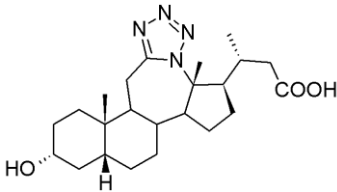
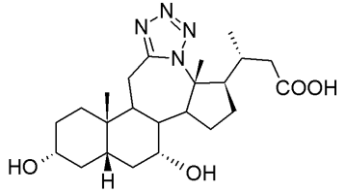
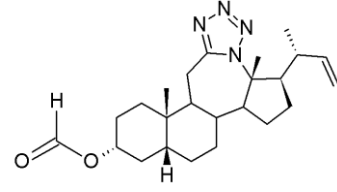
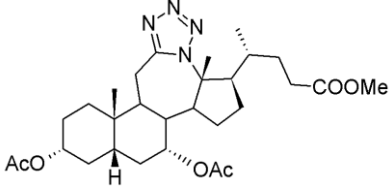
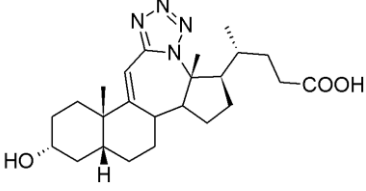
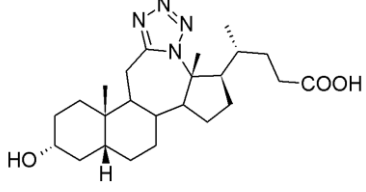
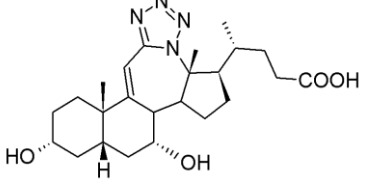
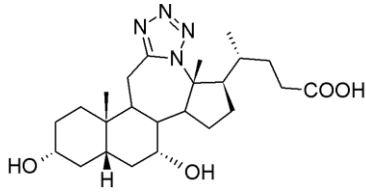
У експериментима за испитивање активности ензима, као и експериментима кристализације протеина тестирани су деривати жучних киселина синтетисани на Катедри за органску хемију Департмана за хемију, биохемију и заштиту животне средине Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду. Аутори су доставили спрашене узорке једињења, као и информације о њиховој структури и релативној молекулској маси.

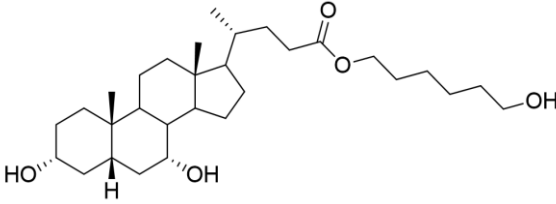
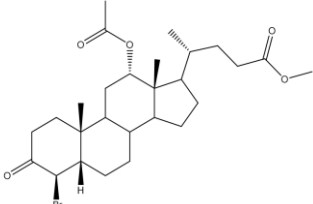
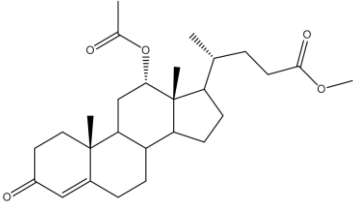
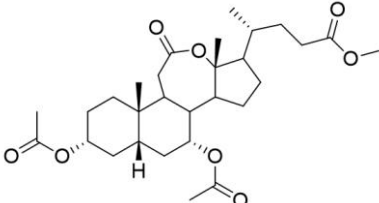
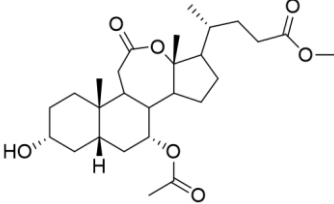
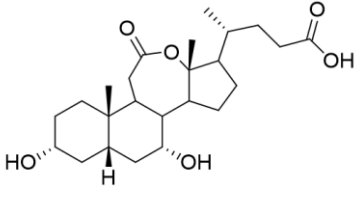
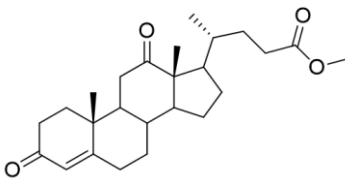
Узорци једињења су растварани у диметилсулfoxиду (ДМСО) тако да је за свако једињење направљен 10 mM шток, који је разблаживан за потребе појединачних експеримената. Као контролни инхибитор коришћен је ибупрофен, за који је познато да је панинхибитор АКР (*Gobec u cap. 2005, Flanagan u cap. 2012*). У табели 4.1. дате су структуре испитиваних једињења.

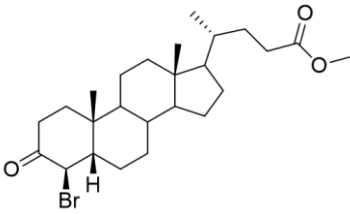
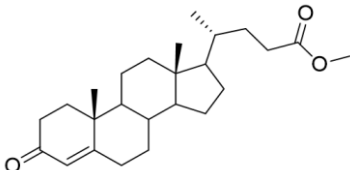
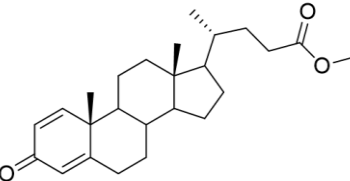
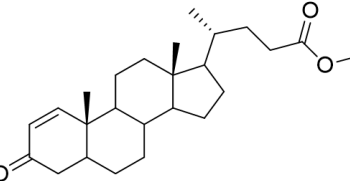
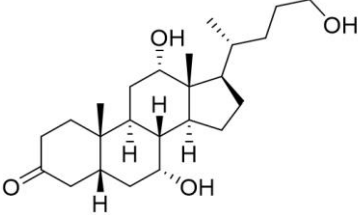
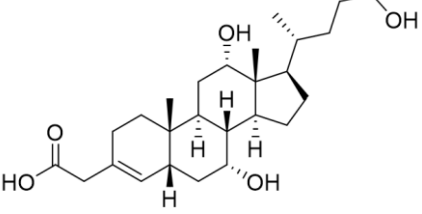
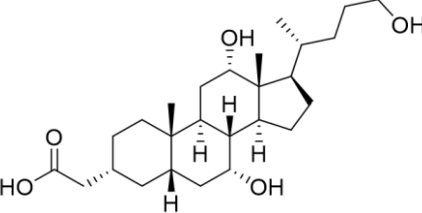
Сви остали хемијски реагенси коришћени у експерименталном раду набављени су из комерцијалних извора и били су аналитичког или вишег степена чистоће.

Табела 4.1. Деривати жучних киселина коришћени за испитивање утицаја на ензимску активност, кристалографске и *in silico* студије 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5. Ознака једињења дата је према иницијалима аутора, а приложене су структуре и релативне молекулске масе једињења.

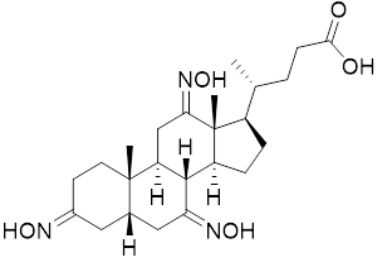
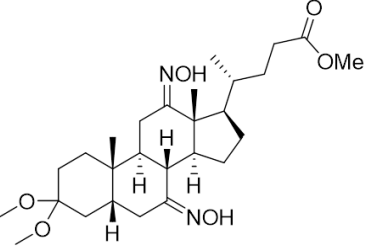
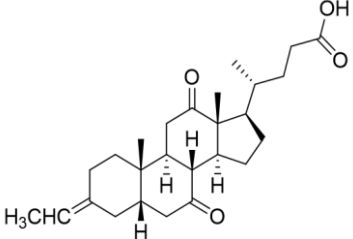
Ознака једињења	Структура једињења	Молекулска маса (Mr)
ДС10		544,68 g/mol
ДС11		500,67 g/mol
ДС12		446,58 g/mol
ДС13		430,58 g/mol

Ознака једињења	Структура једињења	Молекулска маса (Mr)
ДС22		416,56 g/mol
ДС23		432,56 g/mol
ДС24		412,57 g/mol
ДС5		544,68 g/mol
ДС6		428,57 g/mol
ДС7		430,58 g/mol
ДС8		444,57 g/mol
ДС9		446,58 g/mol

Ознака једињења	Структура једињења	Молекулска маса (Mr)
ЉГ1		492,73 g/mol
ЉГ10		525,52 g/mol
ЉГ11		444,60 g/mol
ЉГ2		520,65 g/mol
ЉГ3		478,62 g/mol
ЉГ4		422,55 g/mol
ЉГ5		400,55 g/mol

Ознака једињења	Структура једињења	Молекулска маса (Mr)
ЉГ6		467,48 g/mol
ЉГ7		386,57 g/mol
ЉГ8		384,55 g/mol
ЉГ9		386,57 g/mol
СБ126		392,58 g/mol
СБ133		434,62 g/mol
СБ134		436,63 g/mol

Ознака једињења	Структура једињења	Молекулска маса (Mr)
СБ138		474,59 g/mol
СБ140		386,25 g/mol
СБ144		444,58 g/mol
СБ153		505,74 g/mol
СБ156		407,60 g/mol

Ознака једињења	Структура једињења	Молекулска маса (Mr)
СБ157		447,58 g/mol
СБ158		492,66 g/mol
СБ20		414,28 g/mol

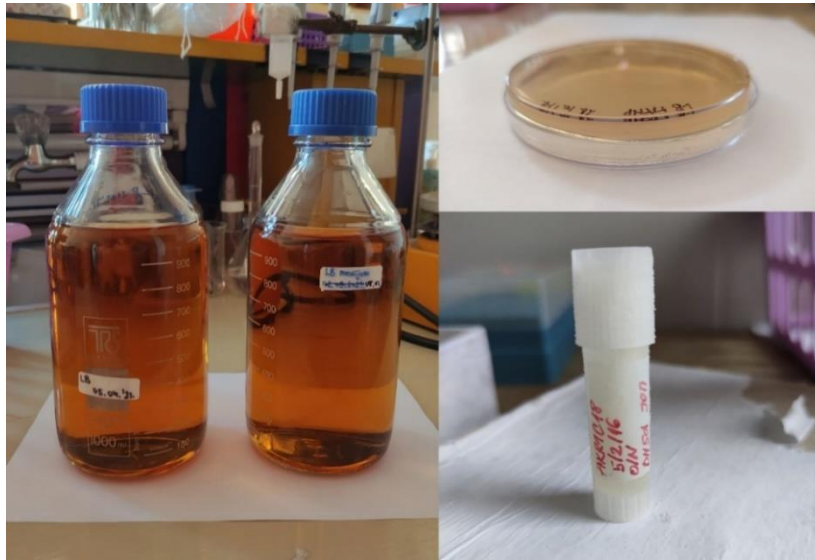
4.2. Методе рада

4.2.1 Експресија рекомбинантних 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5 у *E. coli*

4.2.1.1. Добијање хемијски компетентних бактерија *E. coli*

Бактерије *E. coli* сојева DH5 α и BL21 (DE3) коришћене за рекомбинантну експресију биле су подвргаване процесу током којег би постајале хемијски компетентне да усвоје плазмид из спољашње средине. Бактерије оба соја су засејаване из глицеролског штока на чврсту ЛБ подлогу (Лурија-Бертани медијум, који је садржао 1 g триптона, 0,5 g екстракта квасца, 1 g натријум-хлорида, и у случају чврсте подлоге 1 g агара на 100 ml дестиловане воде и који је стерилисан аутоклавирањем) и инкубиране 16 часова на 37 °C. Након инкубације, са сваке плоче је узета по једна колонија за инокулацију 5 ml течног ЛБ медијума (слика 4.1) и гајена 16 часова на 37 °C (преко ноћи) уз мешање.

Након инкубације, 500 μl преконоћне културе додато је у 50 ml чистог течног ЛБ медијума, и праћен је раст бактерија које су гајене на 37 °C у инкубатору са тресилицом. Када је оптичка густина културе бактерија на 595 nm (OD_{595}) достигла вредност између 0,25 и 0,35 суспензија бактерија је охлађена у леду и бактерије исталожене центрифугирањем 10 минута на 12 000 g.



Слика 4.1. Течни ЛБ медијум, ЛБ агар и криотуба са глицеролским штоком бактерија.

Супернатант је одбачен, а талог бактерија, добијен од 5 ml суспензије бактеријске културе ресуспендован је у 1,5 ml ледено хладног раствора 0,1 M CaCl_2 и инкубиран на леду 30 минута. По истеку овог периода бактерије су центрифугиране 10 минута на 6 000 g на 4 °C. Супернатант је одбачен а талог је ресуспендован у 300 μl ледено хладног пуфера, који је садржао 0,1 M CaCl_2 и 15% глицерола.

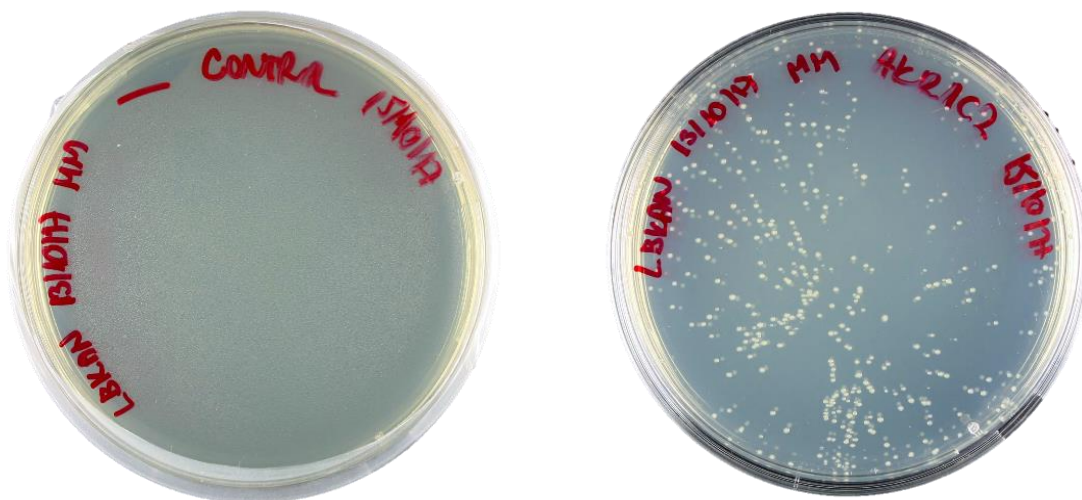
Овако припремљене ћелије су подељене у више аликвота, ради лакше даље употребе, па ускладиштене на -80 °C. Успешност процеса стицања хемијске компетентности проверавана је трансформацијом бактерија познатим плазмидима, за које се зна да су их бактеријске ћелије у ранијим експериментима успешно усвајале.

4.2.1.2. Трансформација бактерија

Трансформација хемијски компетентних бактерија *E. coli* сојева DH5 α и BL21 (DE3) плазмидима рЕТ28b+ који носе гене за хумане 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5 (АКР1Ц2 и АКР1Ц3) одвијала се по принципу топлотног шока (*енгл.* heat shock). Селекција успешно трансформисаних бактерија изведена је гајењем на селективној подлози са антибиотиком, на основу гена који је садржан у вектору, а који трансформисаним

бактеријама омогућава отпорност на антибиотик, односно раст на селективној подлози са антибиотиом. Бактерије соја DH5 α су, с обзиром на своју генетичку конфигурацију, трансформисане са циљем коришћења за умножавање плаزمида. Ћелије BL21 (DE3) су трансформисане у циљу хетерологне експресије протеина с обзиром на то да овај сој има протеом прилагођен томе да се постигне највиша могућа ефикасност рекомбинантне експресије протеина (Froger u Hall 2007).

Компетентне бактерије су након вађења са -80 °C отапане на леду. За сваки плазмид посебно је у стерилној, охлађеној епендорф тубици додато по 1 μ l плазмида и 100 μ l суспензије компетентних бактерија. Бактерије су инкубиране са плазмидом 20 минута на леду. Након овог периода уследио је топлотни шок, где су бактерије са плазмидом стављене на 45 секунди у водено купатило загрејано на 42 °C. По истеку овог периода бактерије су враћене на лед и након 2 минута додато им је 500 μ l ЛБ медијума. Бактерије су остављене у ЛБ медијуму сат времена на 37 °C да би се припремиле за раст на селективној подлози. Након опоравка, бактерије су засејане на селективне подлоге (ЛБ агар са 50 μ g/ml канамицина, слика 4.2.) и инкубиране преко ноћи на 37 °C. На селективној подлози са канамицином су се формирале колоније пореклом од бактерија које су усвојиле плазмид који је садржао ген за жељени протеин, као и ген који омогућава отпорност на канамицин (Froger u Hall 2007).



Слика 4.2. Колоније *E. coli* засејане на чврстој селективној ЛБ подлози: бактерије BL21 трансформисане водом (негативна контрола, лево) и плазмидом pET28(b)-AKR1C2 (десно). Бактерије су расле у присуству канамицина у финалној концентрацији 50 μ g/ml.

4.2.1.3. Пречишћавање плазмидне ДНК из ћелија *E. coli* соја DH5 α

Умножавање и пречишћавање плазмидне ДНК (минипреп, прилагођено из протокола QIAGEN, <https://www.qiagen.com/>) рађено је у култури бактерија *E. coli* соја DH5 α . Трансформисане бактерије су засејане на чврсту селективну ЛБ подлогу и инкубиране преко ноћи на 37 °C у инкубатору са тресилицом. Након инкубације, једна колонија је инокулирана у 50 мл течног селективног ЛБ медијума са чврсте подлоге. Медијум са бактеријама је инкубиран преко ноћи на 37 °C и ујутру су бактерије исталожене центрифугирањем 10 минута на 10 000 g, тако да је свака тубица садржала талог пореклом од 5 ml преконоћне културе. Супернатант је одбачен, а талог је растворен у 250 μ l П1 пуфера (50 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8,0, 100 μ g/ml RNase A). Приликом ресуспензије ћелија у П1 пуферу EDTA је хелирала двовалентне катјоне и на тај начин инхибирала нуклеазе које би разградиле ДНК, док је РНК нуклеаза додата да би се у наредним корацима поспешила разградња сувишне РНК. Након ресуспензије, у тубице је додато 250 μ l П2 пуфера (200 mM NaOH, 1% SDS), при чему је дошло до алкалне лизе ћелија у присуству јаке базе и детерџента. Наредни корак био је неутрализација базе, при чему је коришћено 350 μ l Н3 пуфера (4,2 M гуанидин-НСl, 0,9 M CH₃COOK, pH 4,8). Киселина је додата да би се неутрализовала база из претходног корака, а гуанидин хидрохлорид је као хаотропни агенс додат да би се повећао степен ентропије реакционих система. Настао је бео талог, као последица неутрализације базе киселином. Тубице су центрифугиране 10 минута на 10 000 g на 4 °C. Након центрифугирања, преципитат је остао на зидовима тубица, а супернатант је издвојен у нове тубице, у које је додато 30 μ l суспензије силикагела концентрације 100 mg/ml. Тубице са силикагелом су инкубиране 5 минута на собној температури. Након инкубације, садржај тубица је центрифугиран један минут на 10 000 g, супернатант је одливен, а талог је растворен у 500 μ l ПЕ пуфера (10 mM TrisНСl pH 7,5, 80% етанола). Етанол у ПЕ пуферу доприноси дехидратацији и таложењу ДНК, чиме се она издваја из раствора. Тубице су центрифугиране један минут на 10 000 g, након чега је одливен супернатант и ресуспензија у ПЕ пуферу је поновљена. Након поновљеног испирања талоба тубице су остављене да се талог у њима осуши и да етанол у потпуности испари. На крају, у тубице је додато по 50 μ l ЕБ пуфера (10 mM TrisНСl, pH 7,5) и током инкубације 5 минута на 65 °C плазмидна ДНК се елуирала са куглица силикагела. Након центрифугирања 1 минут на 10 000 g, супернатант у коме је садржана растворена плазмидна ДНК је сакупљен и аликвотиран, а затим сачуван на -20 °C (Craig u Rapley 2000, Zhang u Cahalan 2007).

4.2.1.4. Хетерологна експресија протеина у ћелијама *E. coli* соја BL21

Трансформисане бактерије *E. coli* соја BL21 (DE3) коришћене су за индукцију рекомбинантне експресије протеина. Бактерије су гајене преко ноћи на 37 °C у течном селективном ЛБ медијуму у инкубатору са тресилицом, да би се ујутро преконоћна култура разблажила 1000 пута (1 ml културе у 1000 ml чистог ЛБ медијума са канамицином). Овако разблажена преконоћна култура је гајена на 37 °C уз редовно проверавање оптичке густине спектрофотометром. Када је OD₅₉₅ достигла вредност 0,6, у културу бактеријских ћелија је додат изопропил β-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG) у финалној концентрацији 0,1 mM. IPTG је по структури сличан лактози и механизам индукције рекомбинантне експресије подразумева покретање експресије гена, који се на вектору налазе под *Lac* промотором.

Предност молекула IPTG у односу на лактозу је што се ово синтетско једињење не троши у бактеријским ћелијама као извор енергије, па је његова концентрација у ћелији константна. Такође, сматра се да по додавању IPTG-а у културу престају процеси раста и деобе ћелија, тако да су сви ресурси ћелије усмерени на експресију жељеног протеина. Експресија је рађена на 37 °C током 6 часова у инкубатору са тресилицом.

За анализу квалитета и приноса као и праћења процеса експресије жељеног протеина SDS-PAGE електрофорезом узето је по 1 ml културе пре индукције (неиндуковане ћелије), након 3 часа (полувреме индукције) и након 6 часова (на крају индукционог периода) (*Plavša u cap. 2018*). Након индукције, бактеријска култура је центрифугирана 10 минута на 6 000 g. Супернатант, који је садржао медијум у којем су бактерије расле је одбачен, а талог је ресуспендован у 10 ml фосфатног пуфера за 1 l културе (100 mM Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 8,0). У пуфер је додат лизозим у финалној концентрацији 1 mg/ml. Ресуспендован талог бактеријске културе чуван је у замрзивачу на -20 °C за даље лизирање и пречишћавање.

4.2.2. Лизирање BL21 ћелија након хетерологне експресије протеина

Лизирање ресуспендованих бактерија одвијало се у 5 циклуса наизменичног отапања на 37 °C и мржњења на -20 °C. Током овог процеса, лизозим би деградирао ћелијске зидове *E. coli*, а наизменично мржњење и топљење доприносило би пуцању ћелијске мембране услед њеног наизменичног ширења и скупљања. Након мржњења и топљења, ресуспендовани талог је излаган ултразвуку у десетак циклуса по 30 секунди, са

хлађењем између сваког циклуса. Број циклуса зависио би од вискозности бактеријског лизата, па је соникација понављана док се иницијално вискозан раствор бактеријског лизата не би избистрио, што би значило да је већина геномске ДНК деградирана.

Након процеса лизирања и соникације, бактеријски лизат је избистрен центрифугирањем на 12 000 g, 45 минута на 4 °C, а као производ добијен је груб екстракт бактеријских протеина. Очекивано је да је рекомбинантни протеин садржан у супернатанту, али су талози након центрифугирања бактеријског лизата чувани у случају да су од рекомбинантног протеина формирана инклузиона тела. Узорци лизата пре центрифугирања, као и супернатанта и талоба након центрифугирања сачувани су за анализу SDS-PAGE електрофорезом.

4.2.3. Пречишћавање активних 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5 из бактеријског лизата

Супернатант добијен центрифугирањем бактеријског лизата нанет је на претходно еквилибрисану His-Трап колону за металоафинитетну хроматографију (GE Healthcare Life Sciences, <https://www.gehealthcare.com/>). При металоафинитетној хроматографији јони метала (Ni²⁺) везани су за зрна сефарозе и представљају стационарну фазу, док је мобилна фаза супернатант добијен након центрифугирања бактеријског лизата. Рекомбинантно експримирани протеин садржи хексахистидински обележивач (His₆), кодиран вектором за експресију, који му обезбеђује јак афинитет према јонима никла. За испирање неспецифично везаних протеина, као и елуирање протеина са His₆ обележивачем са колоне користи се имидазол у различитим концентрацијама, с обзиром на то да ово једињење, које је у основи хистидинског бочног остатка, показује висок афинитет према јонима никла.

Пречишћавање протеина металоафинитетном хроматографијом рађено је по протоколу произвођача. Колона запремине 1 ml (слика 4.3) је еквилибрисана у 10 пута већој запремини везујућег пуфера (20 mM Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄, pH 8,0), 500 mM NaCl). На еквилибрисану колону је нанет супернатант лизата и сакупљена је проточна фракција. Колона је у првом кораку испрана са 10 ml везујућег пуфера, а затим са 10 ml везујућег пуфера у који је додат имидазол концентрације 50 mM. Оваква стратегија испирања имала је за циљ уклањање слабије и неспецифично везаних протеина са колоне пре почетка елуирања, како би се у елуатима сакупио што чистији жељени протеин. Након испирања, највећи удео везаних протеина на колони требало би да чини рекомбинантно експримиран протеин са His₆ обележивачем.

Елудија рекомбинантно експримиране 3α ХСД-3 односно 17β ХСД-5 са колоне рађена је везујућим пуфером у који је додат имидазол у финалној концентрацији 400 mM. За сваки протеин сакупљено је укупно 5 фракција по 1 ml. Концентрација протеина у фракцијама елуата процењена је квалитативно, методом по Брадфорду и сакупљене су фракције Е1-Е3 за даље пречишћавање методом гел-филтрационе хроматографије.



Слика 4.3. Колоне за металоафинитетну хроматографију напуњене никал-сулфатом.

Током свих корака експресије и пречишћавања протеина одвајани су узорци за проверавање чистоће методом SDS-PAGE електрофорезе (Sulkowski 1985).

Након пречишћавања протеина, колона је испирана везујућим пуфером, а након неколико пречишћавања, када би се приметио отежан проток кроз колону (повећан негативни притисак) приступило би се чишћењу колоне, најпре натријум-хидроксидом, а потом везујућим пуфером који је садржао EDTA. Након ових корака дошло би до испирања никла са колоне услед хелирајућег дејства EDTA, тако да је колону било потребно поново напунити солима никла, најчешће у облику NiSO_4 , и испрати везујућим пуфером, након чега би колона поново била спремна за рад.

Следећи корак у пречишћавању протеина за испитивање ензимске активности била је гел-филтрациона хроматографија одабраних елуата са никал колоне. Принцип ове методе је раздвајање молекула на основу ефекта молекулског сита, при чему ће мањи молекули, релативне молекулске масе мање од дефинисане граничне (*енгл.* cut off) вредности улазити у поре матрикса, због чега ће прелазити дужи пут, док ће већи молекули заобићи куглице матрикса и брже проћи кроз колону. На овај начин већи молекули први пролазе кроз колону, док се мањи молекули задржавају током проласка кроз матрикс и колону напуштају касније. Главни циљ гел-филтрационе хроматографије у овом делу експеримента био је елиминација соли и имидазола након металоафинитетне хроматографије, тако да је гел-филтрација у овом случају заменила

дијализу, иако се ова метода у биохемији и молекуларној биологији користи и као класична хроматографска метода за пречишћавање протеина (*Mori u Barth 2013*).

За гел-филтрациону хроматографију као стационарна фаза коришћен је матрикс BioGel P-10 (BIO-RAD, <https://www.bio-rad.com/>). У дестилованој води суспендовано је 0,8 g гела, *cut off* вредности 15–20 kDa и остављено преко ноћи да хидратише. Хидратисан матрикс сипан је у колону запремине 40 ml, остављен у колони да се слегне, а затим еквилибрисан везујућим пуфером (10 mM K₂HPO₄ + KH₂PO₄, pH 7,0, 150 mM NaCl). Након еквилибрације, на колону су нанети спојени сви сакупљени елуати са никал колоне који су у Брадфордском тесту показали да садрже протеин (најчешће су то били елуати E1–E3). Колона је отворена док се менискус додате течности није изравнао са нивоом матрикса, а затим је на колону нането 15 ml везујућег пуфера и сакупљено је 15 фракција, при чему је свака била запремине 1 ml (F1–F15) (*Veliça u cap. 2009*). При раду са колоном за гел-филтрацију било је неопходно водити рачуна да не дође до нарушавања површине матрикса, па су пуфери и узорци додавани пажљиво, кружним покретима уз зид колоне.

Након гел-филтрационе хроматографије, Брадфордском методом испитано је присуство протеина у фракцијама, па су фракције које су садржале протеин сакупљене и спојене. У добијени раствор пречишћеног протеина додати су кофактор (1,2 mM NADP⁺) и глицерол до финалне концетрације 30%. Овако припремљен раствор протеина је подељен у неколико аликвота и замрзнут на -80 °C до даље употребе за испитивање ензимске активности.

4.2.4. Денатуришућа електрофореза у полиакриламидном гелу (SDS-PAGE)

Принос и чистоћа пречишћене рекомбинантне 3αХСД-3, односно 17βХСД-5 утврђени су методом денатуришуће електрофорезе на полиакриламидном гелу (*енгл. sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis – SDS-PAGE, Bollag u cap. 1996*). Техника SDS-PAGE је, као и друге електрофоретске методе, заснована на раздвајању молекула у пољу једносмерне електричне струје на основу њихових физичких и хемијских својстава. Узорци се током припреме излажу деловању детерцента (натријум додецил сулфат, SDS), високој температури и β-меркаптоетанолу. Садејством наведених фактора долази до нарушавања виших нивоа структуре протеина, па се електрофоретско раздвајање врши искључиво на основу дужине полипептидног ланца. Протеини из потпородице АКР1Ц су молекулске масе око 37 kDa, тако да је раздвајање вршено на

12,5% полиакриламидном раздвајајућем гелу, изнад ког је изливен 4% концентрујући (енгл. stacking) гел (рецептура за прављење гелова дата је у табели 4.2).

Узорци сакупљени током процеса експресије и пречишћавања протеина, као и узорци пречишћене 3 α ХСД-3 односно 17 β ХСД-5 након сједињавања фракција и додавања кофактора су помешани са пуфером за узорке и прокувани 5 минута на 95 °С. Помешано је 16 μ l узорка и 4 μ l 5 х концентрованог пуфера који је садржао 0,2 М Tris рН вредности 6,8, 5% SDS, 25% глицерол, 0,0016% бромовенол плаве и 5% β -меркаптоетанола, који је додаван непосредно пред припрему узорака.

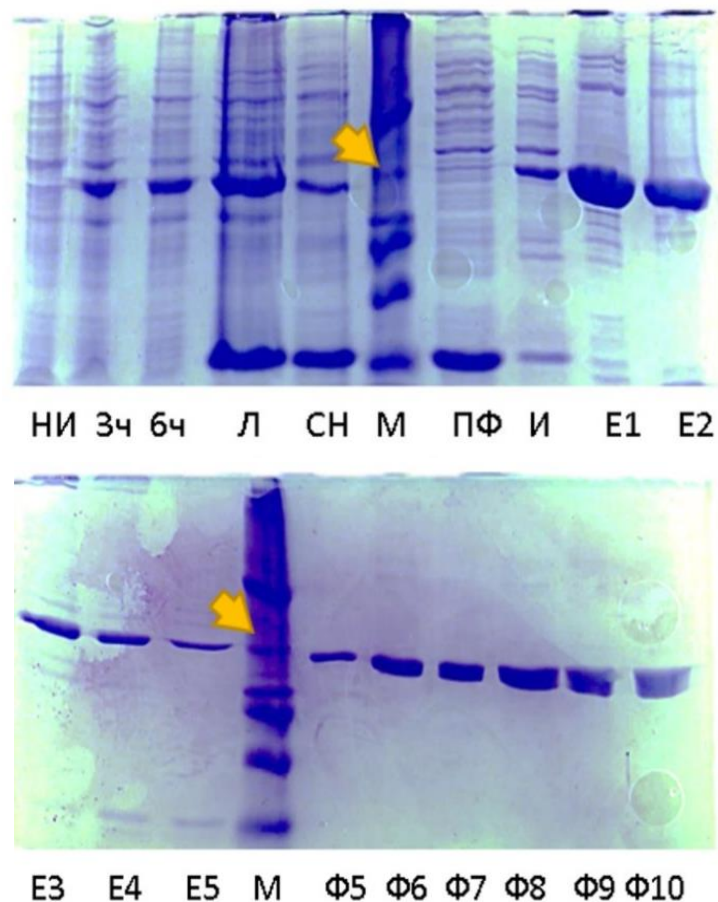
Табела 4.2. Компоненте полиакриламидних гелова за SDS-PAGE. Гелови су били дебљине 1 mm. У табели су дате запремине потребне за по два 12.5% (раздвајајући) и 4% (концентрујући) гела.

компонента гела	гел за концентровање (4%)	гел за раздвајање (12%)
Tris-HCl	0,5 М, 2,5 ml, рН 6,8	1,5 М, 4 ml, рН 8,8
дестилована вода	6 ml	6,9 ml
30% акриламид/бис*	1,33 ml	6,4 ml
10% SDS	100 μ l	160 μ l
10% амонијум персулфат	100 μ l	160 μ l
TEMED	10 μ l	16 μ l

* ознака акриламид/бис се односи на смешу акриламида и бисакриламида у односу 29:1

Узорци веће вискозности, као што су индуковане и неиндуковане ћелије, лизати ћелија, супернатанти и проточне фракције са металоафинитетне хроматографије подвргавани су соникацији у ултразвучном воденом купатилу пре nanoшења на гел. Поред узорака, на гел је нанет и маркер (Sigma Dalton Mark VII-L (<https://www.sigmaldrich.com/>), распона молекулских маса од 16–44 kDa. Гелови су изливени у апаратуру за прављење гелова, најпре гел за раздвајање, а након његове полимеризације гел за концентровање, у који је стављен чешаљ за узорке. Након полимеризације, гелови су пребачени у кадицу за електрофорезу у коју је наливен охлађен пуфер за електрофорезу (25 mM Tris, 192 mM глицин, 0,1% SDS). Електрофоретско раздвајање протеина у узорцима сакупљеним током експресије и пречишћавања протеина одвијало се при константном напону од 80 V кроз концентрујући гел, односно 180 V кроз раздвајајући гел.

Када је фронт бромофенол плаве боје дошао до краја гелова, електрофореза је заустављена. Гелови су извађени из апаратуре за електрофорезу и испрани дестилованом водом. Бојење гелова одвијало се 2 сата у раствору за бојење (1,2 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 300 ml метанола, 60 ml глацијалне сирћетне киселине, 240 ml воде). Након бојења, обезбојавање је вршено у раствору за обезбојавање (50 ml метанола, 50 ml глацијалне сирћетне киселине, 400 ml воде) уз неколико замена раствора за обезбојавање на сваких неколико часова. Након обезбојавања, гелови су испрани дестилованом водом и фотографисани у комори за фотографисање гелова (слика 4.4).



Слика 4.4. Изглед гелова након SDS-PAGE електрофорезе узорка узетих током експресије и пречишћавања 3 α ХСД-3. Узорци: НИ – неиндукована контрола, 3ч – узорак након половине индукционог времена (3 часа), 6ч – узорак након индукције (6 часова), Л – лизат бактерија: 1 ml културе центрифугиран је и ресуспендован у 100 μ l фосфатног пуфера, сонификован и помешан са бојом за узорке. За остале узорке: СН – супернатант добијен након центрифугирања бактеријског лизата, ПФ – проточна фракција након проласка супернатанта кроз никал-афинитетну колону, И – фракција сакупљена након испирања никал-афинитетне колоне, Ех – елуати са никал колоне, Фх – елуати са гел-филтрационе колоне, М – маркер Сигма Далтон Марк VII-7, жутом стрелицом обележена вредност 36 kDa.

4.2.5. Одређивање концентрације протеина

Концентрација рекомбинантно експримираних ензима 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5 одређивана је спектроскопском методом и методом по Брадфорду (*Bollag u cap. 1996*).

Брадфордова метода за одређивање концентрације протеина заснована је на везивању боје Coomassie Brilliant Blue R-250 за ароматичне остатке у протеину, при чему се формира комплекс боје и протеина који је плаве боје. Концентрација протеина, која је директно сразмерна интензитету плаве боје, може се мерити спектрофотометријски, при чему се на основу апсорбанце измерене на узорцима протеина познате концентрације (нпр. говеђи серумски албумин – *енгл.* bovine serum albumin – BSA) формира стандардна крива зависности апсорбанце од концентрације протеина. На овај начин, мерењем апсорбанце непознатог узорка, из једначине стандарне криве могуће је одредити концентрацију протеина у узорку. За потребе пречишћавања протеина методама металоафинитетне и гел-филтрационе хроматографије, присуство протеина у фракцијама утврђивано је квалитативно. У микротитар плочу додат је 1 μ л елуата са металоафинитетне или гел-филтрационе колоне и 100 μ л Брадфордовога реагенса, при чему би фракције које садрже протеин биле плаво обојене (слика 4.5).



Слика 4.5. Квалитативна Брадфордова анализа елуата са никал колоне: у бунарима Н2 – Н6 налази се 1 μ л елуата са никал колоне, редом од Е1 до Е5. У пољу Н7 налази се слепа проба (1 μ л фосфатног пуфера са имидазолом, којим је елуирана колоне). У сваки бунар додато је по 100 μ л Брадфордовога реагенса, при чему интензитет плаве боје директно корелира са концентрацијом протеина у узорку.

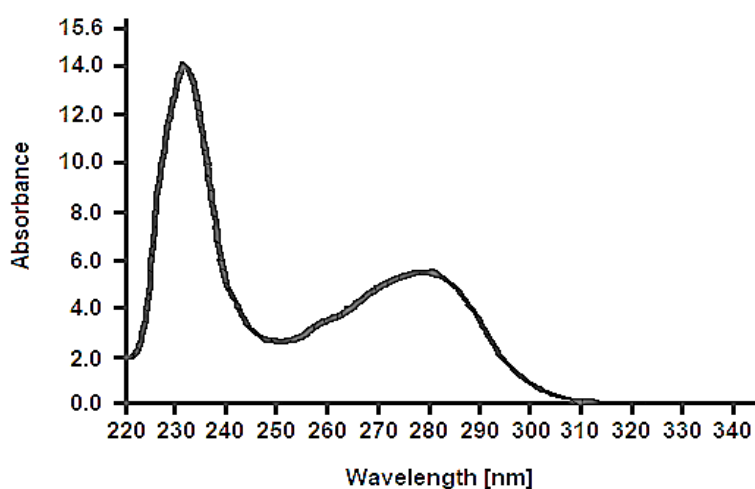
Захваљујући чињеници да остаци ароматичних аминокиселина у протеинима апсорбују ултраљубичасту светлост са максимумом апсорпције на 280 nm, могуће је спектрофотометријски одредити концентрацију нативних протеина у узорку. Концентрација протеина добија се из Ламбер-Беровог закона:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

где A представља измерену апсорбанцу узорка на 280 nm, c представља концентрацију протеина, l пређени пут светлости, док ε представља моларни екстинкциони коефицијент протеина који се може израчунати на основу аминокиселинске секвенце протеина. Моларни екстинкциони коефицијент на основу аминокиселинске секвенце може се израчунати на ExPASy серверу (<https://www.expasy.org/>) шведског института за

биоинформатику (Swiss Institute of Bioinformatics, <https://www.sib.swiss/>). Апсорбанца је мерена на нанодроп спектрофотометру (Bio Spec-nano, Shimadzu, <https://www.shimadzu.com/>). За процену чистоће узорка рачуна се однос A_{260}/A_{280} . За оба испитивана ензима количник A_{260}/A_{280} био је близу 0,6 што је значило одсуство контаминације нуклеинским киселинама.

Важно је напоменути да нанодроп спектрофотометар аутоматски прерачунава концентрацију протеина на основу задатог моларног екстинкционог коефициента и запремине капљице која се наноси на апарат, а на основу апсорбанци на 260 и 280 nm израчунава и однос A_{260}/A_{280} . (слика 4.6).



Слика 4.6. Запис са нанодроп спектрофотометра: крива зависности апсорбанце раствора протеина од таласне дужине. Узорак је 17 β ХСД-5 након концентровања за кристалографске студије, разблажен 10 пута у пуферу. Израчуната концентрација је 5,5 mg/ml, односно 55 mg/ml без разблажења. Однос A_{260}/A_{280} је 0,64.

4.2.6. Одређивање активности ензима мерењем промене апсорбанце NADPH

За испитивање ензимске активности рекомбинантно експримираних 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5 коришћен је есеј заснован на мерењу потрошње NADPH. Потрошња кофактора директно је сразмерна активности ензима, а могуће ју је квантификовати мерењем смањења апсорбанце реакционе смеше на 340 nm током трајања реакције. На овој таласној дужини редуковани кофактор има максимум апсорпције. Апсорбанца на 340 nm се смањује стопом оксидације NADPH, тако да A_{340} директно осликава концентрацију редукованог кофактора у реакционој смеси (Möller *u cap.* 2009, 2009 Velića *u cap.* 2009, Schuster *u cap.* 2011).

Приликом испитивања ензимске активности, реакције су се одвијале у фосфатном пуферу (10 mM K_2HPO_4 + KH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH 7,0). Кофактор (NADPH) је растворен у дестилованој води и направљен је 20 mM шток, а у реакционе смеше је додаван у вишку, тако да је његова финална концентрација у свакој реакционој смеси износила 200 μ M. Ова концентрација кофактора је давала почетни сигнал A_{340} у распону 0,55–0,65. Супстрат (фенантренхинон) је растворен у ДМСО, тако да је направљен 0,5 mM шток, а у реакционе смеше је додат у концентрацији која одговара Михаелис-Ментеновој константи, која за оба испитивана ензима износи 1,1 μ M (*Velica и сар.* 2009). Ензим је чуван у суспензији са 30% глицерола и 1,2 mM оксидованог коензима (NADP⁺) и додаван је у реакциону смешу у финалној концентрацији 1 μ M. За негативне контроле ензимске активности постављене су реакције у којима је уместо ензима додавана једнака запремина фосфатног пуфера. Температура на којој су се одвијале реакције била је 37 °C. Реакције су отпочињане додавањем ензима, а праћене су спектрофотометријски, 30 минута, са интервалом мерења од 30 секунди.

Потенцијални инхибитори – деривати жучних киселина су растворени у ДМСО у виду 10 mM штокова. За почетно тестирање инхибиције ензимске активности коришћени су основни раствори 40 μ M инхибитора по реакцији, а за одређивање IC₅₀ вредности код неколико најбољих кандидата коришћена су разблажења инхибитора у распону концентрација од 0–400 μ M. Раствори потенцијалних инхибитора су додавани у смешу пуфера, кофактора и супстрата тако да није било корака прединкубације ензима и инхибитора. Сваки експеримент инхибиције ензимске активности изведен је у трипликату, у два независна огледа. За негативне контроле инхибиције ензимске активности постављане су реакције у које се уместо инхибитора додавао чист ДМСО у истој запремини у којој је додаван инхибитор у експерименталне реакционе смеше. Негативне контроле ензимске активности су биле реакционе смеше без ензима, да би се потврдило да је пад апсорбанце кофактора резултат ензимске катализе и редукције супстрата, а не неког другог фактора. Позитивне контроле у експериментима испитивања ензимске активности биле су саме ензимске реакције, без инхибитора.

Мерење A_{340} је вршено спектрофотометријски, у трајању од 30 минута са интервалом између мерења од 30 секунди (Multiscan GO, Fisher Scientific, <https://www.fishersci.pt/>). Резултати мерења су приказани као A_{340} у зависности од времена, а у обзир је узиман линеарни део криве, који је представљао првих десетак минута мерења. Кроз линеаран

део провучена је права која најверодостојније представља зависност апсорбанце од времена и забележен је њен нагиб. Процент инхибиције је рачунат по формули:

$$\text{инхибиција} = \frac{\text{нагиб}_{\text{тест-нк}} - \text{нагиб}_{\text{пк-нк}}}{\text{нагиб}_{\text{пк-нк}}} \cdot 100\%$$

где *тест* означава ензимску реакцију у присуству испитиваног једињења, *нк* означава негативну контролу, а *пк* позитивну контролу реакције.

За рачунања једначине праве и конструисање графика коришћен је Microsoft Excel (<https://www.microsoft.com/>). Процент инхибиције ензимске активности деловањем сваког од испитиваних једињења израчунат је и представљен као аритметичка средина \pm стандардна девијација три независна мерења у по два одвојена огледа.

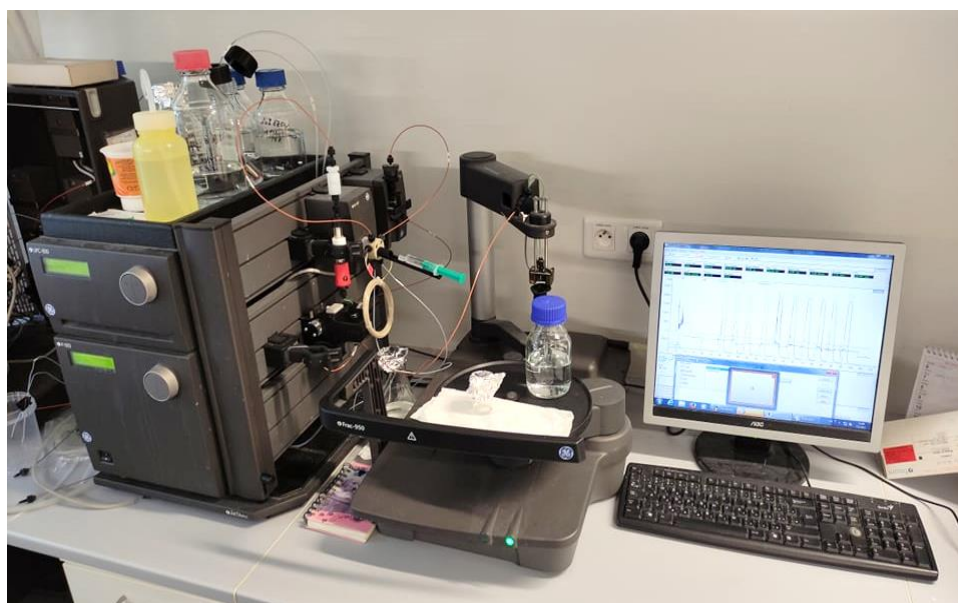
За једињења која су показала највећу стопу инхибиције активности 3 α ХСД-3 при прелиминарном тестирању одређивана је IC50 вредност. Ова вредност представља концентрацију инхибитора при којој је активност ензима смањена за 50%. Ензимски есеј за одређивање IC50 вредности је рађен на идентичан начин као за прелиминарно тестирање инхибиције, али је у овом делу тестирања концентрација инхибитора била променљива, односно варирана је у распону 0–400 μ M по реакцији (0, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400 μ M). На основу добијених података конструисане су криве зависности процената инхибиције од концентрација инхибитора, и помоћу њих су одређене IC50 вредности. Вредности IC50 су добијене коришћењем програма Very Simple IC50 Tool Kit (<http://www.ic50.tk/>).

4.2.7. Утишавање флуоресценције триптофана у активном месту ензима

За једињење 6 из ЛБГ серије деривата жучних киселина испитан је афинитет према ензиму 3 β ХСД-3 мерењем утишавања флуоресценције триптофана у активном месту ензима. Мерење је вршено на флуориметру Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ (Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader, Biotek, <http://www.biotek.com/>). Екситација остатака триптофана у унутрашњости ензима је вршена на таласној дужини од 290 nm, док је емисија мерена на 340 nm. Мерење је вршено на собној температури (24 °C). Реакциона запремина била је 1 ml, концентрација протеина у реакционој смеси била је 40 μ g/ml, а концентрација инхибитора 50 μ g/ml. Реакције са и без инхибитора одвијале су се у фосфатном пуферу (10 mM K₂HPO₄ + KH₂PO₄, pH 7,0, у присуству 1,5 mM NADPH, и праћена је током 30 минута.

4.2.8. Пречишћавање 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5 за кристалографске студије

Пречишћавање рекомбинантних 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5 за експерименте кристализације вршено је по врло сличном протоколу као и за испитивање ензимске активности. Индуковане бактерије су лизирание наизменичним циклусима смрзавања (-20 °C) и топлења (37 °C) у присуству 1 mg/ml лизозима. Лизат је сонификован у циљу деградације геномске ДНК и избистрен центрифугирањем 45 минута на 12 000 g на 4 °C. Супернатант добијен након центрифугирања бактеријских лизата је пропуштен кроз никал колону по протоколу описаном у потпоглављу 4.2.3. *Пречишћавање активних 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5 из бактеријског лизата* са једном разликом: током пречишћавања протеина за испитивање ензимске активности, колоном за металоафинитетну хроматографију управљано је ручно, док је за експерименте кристализације, услед доступности опреме коришћена FPLC машина (енгл. fast protein liquid chromatography, Äkta Basic, GE Healthcare, <https://www.gehealthcare.com/>) чиме је процес аутоматизован (слика 4.7). Током овог процеса детектор FPLC мерио је апсорбанцу на 280 nm и електричну проводљивост садржаја који напушта колону, што је омогућавало прецизно одређивање коцентрације и величине протеина који се сакупљају. Праћење величине протеина у садржају који излази из HisTrap колоне је корисно јер може да укаже на евентуалне процесе димеризације, агрегације или разградње рекомбинантно експримираног протеина.



Слика 4.7. Äkta Basic апарат за FPLC хроматографију.

Након металоафинитетне хроматографије, одсољавање је рађено дијализом, тако што су узорци са никал колоне у којима се налазио жељени протеин спојени и стављени у касету за дијализу (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, ThermoFisher Scientific, <https://www.thermofisher.com/> слика 4.8), а касета је остављена у хладној комори (4 °C) током 48 часова, уз мешање на магнетној мешалици. Током овог периода урађене су две замене пуфера. Запремина пуфера у којем се одвијала дијализа била је 10 l, а пуфер је садржао 10 mM K₂HPO₄ + KH₂PO₄, pH 7,0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT и 1,2 mM NADP⁺. Након дијализе садржај је из касета за дијализу сакупљен и центрифугиран 10 минута на 14 000 g на 4 °C како би се исталожили евентуални агрегати или нечистоће.

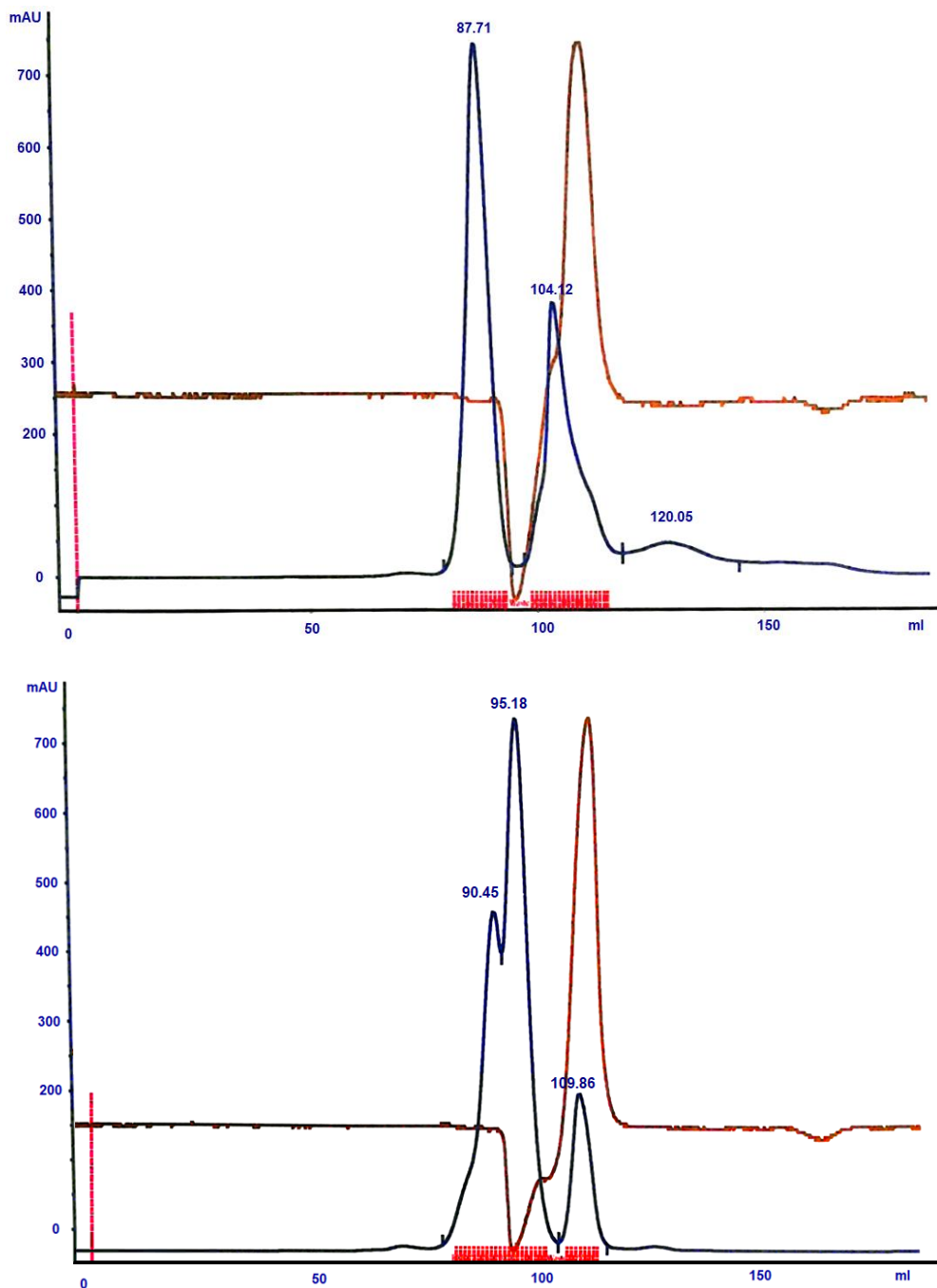


Слика 4.8. Side-A-Lyzer касете за дијализу.

Након процеса дијализе, рекомбинантно експримирани 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5 подвргнути су препаративној гел-филтрацији употребом исте FPLC машине која је коришћена за металоафинитетну хроматографију (Äkta Basic, GE Healthcare, <https://www.gehealthcare.com/>). Хроматографија је рађена на гел-филтрационој колони HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (SigmaAldrich, <https://www.sigmaaldrich.com/>). Мобилну фазу је представљао пуфер који је коришћен за дијализу (10 mM K₂HPO₄ + KH₂PO₄, pH 7,0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1,2 mM NADP⁺). Стационарну фазу чинио је декстранско-агарозни матрикс колоне. Запремина колоне била је 120 ml, а максимална запремина узорка са којом је било могуће радити током једне хроматографије била је 5 ml.

На основу хроматограма сакупљене су фракције са два врха апсорпције на 280 nm, једног на 88,33 mAu (енгл. mili absorbance units) за 3 α ХСД-3 односно 95,18 mAu за 17 β ХСД-5, и другог на 104,41 mAu за 3 α ХСД-3 односно 109,86 mAu за 17 β ХСД-5 (слика 4.9), што би значило да је у фракцијама веће молекулске масе (мање mAu) дошло до димеризације.

Концентрација и чистоћа протеина проверавани су спектроскопски и методом денатуришуће полиакриламидне гел електрофорезе, по протоколима који су описани у претходним потпоглављима.



Слика 4.9. Хроматограми препаративне гел-филтрације 3 α ХСД-3 (горе) и 17 β ХСД-5 (доле) након проласка кроз HiLoad 16/600 Superdex 200 μ g колону. На х-оси је представљен ток хроматографије (елуциони волумен), а на у-оси представљена је апсорбанца на 280 nm (плави запис) и електрична проводљивост пуфера (браон запис).

Након гел-филтрације било је неопходно концентровати добијене пречишћене протеине, што је урађено на Amicon тубицама за концентровање са *cut off* вредношћу 15–20 kDa (Millipore, <https://www.merckmillipore.com/>). Пре почетка процеса концентровања протеин је суплементиран кофактором у вишку. Концентровање је рађено сукцесивним центрифугирањима на 4 °C, при брзини од 14 000 g. Након сваког циклуса центрифугирања визуелно је проверавано да ли су видљиви агрегати у узорку, садржај тубице је измешан благим пипетирањем и проверавана је концентрација протеина помоћу нанодроп спектрофотометра. Аликвоти протеина концентрација опсега 10–50 mg/ml сачувани су на 4 °C до даље употребе. Пречишћавање протеина за експерименте протеинске кристалографије рађено је у Лабораторији за структурну биологију Института за Органску хемију и биохемију Чешке академије наука у Прагу.

4.2.9. Есеј термалног помераја за испитивање стабилности протеина

Тестирање стабилности, растворљивости и хомогености рекомбинантно експримираних 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5 у низу различитих пуфера рађено је са циљем проверавања стабилности ензима у различитим условима што је предуслов за успешну кристализацију. За ову намену рађен је есеј термалног помераја (*енгл.* thermal shift assay – thermofluor; *Ericsson u cap. 2006, Nettleship u cap. 2008*).

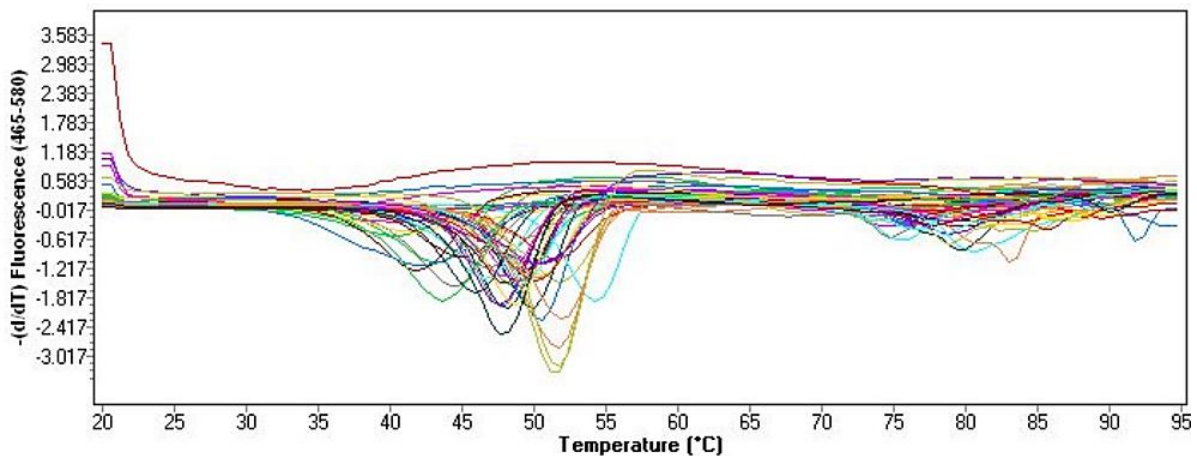
Thermofluor есеј је заснован на разликовању нативно савијеног протеина од денатурираног коришћењем флуоресцентне пробе. Флуоресценција пробе је иницијално утишана, али када се проба нађе у контакту са денатурираним протеином, везује се за откривене хидрофобне остатке из унутрашњости, при чему долази до флуоресценције. Денатурација протеина загревањем је иреверзибилан процес у коме се, ако се графички прикаже зависност степена денатурације (мерљивог преко интензитета флуоресценције пробе везане за откривену хидрофобну унутрашњост протеина) од температуре јасно издваја моменат транзиције где се налази t_m – средња тачка денатурације протеина. Испитивање се ради у машини за Real Time PCR. У сваки бунар постављају се различити пуфери, услови кристализације или адитиви за кристализацију.

Систем је постављен у микротитар плочу за Real Time PCR. У сваки бунар додато је 7,5 μ l 300 пута концентрована боје Sypro Green (Molecular Probes, ThermoFisher Scientific, <https://www.thermofisher.com/>), 12,5 μ l 2 пута концентрованог испитиваног пуфера или смеше за кристализацију и 5 μ l протеина концентрације 2,5 mg/ml. Услови који су коришћени преузети су из *Ericsson u cap. 2006*, а поред смеша из комплекта

тестирана је вода, као и пуфер у коме су пречишћавана оба протеина (10 mM K₂HPO₄ + KH₂PO₄, рН 7,0, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1,2 mM NADP⁺). Горња страна микротитар плоче је залепљена провидном фолијом. Плоче у којима се испитује стабилност 3αХСД-3 и 17βХСД-5 су постављене у машину за Real Time PCR (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, BIO-RAD, <https://www.bio-rad.com/>), и систем је у сваком циклусу загреван за 0,5 °C, почевши од 20 °C, закључно са 90 °C. Током овог процеса праћена је флуоресценција реакционих система на таласној дужини од 490 nm за ексцитацију и 575 nm за емисију. На основу добијених података за сваки пуфер конструисана је крива:

$$I = A + B - A1 + t_m - tC$$

где I представља измерен интензитет флуоресценције на температури t , t_m је температура топљења, односно средња тачка на кривој денатурације, A и B су почетни и крајњи интензитет флуоресценције, $A1$ је почетни интензитет флуоресценције слепе пробе где се уместо протеина додаје вода, а C је нагиб криве у датој тачки. Показано је да су оба протеина стабилна у већини смеша за кристализацију, као и да је састав пуфера у којима су пречишћени ензими за кристализацију одговарајући за оба ензима (слика 4.10).



Слика 4.10. Криве топљења 3αХСД-3. На x-оси представљене су температуре током циклуса а у-оса представља флуоресценцију пробе која је директно сразмерна степену денатурације протеина. Криве различитих боја представљају протеин у различитим пуферима односно преципитантима.

4.2.10. Рендгенска структурна анализа

4.2.10.1. Кристализација протеина

За кристалографске студије пречишћени су ензими 17 β ХСД-5 и 3 α ХСД-3 и концентровани сукцесивним центрифугирањем у тубицама за концентровање уз праћење концентрације на нанодроп спектрофотометру. Концентрације које су припремане за експерименте кристализације кретале су се у опсегу 10–40 mg/ml за 3 α ХСД-3, односно 10–50 mg/ml за 17 β ХСД-5. Моларна концентрација протеина (оба испитивана АКР1Ц ензима су молекулске масе 37 kDa) при овом опсегу концентрација износила је 0,27 (10 mg/ml) до 1,35 μ M (50 mg/ml). Како би се повећала стабилност ензима, у пречишћене и концентроване ензиме је додат NADP⁺ концентрације 1,2 mM, растворен у води, и испитивани лиганд, концентрације 1 mM (приближно K_m за оба ензима), растворен у ДМСО. За кристализацију апопротеинских форми прескочен је корак додавања лиганда. Након додавања кофактора и лиганда, садржај тубице је хомогенизован благим пипетирањем и центрифугиран 10 минута при брзини од 20 000 g на температури од 4 °C, да би се исталожили евентуални агрегати денатурисаног протеина или нечистоће попут прашине које би могле ометати процес кристализације. Након центрифугирања, супернатант је пребачен у нове тубице, у којима је чуван на леду док су плоче за кристализацију обележаване и пуњене резервоаром.

Пре постављања експеримената кристализације урађен је прекристализацијски тест, којим се утврђивао опсег концентрација протеина при којем је могуће очекивати кристализацију (*енгл.* Pre-Crystallization Test, PCT, Hampton Research, <https://hamptonresearch.com/>). Тест је заснован на постављању експеримената висеће капи раствора протеина са неколико различитих преципитаната, при чему се тражи концентрација протеина при којој се добија пожељна комбинација резултата у капима (бистра кап, лак преципитат, тежак аморфни преципитат, описано у упутству произвођача, табела 4.3).

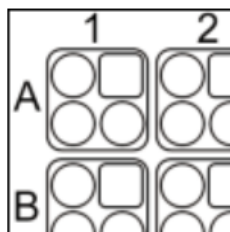
Након прекристализацијског теста, закључено је да је могуће очекивати кристализацију са 30–40 mg/ml 3 α ХСД-3, односно 30–50 mg/ml 17 β ХСД-5, па су те концентрације протеина коришћене за експерименте кристализације.

Током прекристализацијског теста, у случају да су све капи бистре препоручује се концентровање узорка, док се у случају тешких, аморфних преципитата у свим капима препоручује разблаживање узорака. Остале комбинације резултата дате су у табели 4.3.

Табела 4.3. Компонентне прекристализацијског теста (РСТ) и пожељне комбинације резултата за покушаје кристализације.

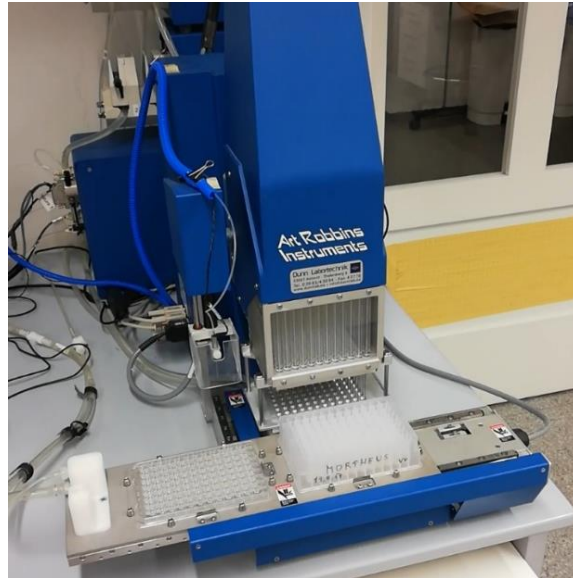
Компонента	Садржај	Комбинација налаза у капима при којој се може очекивати кристализација		
A1	0,1 М Tris-HCl, pH 8,5 2,0 М (NH ₄) ₂ SO ₄	лак		
B1	0,1 М Tris-HCl, pH 8,5 1,0 (NH ₄) ₂ SO ₄	грануларни преципитат	бросто	тежак аморфни преципитат
A2	0,1 М Tris-HCl, pH 8,5 0,2 М MgCl ₂ ·6H ₂ O 30% w/v PEG 4000	бросто	лак	лак
B2	0,1 М Tris-HCl, pH 8,5 0,2 М MgCl ₂ ·6H ₂ O 15% w/v PEG 4000		грануларни преципитат	грануларни преципитат

Експерименти кристализације постављани су помоћу робота, методом седеће капи и ручно, методом висеће капи. Сви експерименти су извођени у просторији за кристализацију, тако да се кристализација одвијала на 18 °С. За постављање експеримената кристализације помоћу робота коришћене су нископрофилне MRC микротитар плоче за кристализацију (Jena Bioscience, <https://www.jenabioscience.com/>, слика 4.11). Овакви експерименти постављани су у виду седећих капи (*енгл.* sitting drop).



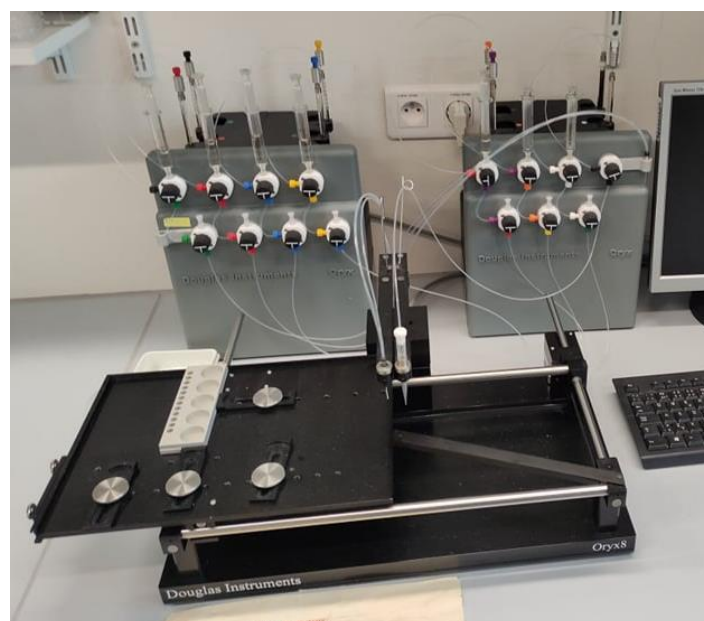
Слика 4.11. Структура MRC микротитар плоче за кристализацију (<https://www.jenabioscience.com/>). У квадратно поље Грифон додаје резервоар, из кога потом Орикс извлачи део запремине, меша са узорком протеина и распоређује у задато место на плочи (једно од округлих поља).

Речено је да код кристализације методом дифузије испаравањем имамо затворен систем седеће или viseће капи и резервоара који представља физички одвојен раствор за кристализацију у неколико редова величине већој запремини од запремине капљице. За додавање 30 μ l резервоара у сваки од за то предвиђених 96 бунара коришћен је робот Грифон (Gryphon, Art Robbins Instruments, <https://www.artrobbins.com/>, слика 4.12).



Слика 4.12. Грифон робот за кристализацију (Art Robbins Instruments).

За постављање седећих капљица коришћен је робот Орикс 8 (Oryx, Douglas Instruments, <https://www.douglas.co.uk/>, слика 4.13), који би из резервоара извлачио задату запремину раствора и мешао је са задатом запремином протеина, након чега би формирану кап нанео у за то предвиђено место MRC микротитар плоче.



Слика 4.13. Орикс 8 робот за кристализацију (Douglas Instruments).

Од услова, односно смеша различитих састава за кристализацију тестирани су неки од комерцијално доступних комплекта преципитаната: PEGs Suite I & II (Qiagen, <https://www.qiagen.com/>), JCSG+, Morpheus (Molecular Dimensions, <https://www.moleculardimensions.com/>). Компоненте ових комплекта најпре су ручно додаване у дубоку микротитар плочу (*енгл.* deep well block), а потом су такве плоче са распоређеним смешама за кристализацију стављене на Грифон заједно са MRC микротитар плочама, у које су додаване смеше за кристализацију у за њих предвиђена места. За сваки сет смеша за кристализацију постављене су капљице запремине 300 nl, и то у односима протеина и резервоара 1:1, 1:2 и 2:1. Концентрација протеина у експериментима варирана је између 30 и 50 mg/ml, како је препоручено након прекристализацијског теста. Кристализација је рађена без лиганда (апопротеинска форма), као и у присуству неколико лиганда за које је измерена најјача инхибиција активности 3 α ХСД-3, односно 17 β ХСД-5. Непосредно пре постављања седећих капи, смеша протеина, кофактора, лиганда и тромбина је центрифугирана 10 минута на 14 000 g да би се исталожили евентуални агрегати.

Тромбин је специфична протеаза која је коришћена за уклањање N-терминалног His₆ обележивача са рекомбинантног протеина и у узорак је додаван непосредно пре кристализације, у финалној концентрацији 0,1 mg/ml, да би се у постављеном експерименту одиграла *in situ* протеолиза His₆ обележивача (*Plavša u cap. 2018*).

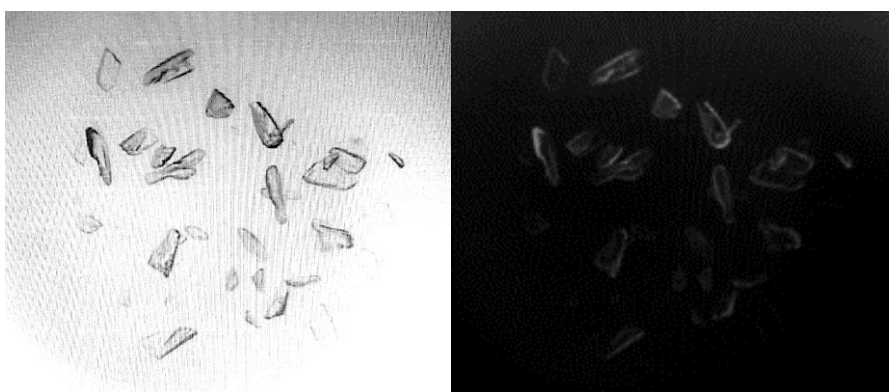
In situ протеолиза била је могућа захваљујући присуству секвенце коју препознаје тромбин на рекомбинантно експримиранм ензимима 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5 (PRGSX). Ова секвенца је саставни део вектора pET28b(+), а налази се иза N терминалног хексахистидинског обележивача. Плоче су затворене провидном фолијом и остављене у тзв. хотел за кристале на чување (Minstrel Desktop Crystal Imaging System, Rigaku, Јапан, <https://www.rigaku.com/>) на 18 °C.

Плоче које су се налазиле у хотелу за кристале прегледаване су коришћењем видљивог и ултраљубичастог светла. Аутоматско прегледање омогућава хотелски софтвер са камером. У случају проналажења кристала, позитиван сигнал је бележен за кристале протеина, а негативан за кристале соли. Ручно прегледање плоча за кристализацију рађено је на светлосном микроскопу (SZX10, Olympus, Јапан, <https://www.olympus-global.com/>). За разликовање монокристала од поликристала коришћен је филтер који поларизује светлост пре проласка кроз посматрани материјал.

За смеше у којима је кристализација 17βХСД-5 помоћу робота и комерцијално доступних сетова била успешна, као и за услове при којима су друге истраживачке групе успешно кристалисале 3αХСД-3 (*Couture и сар. 2005, Jin и сар. 2001*) постављени су експерименти кристализације методом висеће капи у плочама са 24 бунара. На дно бунара стављано је 500 μl резервоара, а на покровном стаклу помешан је резервоар са протеином у односима 1:1, 1:2 и 2:1, тако да укупна запремина капљице буде 5 μl. Тромбин је додаван у финалној концентрацији 0,1 mg/ml у смешу протеина, кофактора и лиганда непосредно пре постављања висећих капи.

4.2.10.2. Снимање дифракционе слике за добијене кристале

Кристали који су добијени у експериментима протеинске кристалографије подвргнути су тестовима да би се добио одговор на питања да ли су добијени кристали протеински, да ли су у питању монокристали и да ли x-зраци дифрактују при проласку кроз кристале. Помоћу ултраљубичастог филтера у хотелу за кристале (слика 4.14) било је могуће разликовати протеинске кристале од кристала соли, с обзиром на то да су само протеински кристали давали позитиван сигнал који настаје услед интеракције светлосних зрака из ултраљубичастог дела спектра са остацима ароматичних аминокиселина у протеину. Монокристали су детектовани помоћу поларизационог филтера за светлосни микроскоп, пошто такви кристали преламају светлост на исти начин, тако да су били исто обојени под поларизационим филтером за разлику од поликристала који су били шарени под поларизационим објективом.



Слика 4.14. Протеински кристали под видљивом и УВ светлошћу микроскопа.

Фолија на плочама за кристализацију је изрезана и из бунара су под микроскопом упецани кристали најлонским петљама одговарајуће величине. Кристали који су израсли у смешама за кристализацију који не припадају Morpheus комплекту пре складиштења су

потопани у преципитант са криопротектантом (20% глицерол) који је пипетиран у околин у бунара у запремини од неколико микролитара, док код кристала који су се појавили коришћењем неке од смеша из *Morpheus* комплекта овај корак није био неопходан јер овај комплет у свакој смеси садржи криопротектант.

Кристали су брзо смрзнути течним азотом и ускладиштени у вијалима у контејнерима са течним азотом до снимања дифракције. Квалитет дифракције кристала тестиран је на дифрактометру Лабораторије за структурну биологију у Прагу (слика 4.15).

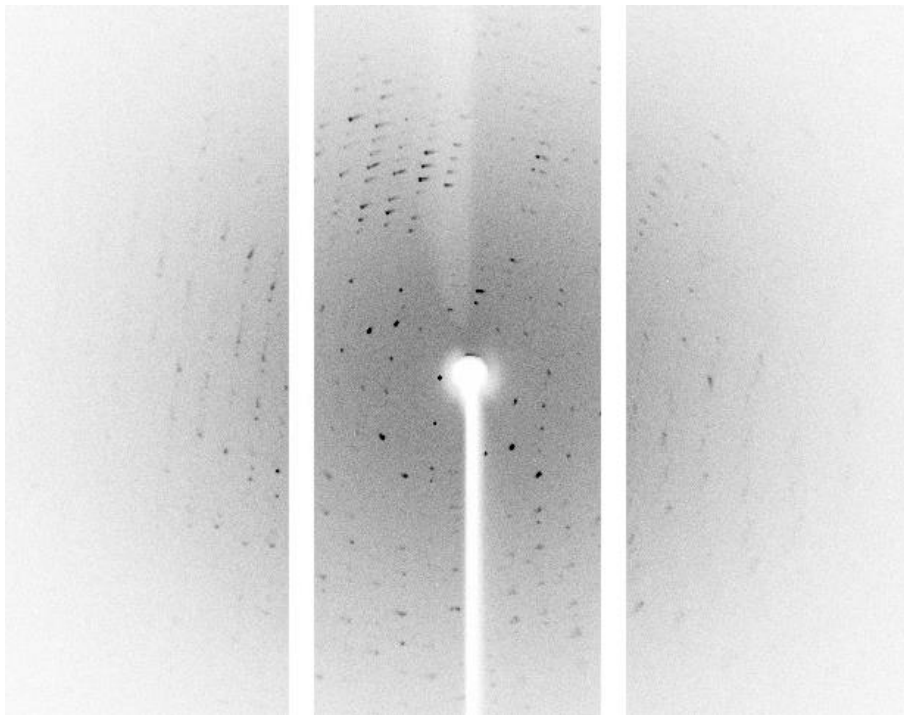


Слика 4.15. Кристал 3 α ХСД-3 постављен на гониометар дифрактометра.

Уређај се састоји од извора х-зрака MicroMax-007 HF Microfocus и VariMax VHF ArcSec конфокалног оптичког система (Rigaku, Јапан, <https://www.rigaku.com/>). Температура кристала одржава се на $-173,15^{\circ}\text{C}$ (100 K) помоћу система за хлађење Cryostream 800 (Oxford Cryosystems, Велика Британија, <https://www.oxcryo.com/>). Коришћен је AFC11 partial- χ гониометар са 4 осе (Rigaku, Јапан, <https://www.rigaku.com/>) и детектор Pilatus 300K (Dectris, Швајцарска, <https://www.dectris.com/>).

Помоћу овог дифрактометра за сваки кристал утврђивано да ли постоји дифракција, да ли је она пореклом од протеина, која резолуција се може очекивати приликом снимања дифракционе слике и да ли постоје проблеми у дифракцији, као што је мозаичност или тзв. *twinning* (појам се односи на два или више кристала који расту слепљени тако да деле један заједнички део кристалне решетке, што омета снимање дифракционе слике).

Кристали су из течног азота пренети на дифрактометар, где их систем за хлађење држи у смрзнутом стању, и након снимања враћени у течни азот где су чувани до снимања на синхротрону. Сарадници из Прага су на синхротрону BESSY II у Берлину (*Gerlach и сар. 2016*) снимили комплетну дифракциону слику (слика 4.16) за кристале који су показали дифракцију на Институту. Дифракционе слике обрађене су помоћу XDS софтвера, тако да је тачкама дифракције приписан интензитет и позиција, одређена је и максимална резолуција дифракционе мапе и просторна група кристала, као и димензије елементарне ћелије кристалне решетке (*Kabch, 2010*). Дифракциона слика представља структуру кристала у инверзном простору и помоћу Фуријеових трансформација пресликава се у реални простор. За сваки кристал добијен је .mtz фајл, на основу којег је креирана мапа електронских густина након решавања фазног проблема.



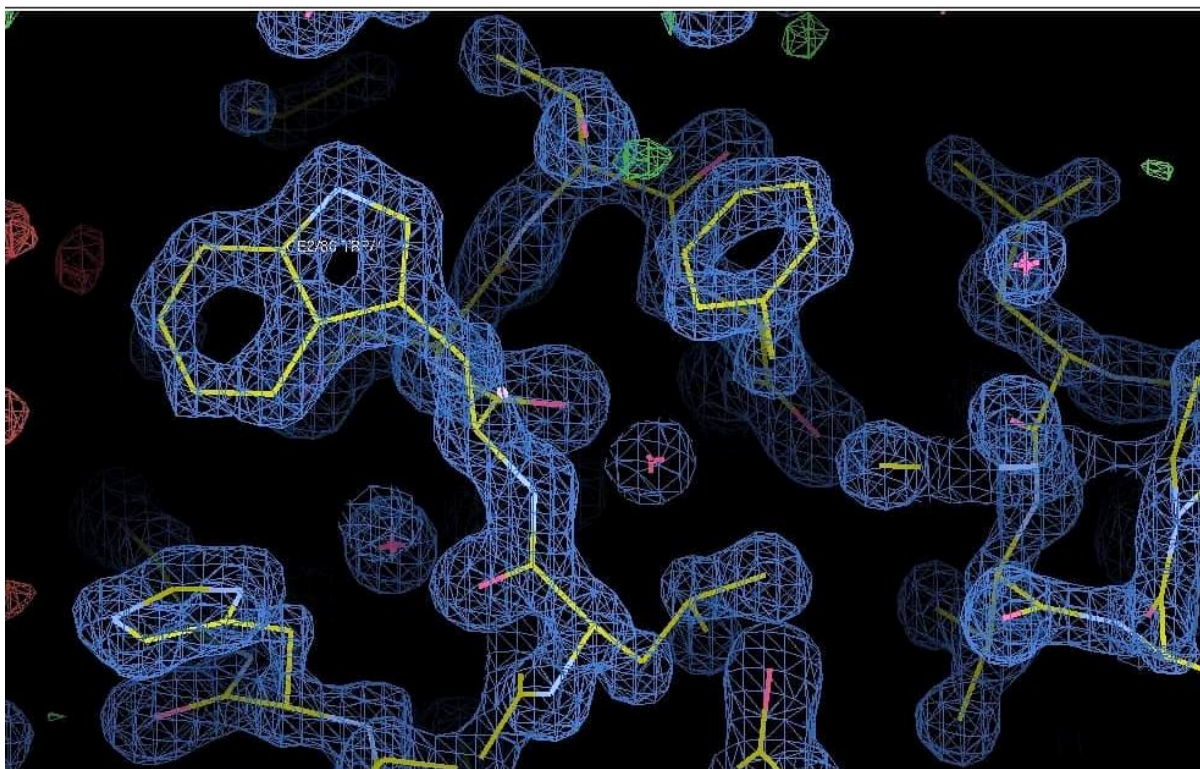
Слика 4.16. Дифракциона слика након снимања кристала 17βХСД5 у тернарном комплексу са кофактором NADP⁺ и инхибитором ДС7.

4.2.10.3. Одређивање структуре добијених кристала

Добијени .mtz фајл коришћен је за решавање структуре помоћу програмског пакета CCP4i (*Project 1994, Evans 2014*). Најпре је помоћу програма Phaser (*McCoу и сар. 2007*) методом молекулске замене добијен иницијални модел за израчунавање почетних фаза протеина. За молекулску замену коришћена је структура 17βХСД-5 која је у ПДБ бази сачувана под приступним кодом 1ZQ5 (*Qiu и сар. 2005*) у комбинацији са .mtz фајлом добијеним након снимања дифракције нашег кристала. Као резултат молекулске замене

добијен је .pdb фајл. Овај .pdb фајл је утачњаван до стабилизације R фактора и R-free вредности кроз неколико итерација у програму Refmac5 (Steiner *u cap.* 2003, Murshudov *u cap.* 2011). На крају сваког циклуса је добијен је нови .pdb фајл и побољшане фазе, који су комбиновани са почетним .mtz фајлом за следећи циклус утачњавања.

За структуру 17βХСД-5 у комплексу са једињењем ДС7 било је потребно смањити резолуцију да би се повећала комплетност модела, па је резолуција смањена са 1,1 Å на 1,4 Å. Након стабилизације R фактора, приступило се визуелној провери и ручном утачњавању добијеног модела у реалном простору, тако да се добијени модел максимално уклапа у експериментално утврђену мапу електронских густина (слика 4.17). У овом кораку је додат и лиганд, док је кофактор преузет из библиотеке током молекулске замене. За прегледање и ручно утачњавање модела добијеног у претходним корацима, као и за минимизацију енергије, коришћен је програмски пакет Coot (Emsley *u cap.* 2010). Поправљање је вршено према $2Fo-Fc$ мапи, која представља комбинацију посматраних података добијених у експерименту снимања дифракционе слике, Fo , са најновијим атомским моделом, Fc , након датог циклуса утачњавања.



Слика 4.17. Исечак из $2Fo-Fc$ мапе електронских густина 17βХСД-5 у комплексу са лигандом ДС7.

4.2.11. Молекулски докинг

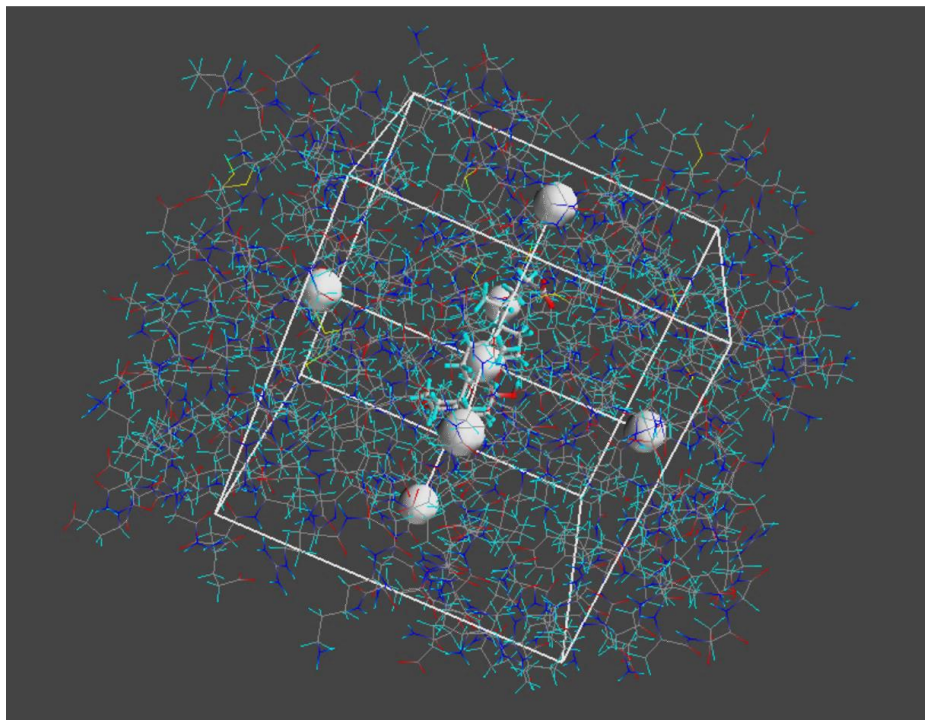
Метода молекулског докинга је *in silico* метода за предвиђање протеин-лиганд и протеин-протеин интеракција. Као резултат молекулског докинга добија се низ најповољнијих оријентација лиганда у протеин-лиганд комплексу, а предвиђа се и афинитет или енергија везивања за сваку оријентацију (*Lengauer u Rarey 1996*).

Као полазна тачка за молекулски докинг коришћена је кристална структура 3 α ХСД-3 у комплексу са кофактором NADP⁺ и урсодеоксихолатом као лигандом (приступни код у ПДБ бази: 1НН1, *Jin u cap. 2001*), а за докинг 17 β ХСД-5 коришћена је структура ензима у комплексу са кофактором NADP⁺ и стероидним инхибитором ЕМ1404 као лигандом (приступни код у ПДБ бази: 1ZQ5, *Qiu u cap. 2005*). За сваки протеин, који се у молекулском докингу означава као рецептор, одабран је по један ланац из димера (први у секвенци, у .pdb фајлу означен као ланац А), уклоњени су сви молекули воде, као и сви лиганди и мали молекули осим кофактора. Овакав протеин је помоћу скрипте „receptor.c“ у оквиру програма VegaZZ (*Pedretti u cap. 2003*) припремљен за докинг тако што су му додељени атоми водоника и Gasteiger-ова парцијална наелектрисања. Овакав молекул сачуван је у .pdbqt формату за симулације молекулског докинга.

Лиганди су креирани помоћу програма Avogadro 1.1.1. (*Hanwell u cap. 2012*). Геометрија лиганада утачњавана је у пољу силе МММФ96s, у 4 корака минимизације по циклусу, при алгоритму минимизације који омогућава најстрмији пад енергије (*енгл. steepest descent*). Детаљније утачњавање геометрије лиганада рађено је полуемпиријски квантномеханички помоћу програма Gaussian 08 (*Frisch u cap. 2016*), на нивоу теорије В3LY5, са основом 6-31G(d). Након утачњавања, помоћу скрипте „ligand.c“ која постоји у оквиру Vega ZZ додељена су Gasteiger-ова парцијална наелектрисања и лиганди су сачувани у .pdbqt формату.

Мапа решетке (*енгл. grid map*, слика 4.18) међу различитим типовима атома рецептора и лиганада за сваки рецептор израчуната је помоћу софтвера AutoGrid4 у оквиру AutoDockTools (*Cosconati u cap. 2011, Morris u cap. 2009*). На основу координата рецептора одређене су димензије најмање могуће коцке у коју у потпуности може да се смести испитивани протеин (*енгл. max grid*).

Размак између чворова решетке у оквиру мапе (*енгл.* grid spacing) износио је 0,375 Å. Мапе за лиганде су рачунате заједно са електростатичким и десолватационим потенцијалом уз вредност диелектричне константе -0,1465.



Слика 4.18. Подешавање решетке за AutoGrid у оквиру PyRx интерфејса, рецептор 3аХСД-3 под приступним кодом у ПДБ бази 1НН1 (*Jin u cap. 2001*).

Почетна позиција лиганда, оријентација и диедарна одступања били су насумични. Број степени слободе (број веза око којих је могућа ротација) за сваки лиганд одређен је током фазе припреме лиганда.

За молекулски докинг коришћен је Ламарков генетички алгоритам (*Morris u cap. 1998, Morris u cap. 2009*). Максималан број процена енергија био је 2 500 000, а број јединки популације за Ламарков генетички алгоритам био је 150. За свако једињење извршено је 50 хибридних симулација, и толико је добијено потенцијалних оријентација лиганада, са проценама енергија везивања за сваку оријентацију [kCal/mol]. Резултати су анализирани поређењем добијених процењених енергија везивања, као и визуелном провером помоћу програма PyMol (*The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC*). Излазни формат симулација био је .dlg, тако да је било неопходно превести добијене резултате у .pdb, што је учињено преко скрипте „dlg_to_pdb_multimodel.c“ у оквиру програмског пакета VegaZZ.

Симулације за AutoGrid и AutoDock су рађене даљински, помоћу сервера Националног института за биомедицинска израчунавања (енгл. National Biomedical Computational Resource – NBCR) (Ren *u cap.* 2010, Li *u cap.* 2006) уз помоћ софтвера PyRx (Dallakyan *u Olson* 2015). За сваки рецептор рађен је контролни докинг, где је у симулацији коришћен оригинални лиганд из кристалне структуре која је коришћена (урсодеоксихолат у случају 3 α ХСД-3, односно ЕМ1404 у случају 17 β ХСД-5). Докинг би се сматрао успешним ако би након контролног докинга већина добијених оријентација одговарала оријентацији која је уочена у кристалној структури, уз разумне предвиђене енергије везивања. Као резултат молекулског докинга за свако једињење добијене су процењене енергије везивања [kCal/mol] и оријентације лиганда на основу којих је било могуће предвидети интеракције које се остварују између атома рецептора и лиганда.

4.2.12. Молекулска динамика

Молекулска динамика је *in silico* метода која омогућава праћење еволуције молекулских система током времена на основу полумпиријских квантномеханичких израчунавања, која се извршавају за сваки атом система. Коришћењем ове методе могуће је испитати стабилност и пратити понашање макромолекулског комплекса у току времена у одређеном окружењу или уз примену спољашњих сила. У овој дисертацији праћена је динамика тернарног комплекса протеин-кофактор-лиганд са 3 α ХСД-3, NADP⁺ и једињењем ЉГ6, као једним од најјачих и најспецифичнијих инхибитора из библиотеке деривата жучних киселина.

У првом кораку припремљен је комплекс протеина са кофактором и лигандом у .pdb и .psf (енгл. protein structure file) форматима. Почело се од структуре која је у ПДБ бази депонована под приступним кодом 1НН1 (Jin *u cap.* 2001) и представља структуру хумане 3 α ХСД-3 у комплексу са NADP⁺ и урсодеоксихолатом. Из модела су уклоњени сви хетероатоми осим кофактора, и модел је брисањем једног ланца сведен на мономер. Координате лиганда ЉГ6 узете су из симулација молекулског докинга, при чему је одабрана конформација лиганда са најјачим процењеним афинитетом везивања. Између лиганда, кофактора и аминокиселинских остатака у активном месту ензима није било стерних сметњи, а лиганд ЉГ6 ушао је у активно место ензима слично као урсодеосихолат у кристалној структури, тако да су протеин са кофактором и лиганд сједињени у један .pdb фајл.

За добијање структурног фајла протеина (.psf) коришћен је VMD програмски пакет (*Humphrey u cap. 1996*). Структурни фајл садржи податке о везама, угловима и просторним угловима за сваки атом или групу атома у молекулу. Да би се добио .psf фајл било је потребно обезбедити податке о топологији за протеин, лиганд и кофактор. Тополошки фајлови, у којима су садржани подаци о могућим везама између атома за протеин (*Huang u cap. 2016*) и кофактор (*Vanommeslaeghe u cap. 2010*) доступни су на сајту CHARMM++ поља силе (http://mackerell.umaryland.edu/charmm_ff.shtml; *Brooks u cap. 2009*), које је коришћено у овој симулацији. Да би креирање структурног фајла било успешно укључени су и тополошки фајлови за воду и нуклеинске киселине (*Foloppe u MacKerell Jr. 2000*). Тополошки подаци за лиганд добијени су преко SwissParam сервера (<https://www.swissparam.ch/>, *Zoete u cap. 2011*) у оквиру шведског института за биоинформатику на основу структуре лиганда, која је за потребе сервера приказана у .mol2 формату. Структурни фајл добијен је коришћењем скрипте psfgen.tcl, која је модификована из Hsin и cap. (2008) да би одговарала нашем моделу:

```
# kreiranje strukturnog fajla za kompleks 3ahsd-3 NADP+ LjG6
package require psfgen
topology top_all36_prot.rtf
topology top_all36_na.rtf
topology toppar_all36_na_nad_ppi.str
topology toppar_water_ions.str
topology ljg6.rtf
mol new large_cube.psf
mol addfile large_cube.pdb
readpsf large_cube.psf
coordpdb large_cube.pdb
```

За симулацију молекулске динамике било је потребно *in silico* симулирати услове који веродостојно описују систем када је молекул протеина уроњен у сферу ТПЗР молекула воде. Првобитно је од ТПЗР молекула воде формирана коцка, која је била најмањих могућих димензија при којима је задовољен услов да је цео протеин окружен молекулима воде. Коцка је ротирана и из ње је исечена сфера у коју је уписан протеин. Пречник сфере је најмањи могући при којем сфера још увек може у потпуности да окружи протеин. Ово „молекулско урањање” је учињено помоћу VMD програмског пакета, коришћењем скрипте wat_sphere.tcl која је прилагођена из Hsin и cap. (2008) за потребе нашег експеримента:

```

# Ucitaj .pdb i .psf fajlove
set molname lihiapo_LJG6_a
mol new ${molname}.psf
mol addfile ${molname}.pdb
# Odredi koordinate centra mase proteina
set cen [measure center [atomselect top all] weight mass]
set x1 [lindex $cen 0]
set y1 [lindex $cen 1]
set z1 [lindex $cen 2]
set max 0
# Odredi najvece rastojanje atoma iz proteina od centra mase
foreach atom [[atomselect top all] get index] {
  set pos [lindex [[atomselect top "index $atom"] get {x y z}]
0]
  set x2 [lindex $pos 0]
  set y2 [lindex $pos 1]
  set z2 [lindex $pos 2]
  set dist [expr pow(($x2-$x1)*($x2-$x1) + ($y2-$y1)*($y2-$y1)
+ ($z2-$z1)*($z2-$z1),0.5)]
  if {$dist > $max} {set max $dist}
}
mol delete top
# Okruzi protein kockom od 25A vode
package require solvate
solvate ${molname}.psf ${molname}.pdb -t 25 -o large_cube
resetpsf
# Napravi novi .psf i .pdb proteina okruzenog vodom
package require psfgen
topology top_all36_prot.rtf
topology top_all36_na.rtf
topology toppar_all36_na_nad_ppi.str
topology toppar_water_ions.str
topology ljg6.rtf
mol new large_cube.psf
mol addfile large_cube.pdb
readpsf large_cube.psf
coordpdb large_cube.pdb
# Obrisi suvisne molekule vode
set wat [atomselect top "same residue as {water and ((x-$x1)*(x-
$x1) + (y-$y1)*(y-$y1) + (z-$z1)*(z-$z1))<($max*$max)}"]
set del [atomselect top "water and not same residue as {water
and ((x-$x1)*(x-$x1) + (y-$y1)*(y-$y1) + (z-$z1)*(z-
$z1))<($max*$max)}"]
set seg [$del get segid]

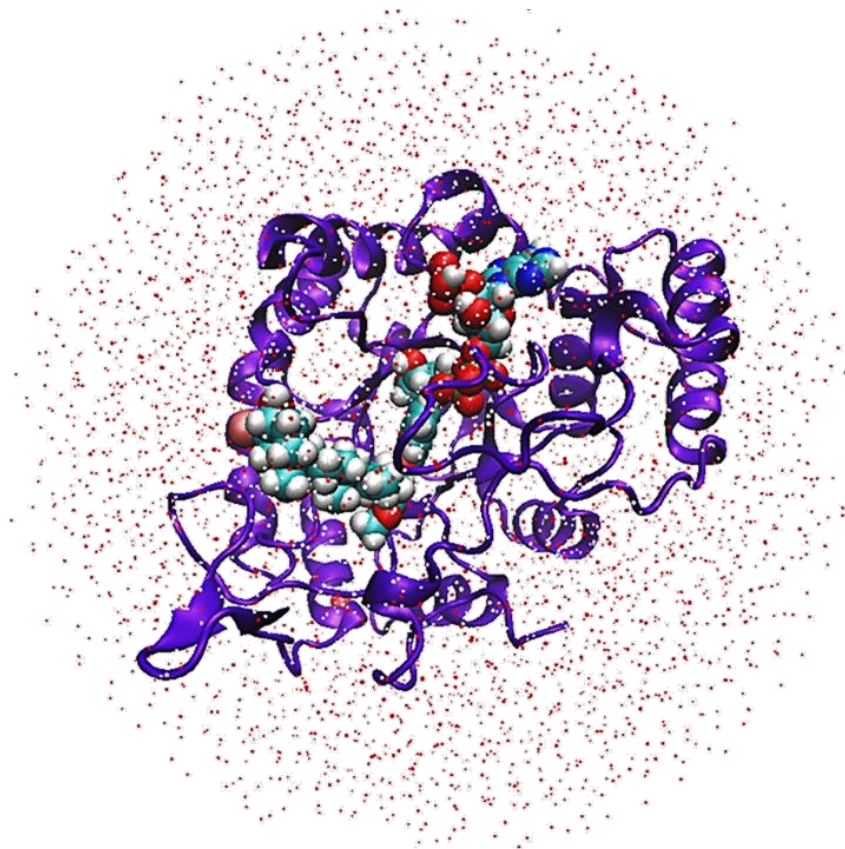
```

```

set res [$del get resid]
set name [$del get name]
for {set i 0} {$i < [llength $seg]} {incr i} {
  delatom [lindex $seg $i] [lindex $res $i] [lindex $name $i]
}
writepsf ${molname}_ws.psf
writepdb ${molname}_ws.pdb
mol delete top
mol new ${molname}_ws.psf
mol addfile ${molname}_ws.pdb
# Napiši centar mase i prečnik sfere, trebace za simulaciju
puts "CENTER OF MASS OF SPHERE IS: [measure center [atomselect
top all] weight mass]"
puts "RADIUS OF SPHERE IS: $max"
mol delete top

```

Након урањања у сферу воде (слика 4.19), комплекс је визуелно проверен коришћењем софтвера VMD и PyMOL да би се утврдило да током процеса урањања није дошло до нарушавања структуре. Овако припремљен тернарни комплекс протеина, кофактора и инхибитора био је спреман за симулацију молекулске динамике.



Слика 4.19. Молекул протеина 3aXSD-3 окружен сфером воде у VMD софтверу. Љубичастом бојом представљен је основни ланац полипептида, а плавим Ван дер Валсовим сферама су приказани лиганд и кофактор. Молекули воде су представљени црвено-белим тачкама.

Симулација молекулске динамике вршена је помоћу NAMD софтвера (*Phillips u cap. 2005*), коришћењем CHARMM++ поља силе (*Brooks u cap. 2009*). За симулацију молекулске динамике било је неопходно обезбедити параметре за сваки атом односно групу атома. На основу параметарских фајлова одређиване су силе и енергије за сваки атом. Параметри за атоме протеина, молекула воде и кофактора били су доступни на сајту CHARMM++, док су параметри за лиганд добијени помоћу SwissParam сервера, заједно са тополошким фајловима на основу структуре лиганда у .mol2 формату.

Да би се испитала функционалност система, најпре је тестирана симулација молекулске динамике комплекса 3 α ХСД-3 – NADP⁺ – ЉГ6 у кратком интервалу (0,1 ns). Када је утврђено да симулација ради без сметњи, приступило се симулацији од 20 ns, која је урађена на серверу Департмана за математику и информатику, на Аxiom кластеру Лабораторије за развој информационих система.

Симулација је вршена на температури од 310 K, у NVT систему (број атома, запремина система и температура били константни током трајања симулације). Симулација је обухватала 1000 корака минимизације и 200 000 корака еквилибрације, при чему је трајање једног временског корака било 1 fs, тако да је укупно трајање симулације било 20 ns. Након симулације анализиране су RMSD (*енгл. root mean square deviation*) и RMSF (*енгл. root mean square fluctuation*) вредности, које су израчунате из трајекторије симулације (.dcd). Симулација је прегледана и визуелно, помоћу софтвера VMD и РуMOL. Након симулације добијен је излазни .log фајл, који је коришћен за анализу промене енергија система током трајања симулације. Анализе трајекторије и излазних фајлова рађене су помоћу R програмског језика и Rstudio окружења (*R Core Team, 2017*). За анализу трајекторије су коришћењем VMD програмског пакета отворени .psf и .dcd фајлови, да би се направио нови .dcd, фајл који је садржао сваки десети корак и на тај начин је добијен мањи фајл. Овај фајл могао је да се учита на просечном рачунару са 32 GB RAM меморије и као такав био је подобан за анализу у окружењу R Studio. Скрипта за добијање RMSD и RMSF прилагођена је за потребе испитиваног комплекса из пакета Bio3d у оквиру програмског језика R (*Grant u cap. 2021*).

```
# ucitaj potrebne biblioteke za rad
library("bio3d", lib.loc=~R/win-library/3.3")
library("bigmemory", lib.loc=~R/win-library/3.3")
```

```

# ucitaj dcd i pdb i definisi varijable
dcdfile <- "3ahsd_ljg6_20ns.dcd"
pdbfile <- "3ahsd_ljg6_20ns.pdb"
dcd <- read.dcd(dcdfile)
pdb <- read.pdb(pdbfile)
# poravnaj frejmove po CA
ca.inds <- atom.select(pdb, eley="CA")
xyz <- fit.xyz(fixed=pdb$xyz, mobile=dcd,
              fixed.inds=ca.inds$xyz,
              mobile.inds=ca.inds$xyz)
# izracunaj RMSD i RMSF
rd <- rmsd(xyz[1,ca.inds$xyz], xyz[,ca.inds$xyz])
rf <- rmsf(xyz[,ca.inds$xyz])
plot(rd, typ="l", ylab="RMSD", xlab="Frame No.")
points(lowess(rd), typ="l", col="red", lty=2, lwd=2)

```

Промена потенцијалне енергије система током симулације рачуната је скриптом која је такође преузета из Bio3d пакета и прилагођена за испитиван систем (*Grant u cap. 2021*):

```

# ucitaj izlazni fajl nakon simulacije
a <- readLines("3ahsd_ljg6_20ns.log")
# izdvoj redove koji definisu vrednosti energije sistema
grep("ENERGY:  ", a,value=TRUE)
# napisi fajl koji sadrzi samo informacije o energiji sistema
fileConn<-file("3ahsd_ljg6_20ns_energije.txt")
writeLines(c(grep("ENERGY:  ", a,value=TRUE)), fileConn)
close(fileConn)
# importuj kao data frejm novi fajl
view(3ahsd_ljg6_20ns_energije)
# za svaki vid energije konstruisi grafik u zavisnosti od vremena
timestep=energije$V2
ukupna_energija=energije$V12
plot(timestep,ukupna_energija,xlab="vreme_simulacije
[ps]",ylab="E[kcal/mol]",col="red")

```


5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

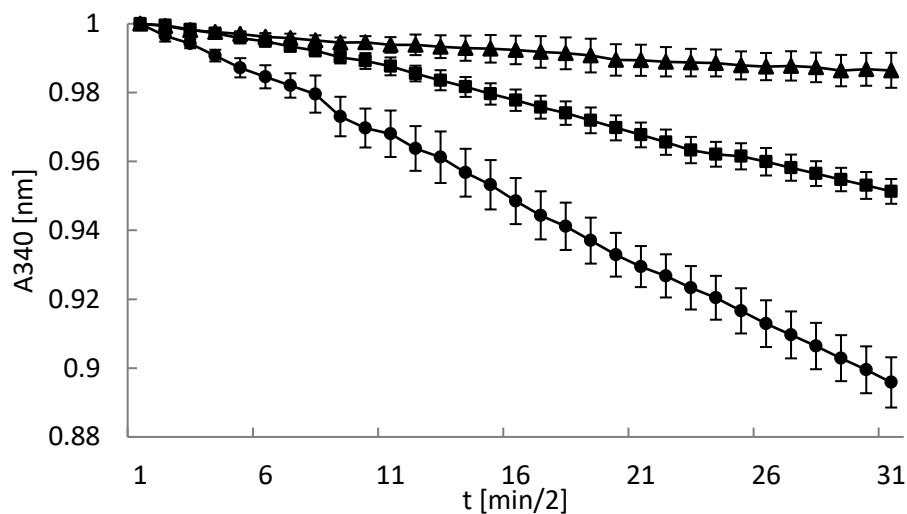
5.1. Ензимска активност хетерологно експримиране 3 α ХСД-3

За потребе *in vitro* експерименталног дела ове дисертације експримирана је хумана рекомбинантна 3 α ХСД-3, која се налазила у центру истраживања, као и сродна хидроксистероид дехидрогеназа из потпородице АКР1Ц, 17 β ХСД-5, која је експримирана ради утврђивања специфичности инхибиције. Оба ензима су експримирана у систему бактерија *E. coli* соја BL21(DE3) трансформисаних плазмидима рЕТ28(b)+, који су садржали гене за 3 α ХСД-3 односно 17 β ХСД-5. Експресија рекомбинантних ензима одвијала се 6 часова на 37 °С, након индукције додатком IPTG. Бактерије су потом лизирани и методама металоафинитетне и гел-филтрационе хроматографије изолован је пречишћен ензим, чија је концентрација одређивана методом по Брадфорду, а чистоћа проверавана полиакриламидном гел електрофорезом у денатуришућим условима (SDS-PAGE). Добијени су ензими задовољавајућег приноса и чистоће (детаљније описано у потпоглављу 4.2.1 *Експресија рекомбинантних 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5 у E. coli*). Пре почетка испитивања утицаја једињења из библиотеке деривата жучних киселина на активност изолованих ензима било је неопходно проверити њихову ензимску активност.

5.1.1. Провера активности хетерологно експримиране 3 α ХСД-3

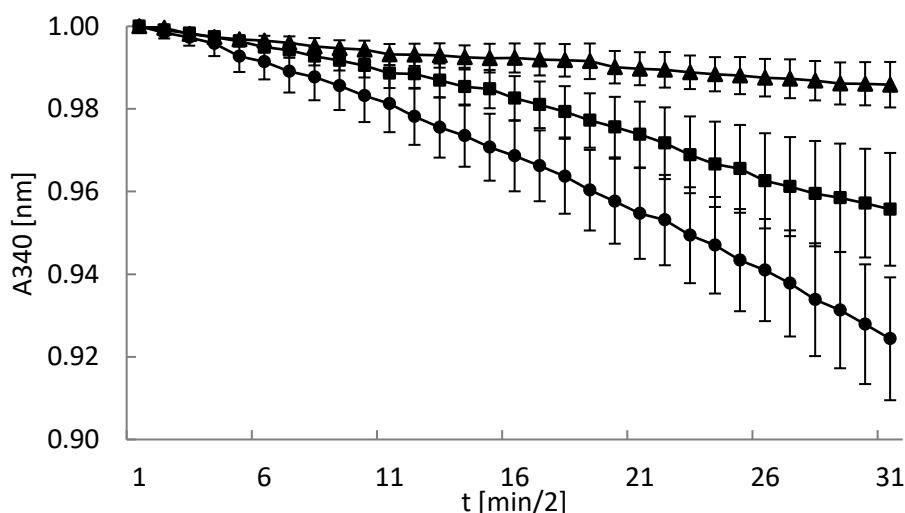
У циљу провере активности пречишћених ензима, као и функционалности ензимског есеја прилагођеног из Möller и сар. (2009), Velić и сар (2009) и Schuster и сар. (2011) приступило се тестирању активности рекомбинантних пречишћених 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5. Реакције су се одвијале по протоколу који је детаљно описан у потпоглављу 2.8.2. *Праћење ензимске активности АКР мерењем потрошње NADPH*. За израчунавања активности коришћен је нагиб праве чија је једначина најверодостојније описивала линеарни део реакције (првих 12 минута). Као негативна контрола (слепа проба) уместо ензима, у бунаре микротитар плоче додавана је једнака запремина пуфера. Као контролни инхибитор коришћен је ибупрофен концентрације 20 μ М. Ибупрофен је растворен у ДМСО, тако да је у пробе без инхибитора додаван ДМСО у истој запремини.

Резултати испитивања ензимске активности хетерологно експримираних 3α ХСД-3 и 17β ХСД-5 приказани су на сликама 5.1 и 5.2.



Слика 5.1. Активност ензима 3α ХСД-3, представљена као зависност апсорбанце кофактора NADPH на 340 nm од времена. Троугловима је обележена слепа проба. Круговима је обележена ензимска реакција. Квадратима је обележена реакција са 20 μ M ибупрофена. Свака проба је изведена у трипликату у два независна огледа, чији су резултати били конзистентни, тако да је приказана средња вредност \pm стандардна девијација из три понављања за сваку реакциону смешу.

Реакционе криве 3α ХСД-3 и 17β ХСД-5 у присуству и одсуству инхибитора (ибупрофена) биле су готово подударне, што је и очекивано, имајући о виду да се ради о врло сродним ензимима и инхибитору који је заједнички за целу суперфамилију АКР. Инхибиција ибупрофеном концентрације 20 μ M за оба ензима износила је око 50%.



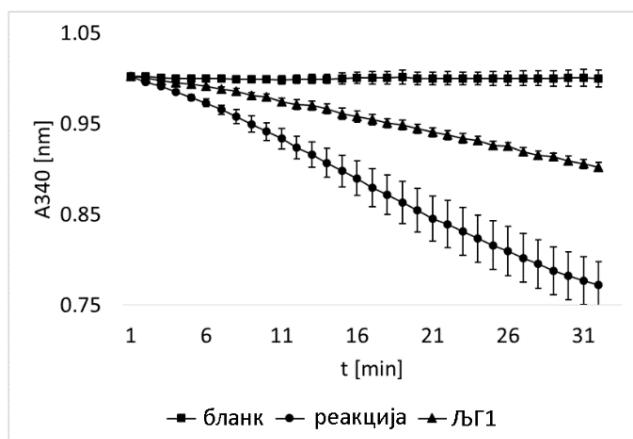
Слика 5.2. Активност ензима 17β ХСД-5, представљена као зависност апсорбанце кофактора NADPH на 340 nm од времена. Троугловима је обележена слепа проба. Круговима је обележена ензимска реакција. Квадратима је обележена реакција са 20 μ M ибупрофена. Свака проба је изведена у трипликату у два независна огледа, чији су резултати били конзистентни, тако да је приказана средња вредност \pm стандардна девијација из три понављања за сваку реакциону смешу.

5.1.2. Инхибиција 3 α ХСД-3 дериватима жучних киселина

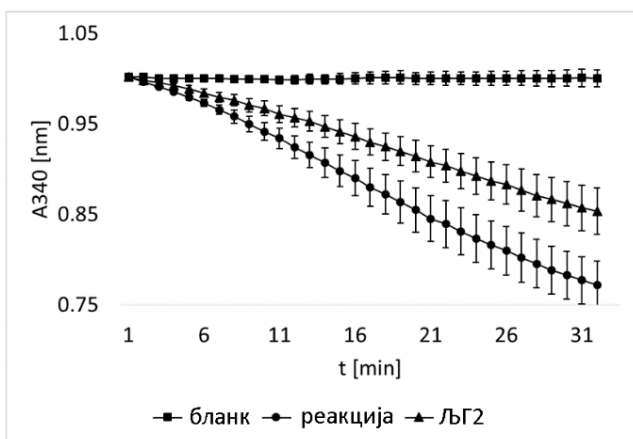
Иницијална потрага за инхибиторима 3 α ХСД-3, међу једињењима из библиотеке деривата жучних киселина рађена је на идентичан начин као што је описано у претходном потпоглављу, с тим да је у пробе уместо 20 μ М ибупрофена додавано 40 μ М испитиваног једињења. Реакције су отпочињане додатком ензима, а инхибитор је додаван у смешу пуфера, супстрата и кофактора, тако да није било корака прединкубације ензима са инхибитором. Резултати су груписани у класе једињења, именоване према иницијалима аутора: ЉГ, ДС и СБ.

Једињења ЉГ серије представљају деривате холне, литохолне и деоксихолне киселине, које су подвргаване процесима естерификације метанолом и хексан-1,6-диолом, ацетилације, оксидације и адиције брома. Током синтезе, неке функционалне групе су елиминисане или хидролизоване, да би се добила једињења чије су структуре приказане у одељку 4.1.3. *Тестирана једињења (Grbović u sar. 2019).*

У ЉГ серији, према прелиминарном тесту (слика 5.3), највећи потенцијал за инхибицију 3 α ХСД-3 показала су једињења 6 и 10. Јачина и специфичност инхибиције испитани су мерењем IC₅₀ вредности и тестирањем инхибиције структурно и функционално сродног ензима 17 β ХСД-5. Структурна основа инхибиције 3 α ХСД-3 једињењима 6 и 10 из ЉГ серије проучавана је на основу модела добијених молекулским докингом. Ови резултати биће приказани у наредним потпоглављима. Вредно је поменути и једињења 1, 8 и 9, која су показала нешто слабију инхибицију у односу на једињења 6 и 10, али их треба имати у виду при будућем дизајну једињења изведених из ЉГ серије, као и при тестирању активности других АКР1Ц ензима.



ЉГ1
нагиб = -0,0067
инхибиција = 57,9%
 $R^2 = 99,06$

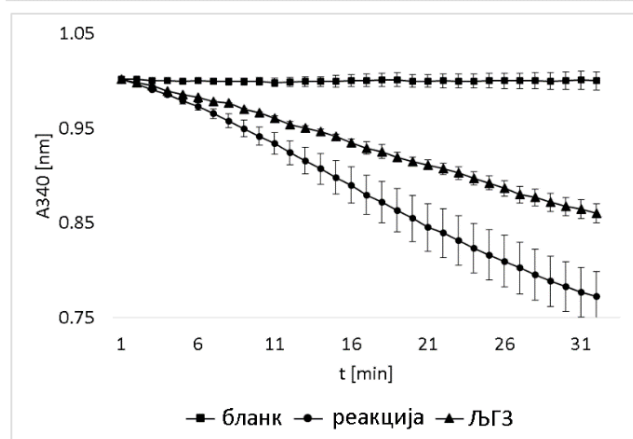


ЛБ2

нагиб = -0,0100

инхибиција = 36,3%

$R^2 = 99,8$

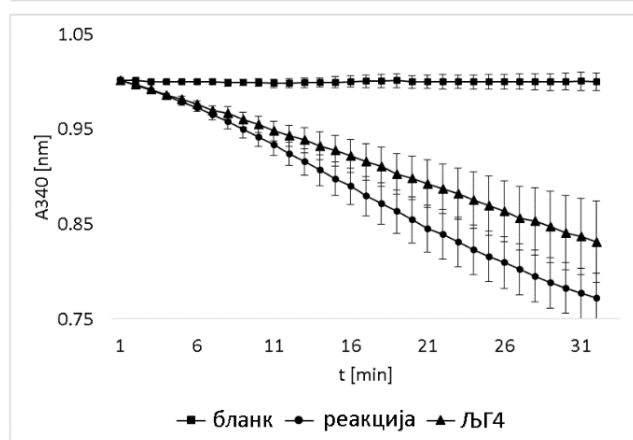


ЛБ3

нагиб = -0,0095

инхибиција = 39,9%

$R^2 = 99,56$

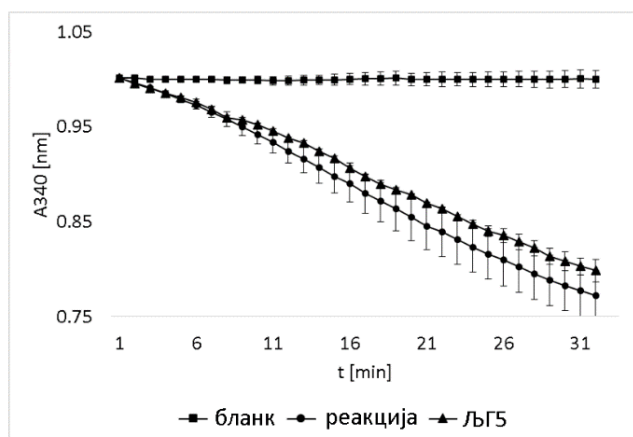


ЛБ4

нагиб = -0,0111

инхибиција = 29,16%

$R^2 = 99,85$

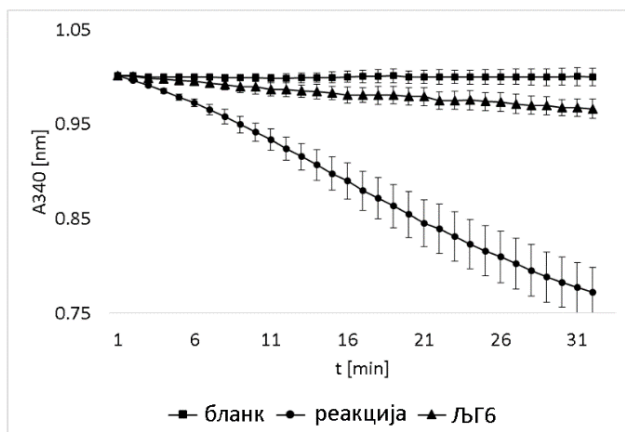


ЛБ5

нагиб = -0,0134

инхибиција = 12,83%

$R^2 = 99,73$

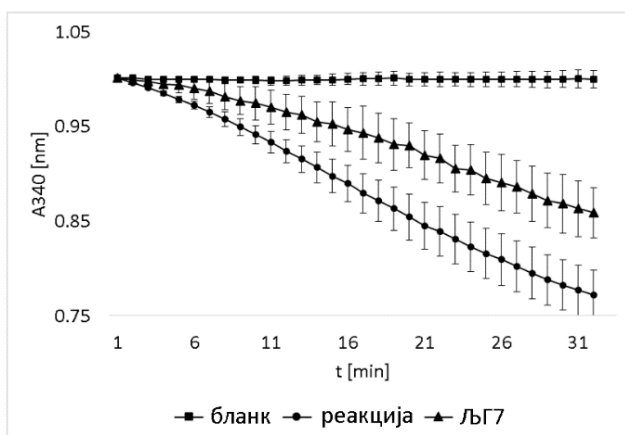


ЛbГ6

нагиб = -0,0022

инхибиција = 85,6%

$R^2 = 97,39$

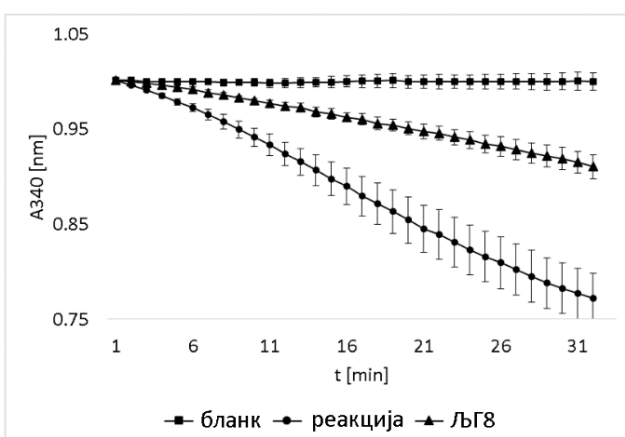


ЛbГ7

нагиб = -0,0097

инхибиција = 38,48%

$R^2 = 98,99$

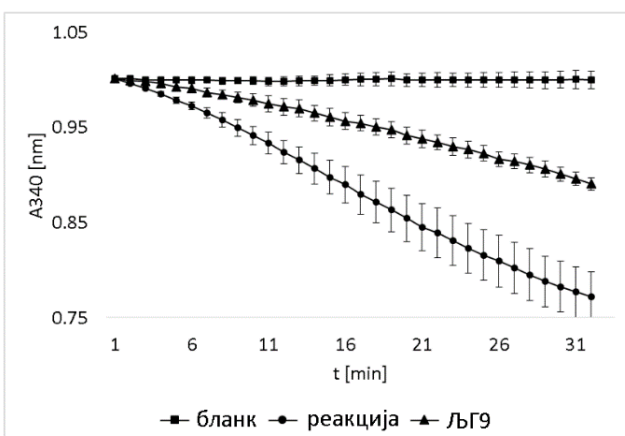


ЛbГ8

нагиб = -0,0059

инхибиција = 62,42%

$R^2 = 99,32$

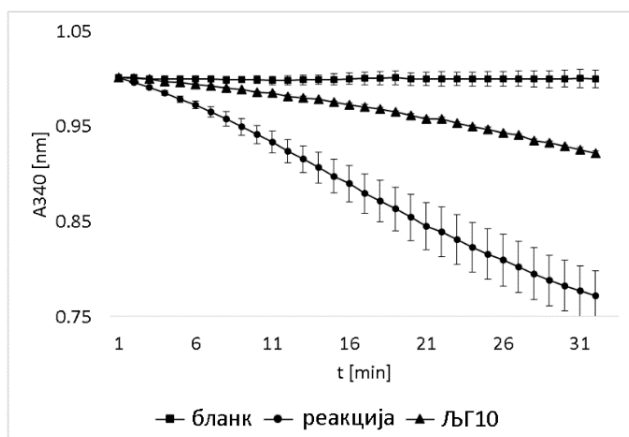


ЛbГ9

нагиб = -0,0072

инхибиција = 54,16%

$R^2 = 97,57$

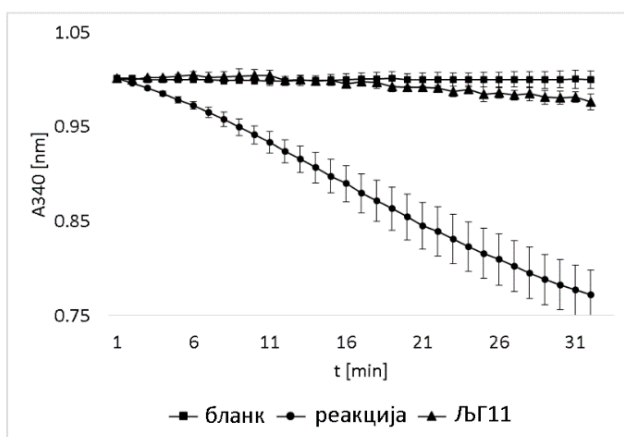


ЉГ10

нагиб = -0,0052

инхибиција = 67,2%

$R^2 = 99,71$



ЉГ11

нагиб = -0,0017

инхибиција = 89,1%

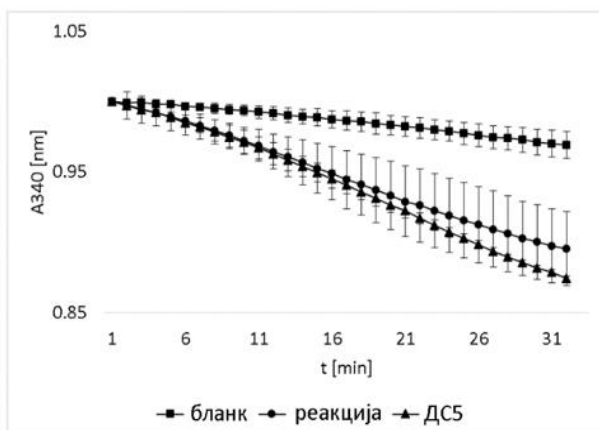
$R^2 = 99,5$

Слика 5.3. Инхибиторна моћ једињења ЉГ серије према ензиму 3 α ХСД-3. На графицима зависности A340 од времена свака тачка представља средњу вредност три понављања из два независна огледа, а цртице испод и изнад (\uparrow) представљају стандардне девијације. Тачке повезује крива из које је изведена права која најверодостојније одговара експерименталним подацима. Процент инхибиције је рачунат на основу нагиба права пробе са инхибитором, пробе без инхибитора и слепе пробе (без ензима). Са десне стране сваког графика дат је назив једињења, нагиб експерименталне криве, проценат инхибиције ензима 3 α ХСД-3 и Пирсонов коефициент корелације експерименталне криве.

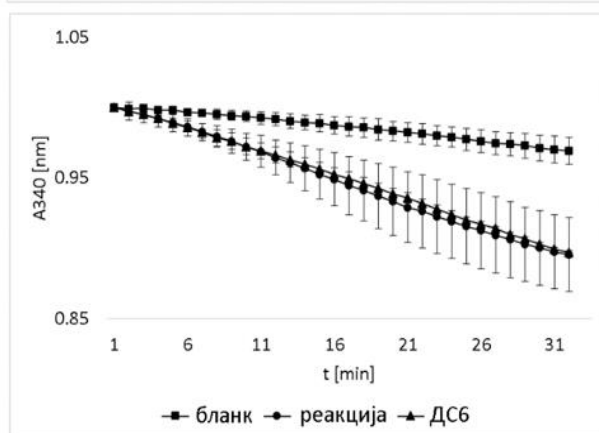
Једињења ДС серије представљају енолне и кето деривате холне, деоксихолне и хенодеоксихолне киселине са кондензованим тетразолним прстеном. Структуре једињења ДС серије дате су у одељку 4.1.3. *Тестирана једињења (Škorić и сар. 2021).*

Од једињења из ДС серије, према резултатима прелиминарног теста (слика 5.4), највећи потенцијал за инхибицију 3 α ХСД-3 показала су једињења 7 и 13. Јачина и специфичност инхибиције испитане су мерењем IC50 вредности и тестирањем инхибиције структурно и функционално сродног ензима 17 β ХСД-5. Структурна основа инхибиције 3 α ХСД-3 једињењима 6 и 10 из ЉГ серије проучавана је на основу модела добијених молекулским докингом. Ови резултати биће приказани у наредним потпоглављима. Вредно је поменути и једињење 12, које показује значајну инхибицију 3 α ХСД-3, што би могло

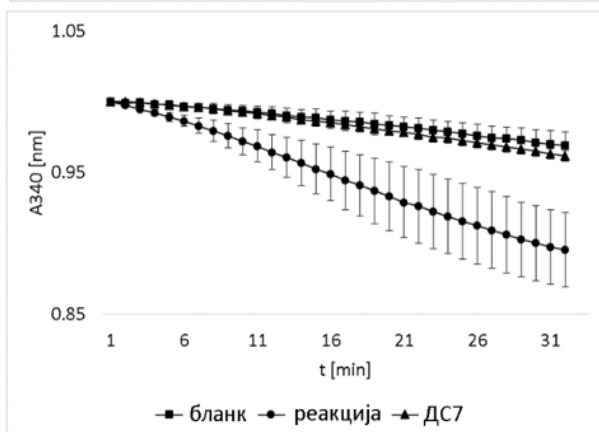
представљати значајан траг за будућа истраживања различитих АКР ензима, као и синтезу нових инхибитора изведених из приказане ДС серије једињења.



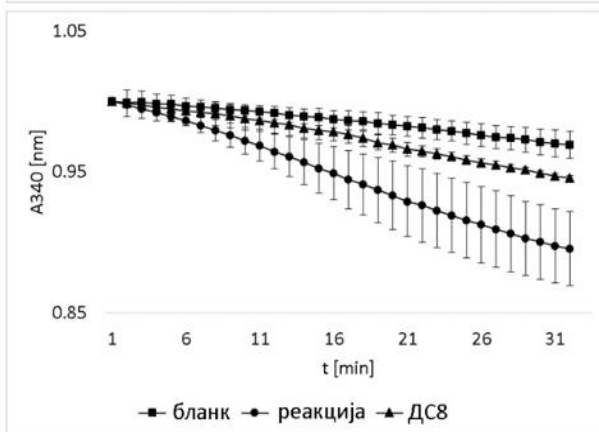
ДС5
нагиб = -0,041
инхибиција = н.о.
 $R^2 = 99,54$



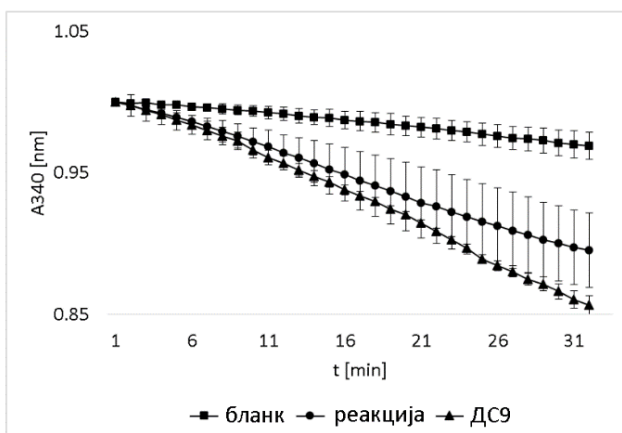
ДС6
нагиб = -0,0034
инхибиција = н.о.
 $R^2 = 99,93$



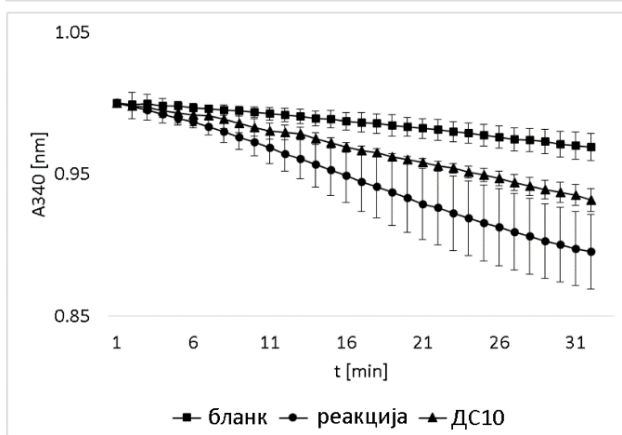
ДС7
нагиб = -0,0014
инхибиција = 86,3%
 $R^2 = 99,14$



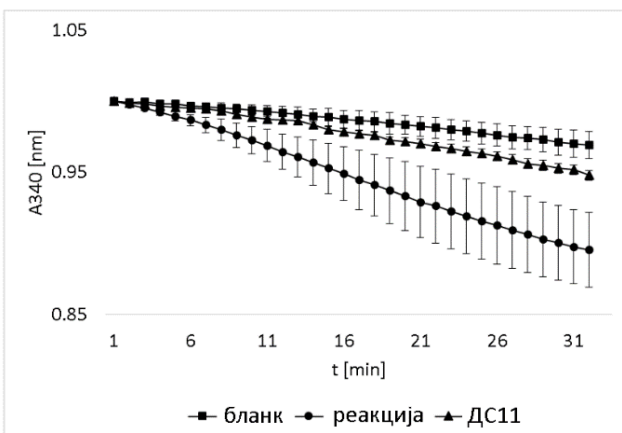
ДС8
нагиб = -0,0019
инхибиција = 63,63%
 $R^2 = 99,57$



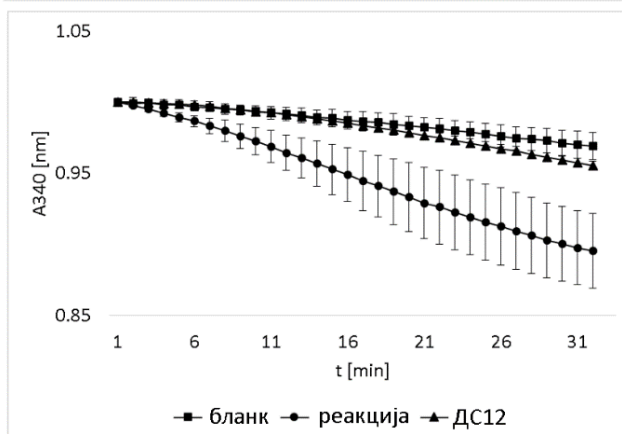
ДС9
 нагиб = -0,0048
 инхибиција = н.о.
 $R^2 = 99,7$



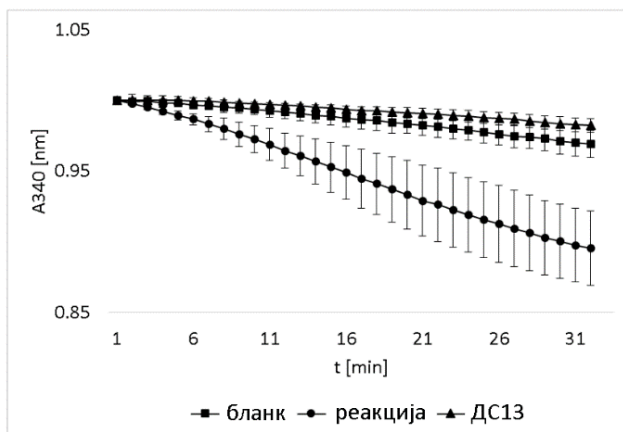
ДС10
 нагиб = -0,0023
 инхибиција = 45,45%
 $R^2 = 99,85$



ДС11
 нагиб = -0,0018
 инхибиција = 68,18%
 $R^2 = 99,4$



ДС12
 нагиб = -0,0017
 инхибиција = 72,73%
 $R^2 = 98,1$

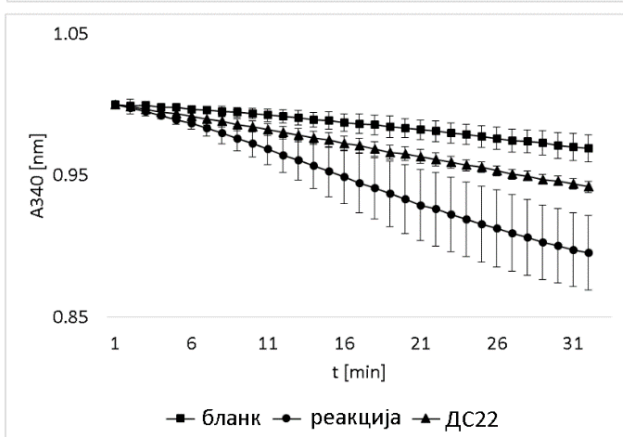


ДС13

нагиб = -0,0007

инхибиција = 96,82%

$R^2 = 97,57$

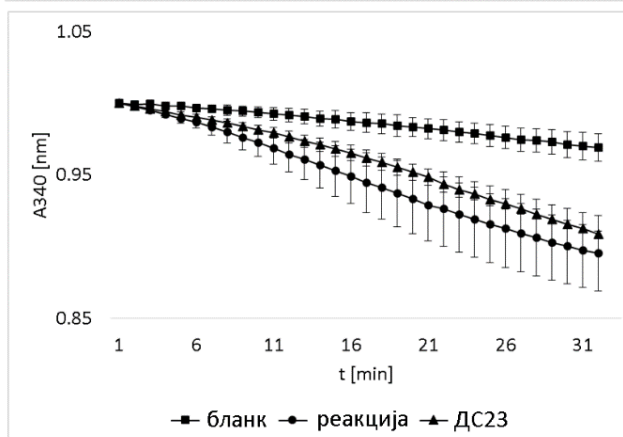


ДС22

нагиб = -0,0019

инхибиција = 63,63%

$R^2 = 99,95$

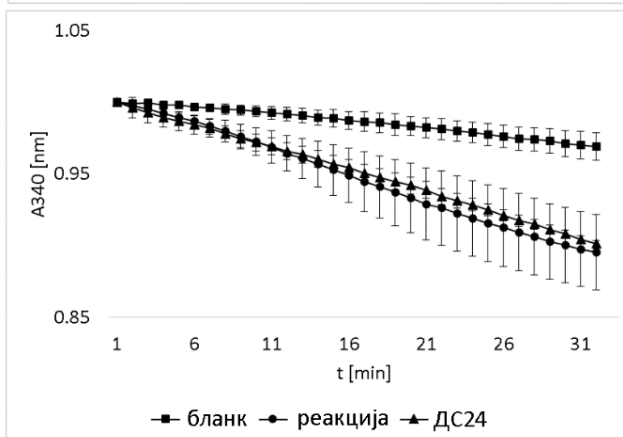


ДС23

нагиб = -0,0032

инхибиција = 4,54%

$R^2 = 99,37$



ДС24

нагиб = -0,0031

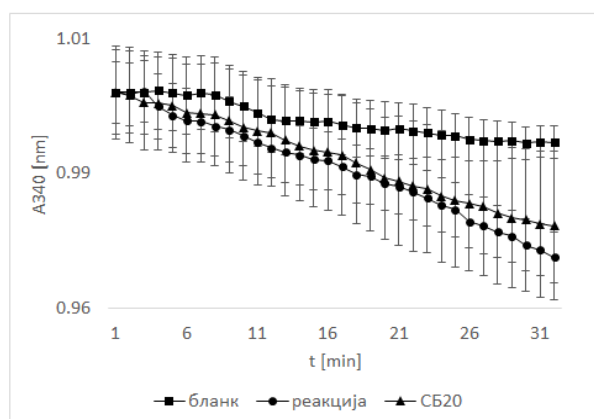
инхибиција = 9,09%

$R^2 = 99,93$

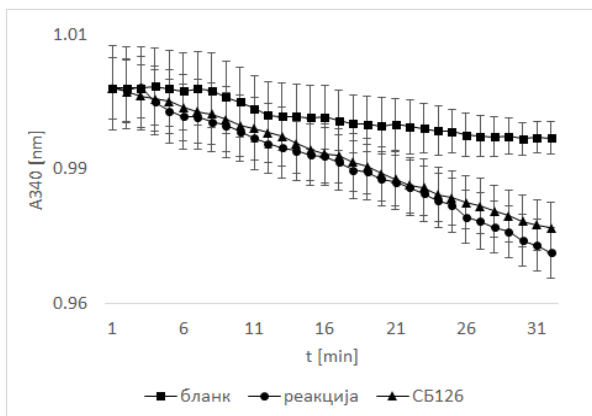
Слика 5.4. Инхибиторна моћ једињења ДС серије према ензиму 3 α ХСД-3. На графицима зависности А340 од времена свака тачка представља средњу вредност три понављања из два независна огледа, а цртице испод и изнад (\pm) представљају стандардне девијације. Тачке повезује крива из које је изведена права која најверодостојније одговара експерименталним подацима. Процент инхибиције је рачунат на основу нагиба права пробе са инхибитором, пробе без инхибитора и следе пробе (без ензима). Са десне стране сваког графика дат је назив једињења, нагиб експерименталне криве, проценат инхибиције ензима 3 α ХСД-3 и Пирсонов коефициент корелације експерименталне криве. н.о. – није одређено.

Једињења СБ серије су веома разнородна. Нека имају мале модификације структуре природних жучних киселина (једињење 156 је амид, а једињења 126, 133, 134 и 153 су алкохоли жучних киселина), док су код неких деривата изведене вишеструке модификације оригиналних стероидних молекула (*Bjedov u sar. 2017a, 2017b*).

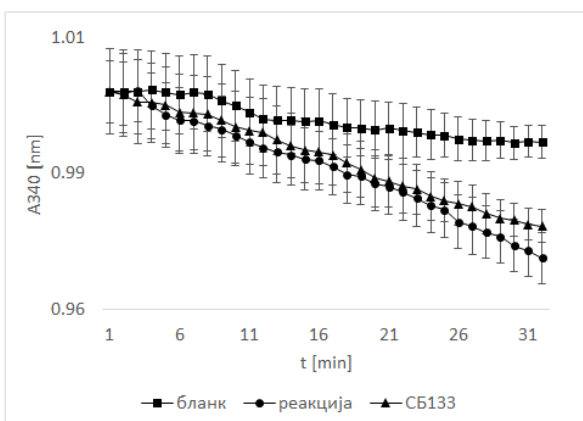
У СБ серији једињења, апсолутну инхибицију 3 α ХСД-3 при концентрацији лиганда од 40 μ М по реакцији постижу једињења 140 и 157. Поред њих, изузетно јаку инхибицију 3 α ХСД-3 показују једињења 144 и 156. Ипак, имајући у виду високе вредности стандардних девијација у целој серији једињења, као и атипично понашање реакционих крива, које је запажано и при понављању експеримената, а није забележено у другим серијама једињења, ове резултате треба узети са резервом. У будућности треба поновити тестирање инхибиције ензимске активности 3 α ХСД-3 СБ једињењима коришћењем другог растварача или уз примену корака прединкубације ензима са лигандом, да би се добили јаснији и поузданији налази о инхибиторној способности ових једињења према ензиму 3 α ХСД-3. На слици 5.5 приказани су досадашњи резултати испитивања инхибиције активности ензима 3 α ХСД-3 једињењима класе СБ:



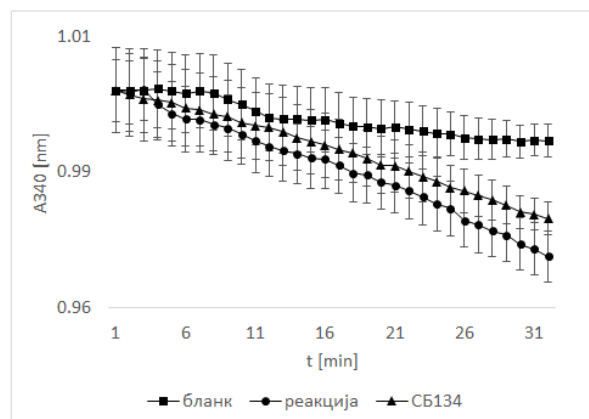
СБ20
 нагиб = -0,0008
 инхибиција = 28,7%
 $R^2 = 99,8$



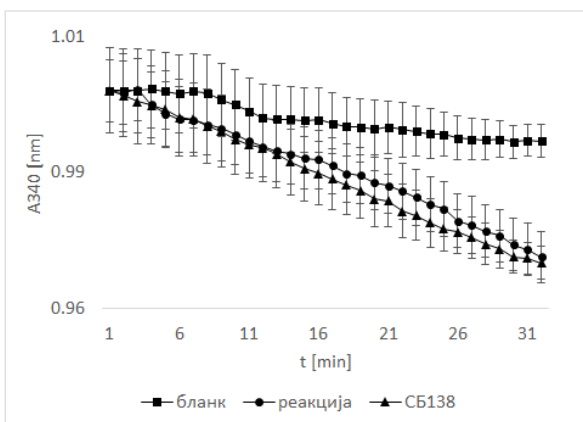
СБ126
 нагиб = -0,0008
 инхибиција = 28,7%
 $R^2 = 99,8$



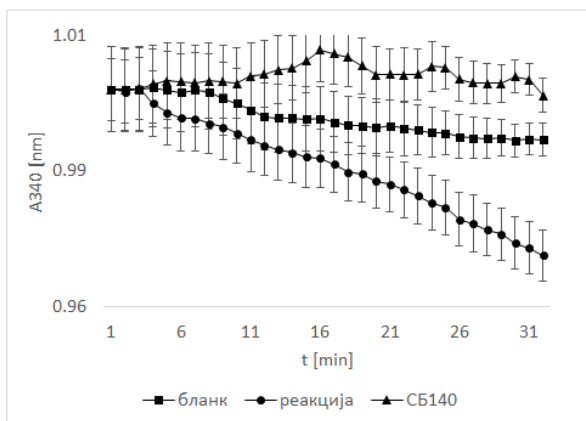
СБ133
 нагиб = -0,0007
 инхибиција = 42,9%
 $R^2 = 99,8$



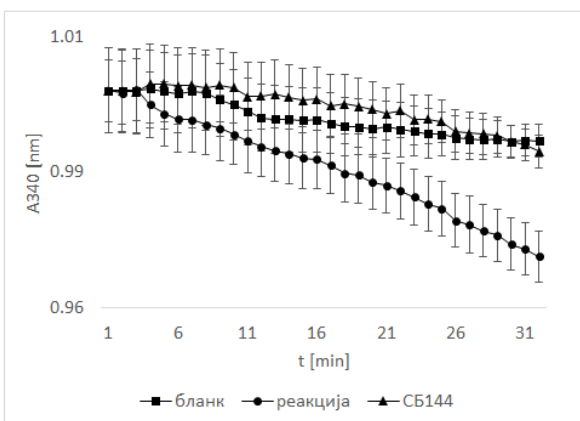
СБ134
 нагиб = -0,0008
 инхибиција = 28,7
 $R^2 = 99,6$



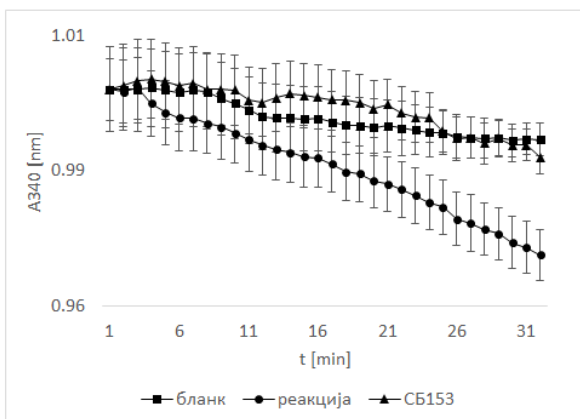
СБ138
 нагиб = -0,001
 инхибиција = 0%
 $R^2 = 99,7$



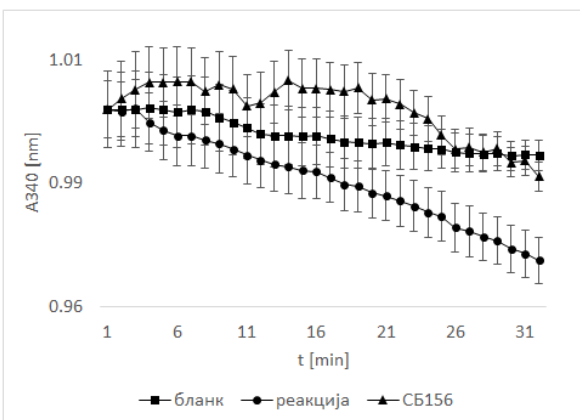
СБ140
 нагиб = -0,0001
 инхибиција = 100%
 $R^2 = 75,9$



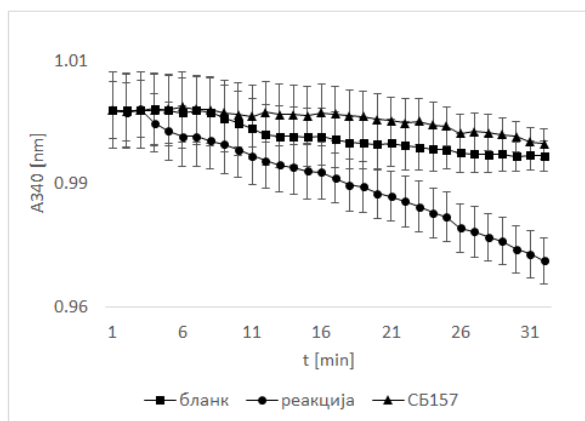
СБ144
 нагиб = -0,0005
 инхибиција = 99,7%
 $R^2 = 94,1$



СБ153
 нагиб = -0,0048
 инхибиција = 74,3%
 $R^2 = 92,0$



СБ156
 нагиб = -0,0007
 инхибиција = 94,28%
 $R^2 = 82,4$

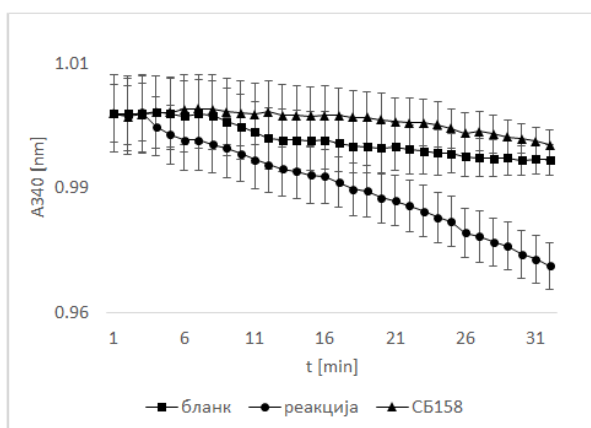


CB157

нагиб = -0,0003

инхибиција = 100%

$R^2 = 88,3$



CB158

нагиб = -0,0006

инхибиција = 95,71%

$R^2 = 86,1$

Слика 5.5. Инхибиторна моћ једињења CB серије према ензиму 3 α ХСД-3. На графицима зависности A340 од времена свака тачка представља средњу вредност три понављања из два независна огледа, а цртице испод и изнад (Υ) представљају стандардне девијације. Тачке повезује крива из које је изведена права која најверодостојније одговара експерименталним подацима. Процент инхибиције је рачунат на основу нагиба права пробе са инхибитором, пробе без инхибитора и слепе пробе (без ензима). Са десне стране сваког графика дат је назив једињења, нагиб експерименталне криве, проценат инхибиције ензима 3 α ХСД-3 и Пирсонов коефицијент корелације експерименталне криве.

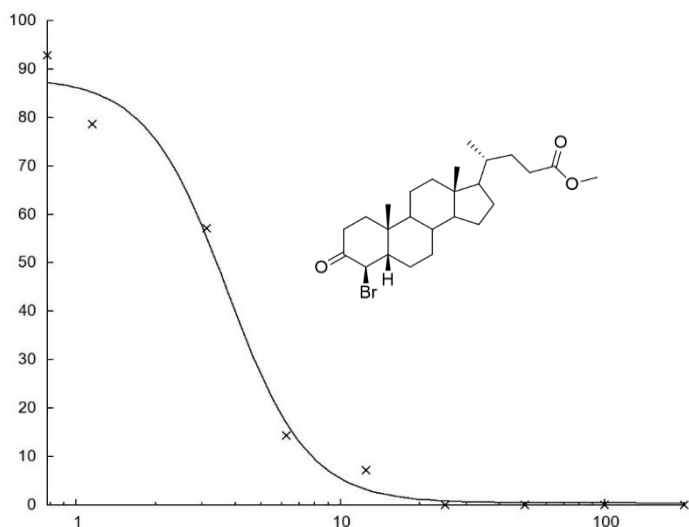
5.1.3. Јачина инхибиције 3 α ХСД-3 дериватима жучних киселина

За деривате жучних киселина који су експериментима прелиминарне претраге библиотеке једињења при концентрацији од 40 μ M показала јаку инхибицију 3 α ХСД-3 одређивана је јачина инхибиције мерењем IC50 вредности. Вредност IC50 представља ону концентрацију лиганда при којој се постиже 50% инхибиције неког биолошког или биохемијског процеса (Lackie 2010). За протеине са више подјединица корисно је одредити и Хилов коефицијент, који представља нагиб сигмоидалне криве и говори о кооперативности везивања лиганда за све подјединице протеина, међутим за 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5 важи да иако се у кристалним структурама налазе као димери (Pippione *u cap.* 2018, Zhang *u cap.* 2016), *in vivo* обављају своју функцију као мономери (Penning 2015).

За мерење IC50 вредности коришћени су исти услови као при прелиминарној претрази библиотеке деривата жучних киселина, с тим да су у пробе додавани раствори

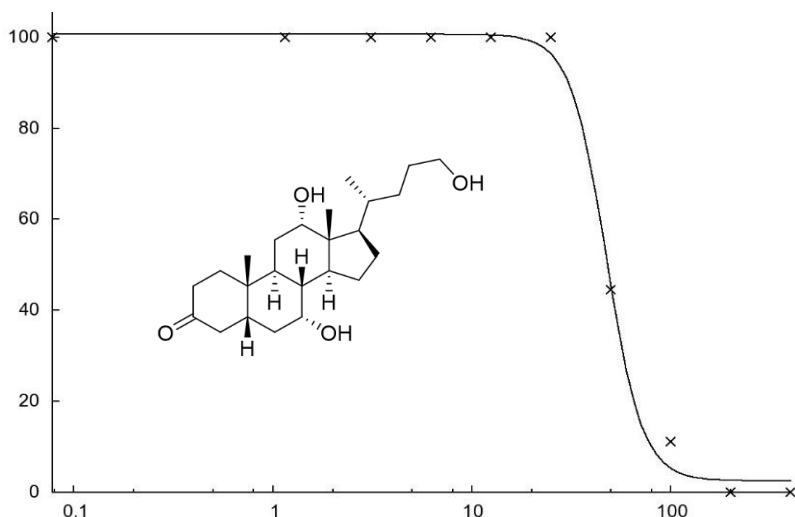
инхибитора концентрација 0–400 μM . За сваку концентрацију инхибитора утврђена је средња вредност инхибиције ензимске активности три независна понављања из два независна огледа, израчунат је нагиб праве која најверодостојније одговара експерименталним подацима, а за обраду резултата коришћен је програм Very Simple IC50 Tool Kit (<http://www.ic50.tk/>).

Добијена IC50 за једињење ЛГ6 је $3,64 \pm 0,37 \mu\text{M}$, а графички приказ зависности инхибиције ензима од логаритма концентрације инхибитора дат је на слици 5.6.



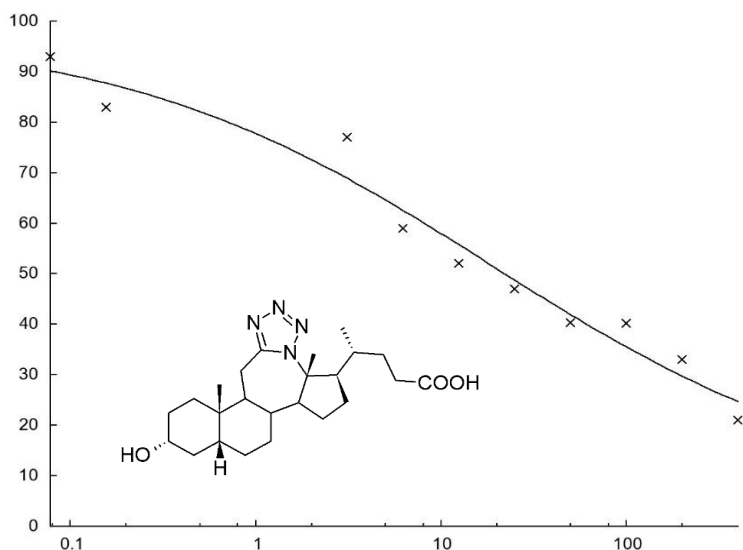
Слика 5.6. Крива зависности степена инхибиције ензима 3 α ХСД-3 од логаритма концентрације инхибитора ЛГ6. Поред криве приказана је структура инхибитора.

Добијена IC50 за једињење ЛГ10 је $47,540 \pm 1,503 \mu\text{M}$, а графички приказ зависности инхибиције ензима од логаритма концентрације инхибитора дат је на слици 5.7.



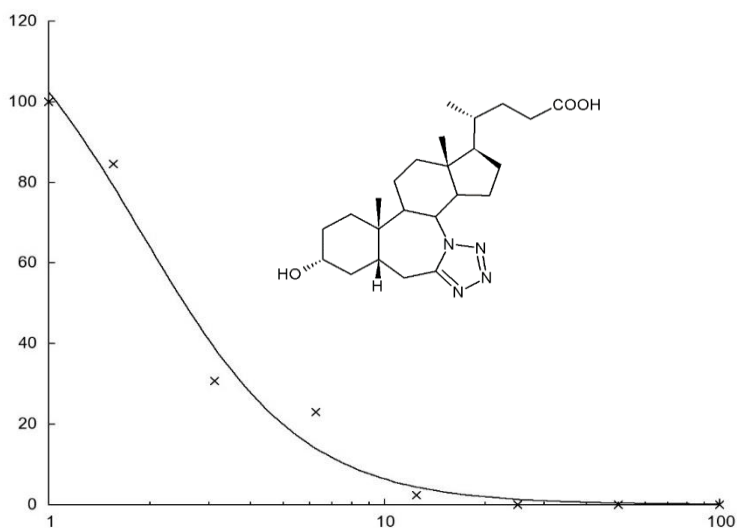
Слика 5.7. Крива зависности степена инхибиције ензима 3 α ХСД-3 од логаритма концентрације инхибитора ЛГ10. Поред криве приказана је структура инхибитора.

Вредност IC_{50} за једињење ДС7 процењена је на $18,550 \pm 25,97 \mu M$, а графички приказ зависности процента инхибиције ензима од логаритма концентрације инхибитора дат је на слици 5.8.



Слика 5.8. Крива зависности степена инхибиције ензима 3 α ХСД-3 од логаритма концентрације инхибитора ДС7. Поред криве приказана је структура инхибитора.

За једињење ДС13 процењена је IC_{50} вредност $1,898 \pm 0,805 \mu M$, а графички приказ зависности процента инхибиције ензима од логаритма концентрације инхибитора дат је на слици 5.9.



Слика 5.9. Крива зависности степена инхибиције ензима 3 α ХСД-3 од логаритма концентрације инхибитора ДС13. Поред криве приказана је структура инхибитора.

Мерење IC_{50} вредности потврдило је постојање инхибитора 3 α ХСД-3 у микроларном опсегу (ДС7, ЉГ6, ЉГ10), а вредност IC_{50} за једињење ДС13 према ензиму 3 α ХСД-3 веома је близу субмикроларног опсега. Даља истраживања су неопходна да би се ови

результати потврдили и да би се добиле IC50 вредности за СБ једињења, што би комбиновано са *in silico* анализама комплементирало истраживања.

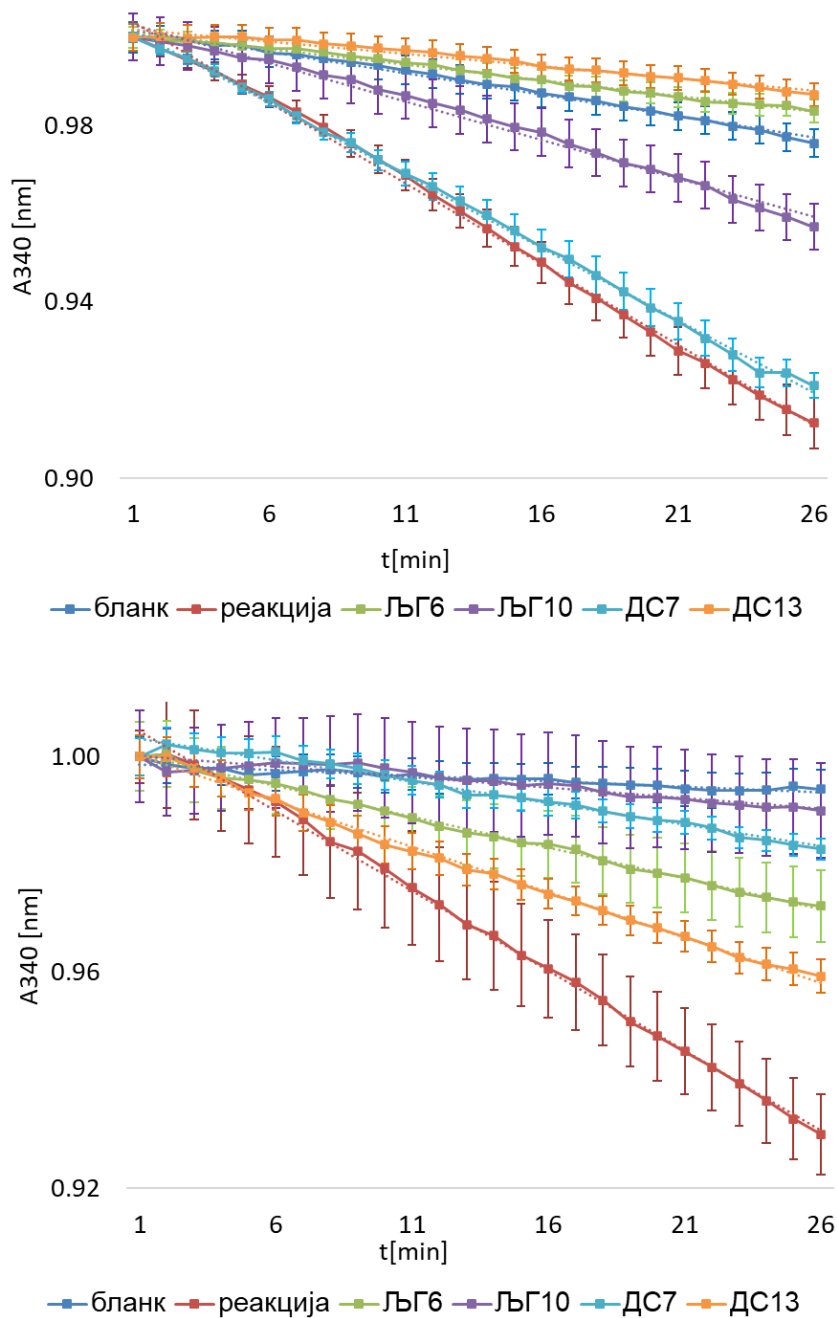
Покушаји одређивања IC50 вредности за једињења 140 и 157 из СБ серије нису били успешни, с обзиром на то да су добијени неконзистентни резултати. Стога, есеј испитивања ензимске активности 3 α ХСД-3 треба прилагодити за рад са једињењима СБ серије, вероватно коришћењем другог растварача или увођењем корака прединкубације ензима са лигандом.

5.1.4. Специфичност деривата жучних киселина према 3 α ХСД-3

Имајући у виду да су чланови потпородице АКР1Ц структурно веома слични, као и одлику чланова суперфамилије АКР да поседују велики, флексибилан џеп за везивање лиганда, који може да прихвати широк спектар структурно различитих једињења, било је потребно утврдити да ли су инхибитори 3 α ХСД-3, пронађени у претходним експериментима специфични за овај ензим. Специфичност је испитана мерењем ензимске активности сродног члана потпородице АКР1Ц, 17 β ХСД-5, те поређењем са добијеним резултатима за 3 α ХСД-3.

Иако је ензим 3 α ХСД-3 специфичан међу алдо-кето редуктазама по својој особини да везује жучне киселине, које потом делују као његови инхибитори (*Jin u cap. 2000, Penning u cap. 2000*), једињења из библиотеке деривата жучних киселина тестирана у овој дисертацији су хемијски измењена, тако да у мањој или већој мери одступају од структурних, а последично и физичко-хемијских карактеристика жучних киселина. Због тога не би било изненађујуће да се међу испитиваним једињењима нађе и неко које делује као инхибитор 17 β ХСД-5. Проналазак специфичних инхибитора 3 α ХСД-3, али и дуалних инхибитора 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5, имао би свој значај за будућа истраживања. Специфична инхибиција 3 α ХСД-3 усмерава будућа истраживања ка улогама 3 α ХСД-3 у физиолошким и патолошким процесима, што води ка спречавању стварања отпорности на хемиотерапеутике, као што су доксорубицин и винкрестин (*Penning i u cap. 2021, Veitch u cap. 2009*). У малигне болести код којих се јавља отпорност на терапију, условљена прекомерном експресијом 3 α ХСД-3, спадају дечија лимфобластична леукемија, немикроцелуларни карцином плућа, као и карцином грлића материце (*Bortolozzi u cap. 2018, Khanim u cap. 2014, Deng u cap. 2004*).

Резултати инхибиције ензима 17β ХСД-5 најбољим инхибиторима 3α ХСД-3 из претходних огледа приказани су на слици 5.10.



Слика 5.10. Упоредни приказ инхибиције ензима 3α ХСД-3 (горе) и 17β ХСД-5 (доле) одабраним једињењима из библиотеке деривата жучних киселина. На графицима зависности A_{340} од времена свака тачка представља средњу вредност три понављања у два независна експеримента, а цртице испод и изнад (τ) представљају стандардне девијације.

Дуална инхибиција ензима 3α ХСД-3 и 17β ХСД-5 отвара пут за могућност лечења оболелих од канцера који зависе од стероидних хормона, као што је случај са различитим облицима канцера дојке и простате (Zeng *u cap.* 2017, Shiiba *u cap.* 2017). Упоредни

приказ резултата инхибиције 3α ХСД-3 и 17β ХСД-5 одабраним једињењима из библиотеке деривата жучних киселина дат је у табели 5.1.

Табела 5.1. Инхибиција ензима 3α ХСД-3 и 17β ХСД-5 одабраним једињењима из библиотеке деривата жучних киселина.

једињење	инхибиција 3α ХСД-3 [%]	инхибиција 17β ХСД-5 [%]
ДС7	99,14	78,60
ДС13	96,82	46,43
ЉГ6	85,9	49,3
ЉГ10	67,2	4,9

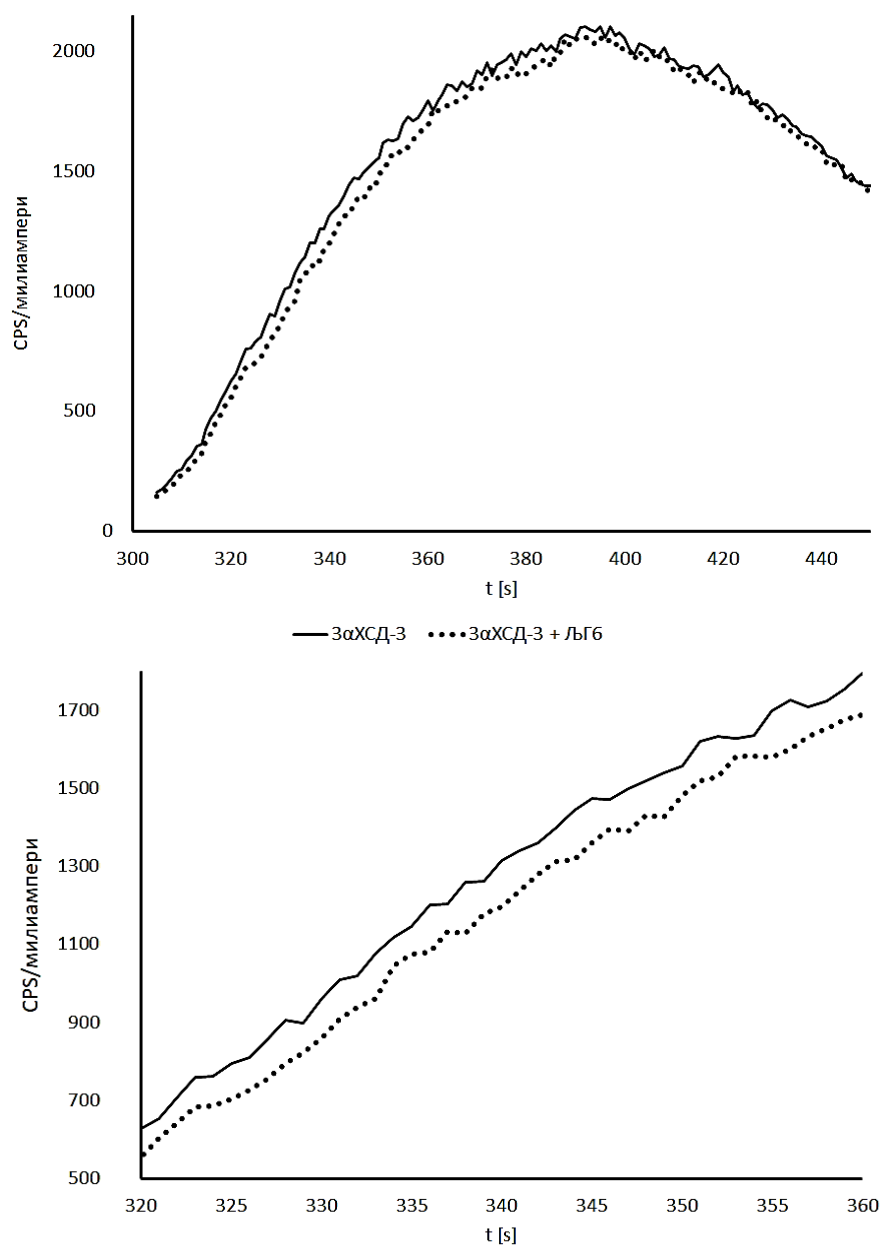
Може се закључити да је ДС13 високо специфичан микромоларни инхибитор 3α ХСД-3, са IC50 вредношћу близу субмикромоларног опсега. Једињење ЉГ6 се показало као јак инхибитор 3α ХСД-3 и умерен инхибитор 17β ХСД-5, док је ЉГ10 је релативно јак и врло специфичан инхибитор 3α ХСД-3. Једињење ДС7 се може сматрати дуалним инхибитором. Ова истраживања нису коначна и потребно је поновити их, те потврдити резултате другим *in silico* и *in vitro* методама. Битно је напоменути да је испитивана способност и других једињења из библиотеке деривата жучних киселина да инхибирају 17β ХСД-5, али да ниједно од једињења није инхибирало овај ензим у значајнијој мери.

5.1.5. Утишавање флуоресценције триптофана 3α ХСД-3 једињењем ЉГ6

Мерење унутрашње флуоресценције триптофана је још једна од метода за утврђивање везивања лиганда за протеин. Метода је детаљније описана у одељку 4.2.7. *Утишавање флуоресценције триптофана*, а суштина методе огледа се у умањењу флуоресценције порелом од остатака триптофана из унутрашњости протеина услед везивања за лиганд.

Након извођења есеја утишавања природне флуоресценције триптофана ензима 3α ХСД-3 може се приметити одређени пад у линеарном делу реакције са додатим лигандом ЉГ6 у односу на сам ензим са растварачем (слика 5.11). Добијени резултат је у сагласности са резултатима есеја инхибиције активности 3α ХСД-3 описаним у претходном потпоглављу, у којима је показано да ЉГ6 јако и релативно специфично инхибира активност ензима 3α ХСД-3. Иако овај пад није велик, не треба га одбацити, јер је позадинска флуоресценција пореклом од кофактора јака, па је могуће да маскира флуоресценцију триптофана. Такође, ензим 3α ХСД-3 садржи неколико остатака

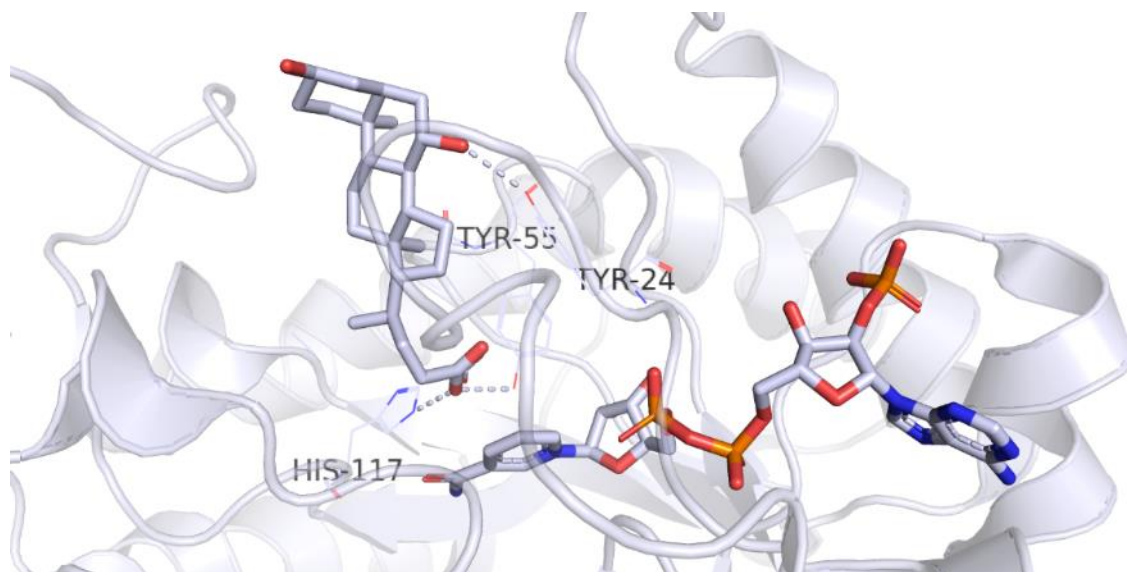
триптофана у активном месту, тако да постоји могућност да је дошло до преклапања сигнала. Структурна основа везивања једињења ЉГ6 за ензим, као и потенцијални механизам инхибиције ензима испитивани су *in silico* методама молекулског докинга и молекулске динамике и биће приказани у наредним потпоглављима.



Слика 5.11. Унутрашња флуоресценција остатака триптофана који улазе у састав 3αХСД-3 са и без лиганда ЉГ6. Концентрација ензима била је 40 mg/ml, док је концентрација лиганда била 50 mM по проби. Лиганд је растворен у диметилсулфоксиду, а у контролну реакцију је додат диметилсулфоксид у истој запремини као и растворен лиганд у проби са лигандом. На x-оси приказано је време у секундама, а на у-оси приказана је јачина флуоресценције при екситацији на 290 nm и емисији на 340 nm, израчуната преко интензитета електричне енергије бележене помоћу детектора флуориметра. Горњи график приказује цео ток праћења реакције, док доњи график фокусира њен линеарни део.

5.2. Молекулски докинг деривата жучних киселина у 3 α ХСД-3

У циљу потврђивања *in vitro* резултата и стицања идеје о начину везивања лиганда за 3 α ХСД-3, приступило се молекулском докингу. Као резултат добијене су процењене енергије везивања лиганда за рецептор [kCal/mol], као и предвиђене оријентације лиганда. Контролни докинг (слика 5.12) је потврдио везивање урсоеоксихолата у активно место на начин као у кристалној структури Јин и сарадника (2001).

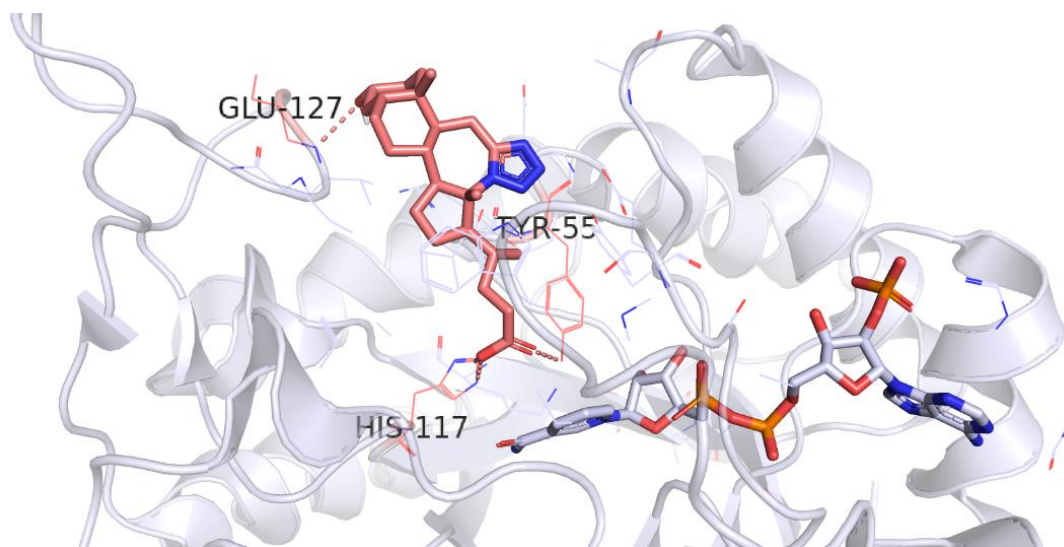


Слика 5.12. Контролни докинг урсоеоксихолата за 3 α ХСД-3. Штапићима су приказане структуре лиганда и кофактора, док су линијама обележени аминокиселински остаци у активном месту ензима. Аминокиселински остаци са којима лиганд формира водоничне везе истакнути су такође као штапићи.

Процењена енергија везивања у овој конформацији је -10 kCal/mol. У активном месту запажају се водоничне везе хидроксилне групе на позицији С6 стероидног прстена као и карбоксилатног аниона на D прстену лиганда са Y55, H117 и Y24.

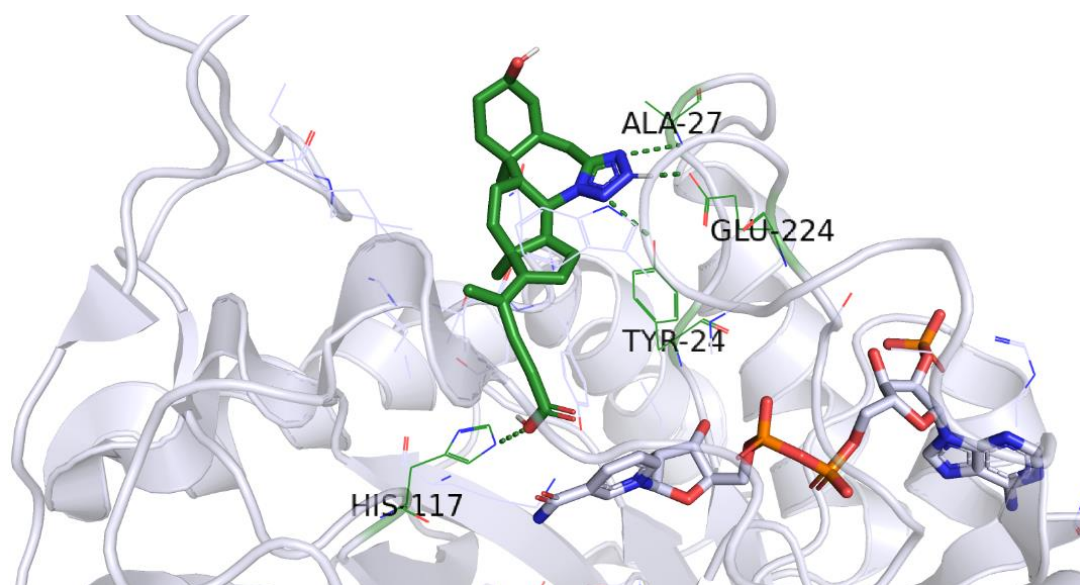
Из ДС серије једињења молекулском докингу у ензим 3 α ХСД-3 подвргнута су једињења 7 и 13, која су се показала као најбољи инхибитори 3 α ХСД-3 током *in vitro* анализа. Утврђено је да тетразолна група, карактеристична за ова једињења, осигурава афинитет ензима ка овим једињењима, који је процењен на -10,3 kCal/mol за једињење 13, односно -8,8 kCal/mol за једињење 7, што је у сагласности са резултатима ензимских есеја. С обзиром на то да ова два једињења поседују тетразолски прстен на различитим местима стероидног језгра (кондензован за В, односно С прстен), предвиђена је нешто другачија геометрија везивања.

Једињење 7 (слика 5.13) остварује контакте тетразола са Y55 из каталитичке тетраде, а хидроксилна група на С3 формира водоничну везу са E127, док карбоксилатни анјон на D прстену стероидног молекула формира водоничну везу са H117 каталитичке тетраде.



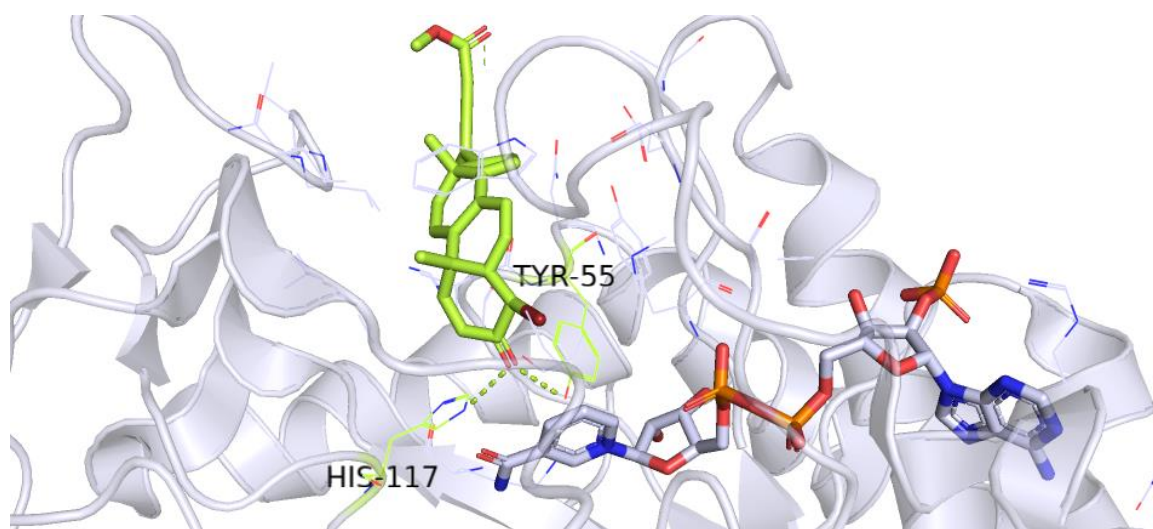
Слика 5.13. Молекуларни докинг једињења ДС7 у активно место 3 α ХСД-3. Шестицима су означени лиганд (обојен) и кофактор, док су линијама обележени остаци у активном месту. Назначени и обојени су остаци са којима лиганд формира водоничне везе.

Код једињења 13, карбоксилатни анјон у бочном ланцу на D крају стероида формира водоничну везу са H117 каталитичке тетраде, док тетразолски прстен формира поларне контакте са остацима A27, E224 и Y24 (слика 5.14). Оба једињења су оријентисана карбоксилатом у бочном ланцу на D крају ка никотинамидном прстену кофактора, као што је случај и са урсодеокихололатом у кристалној структури 1ПН1.



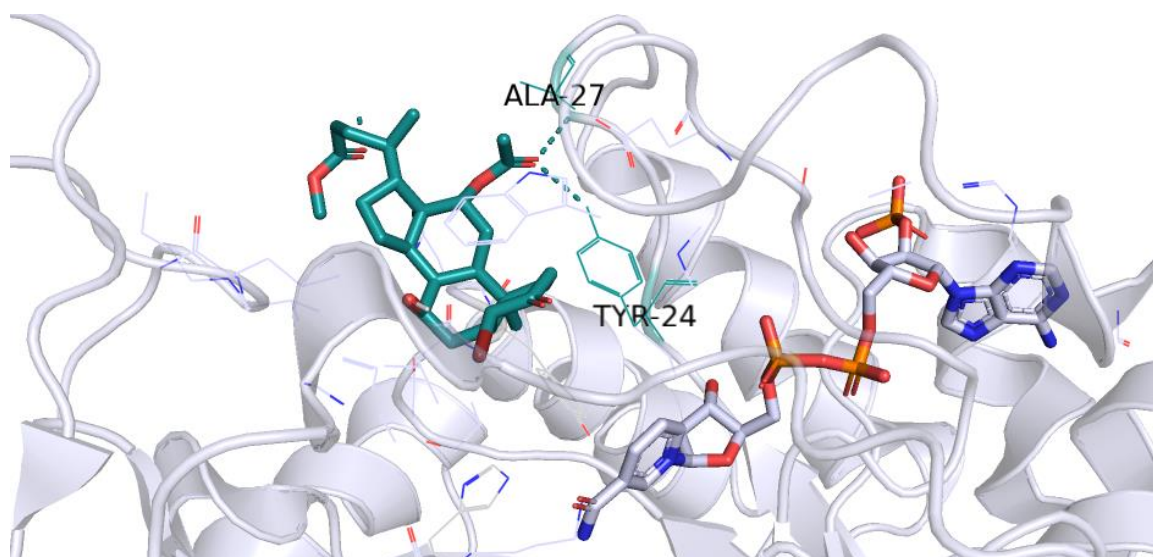
Слика 5.14. Молекуларни докинг једињења ДС13 у активно место 3 α ХСД-3. Шестицима су означени лиганд (обојен) и кофактор, док су линијама обележени остаци у активном месту. Назначени и обојени су остаци са којима лиганд формира водоничне везе.

У серији једињења ЈГ молекулском докингу су подвргнута су једињења 6 и 10, структурни аналози који се разликују само према присуству ацетатне групе на положају 12 стероидног језгра, а за које је процењен афинитет везивања $-10,1$ kCal/mol, односно $-7,9$ kCal/mol. Једињење 6 се оријентише супротно од једињења из ДС серије, С3 кето групом ка никотинамидном прстену кофактора, тако да преко С3 кето групе формира две водоничне везе са остацима из каталитичке тетраде Н117 и Y55 (слика 5.15).



Слика 5.15. Молекулски докинг једињења ЈГ6 у активно место 3 α ХСД-3. Штапићима су означени лиганд (обојен) и кофактор, док су линијама обележени остаци у активном месту. Назначени и обојени су остаци са којима лиганд формира водоничне везе.

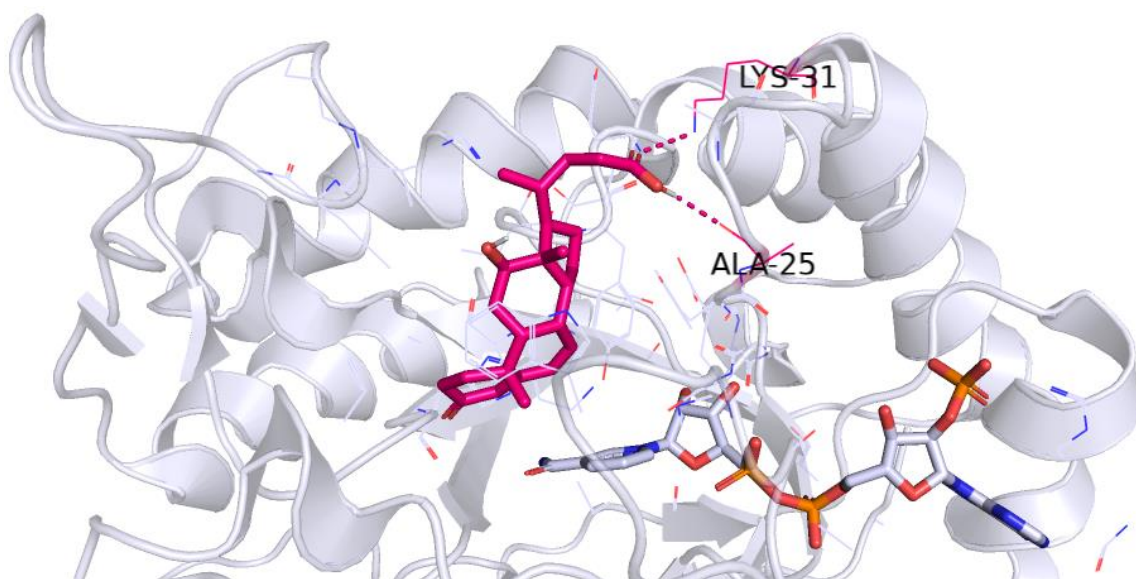
Код једињења ЈГ10, А прстен је оријентисан ка никотинамидном ентитету кофактора, ацетил група на положају 12 стероида формира водоничне везе Y24 и A27 (слика 5.16).



Слика 5.16. Молекулски докинг једињења ЈГ10 у активно место 3 α ХСД-3. Штапићима су означени лиганд (обојен) и кофактор, док су линијама обележени остаци у активном месту. Назначени и обојени су остаци са којима лиганд формира водоничне везе.

Нису уочене халогене везе између аминокиселинских остатака у активном месту 3α ХСД-3 и атома брома који постоје на положају 4 оба испитивана ЛГ једињења, али је могуће да управо атом брома доприноси повољнијем позиционирању ових једињења у активно место ензима.

Једињења СБ серије су давала неусклађене и непотпуне *in vitro* резултате, али је молекулски докинг показао могућност везивања ових једињења у активно место 3α ХСД-3 ензима и пружио увид у највероватнију структурну основу инхибиције 3α ХСД-3 СБ једињењима, међу којима су се истицала СБ140 и СБ157 (слика 5.17, 5.18).



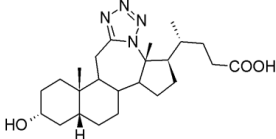
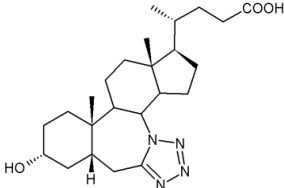
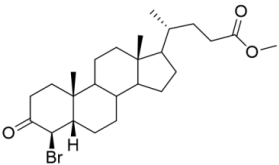
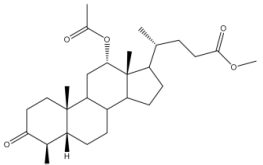
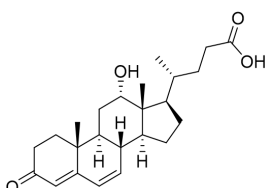
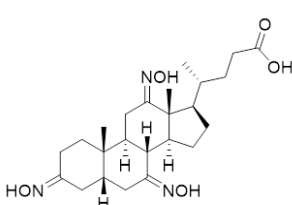
Слика 5.17. Молекулски докинг једињења СБ140 у активно место 3α ХСД-3. Штапићима су означени лиганд (обојен) и кофактор, док су линијама обележени остаци у активном месту. Назначени и обојени су остаци са којима лиганд формира водоничне везе.

Оба једињења се оријентишу А крајем стероидног језгра ка никотинамидном прстену кофактора, иако код једињења 140 услед постојања диенонског система долази до промене конформације ових стероида у односу на конформацију стероидног језгра жучних киселина, па су прстенови А и В постављени у равни готово паралелној са оном којој припада никотинамидни прстен. Водоничне везе једињење СБ140 остварује са бочним остацима К31 и А25 ензима преко карбоксилатног анјона на D прстену једињења. Једињење СБ157 преко оксимино групе на С12 формира водоничну везу са хидроксилном групом остатка Y55 (слика 5.19).

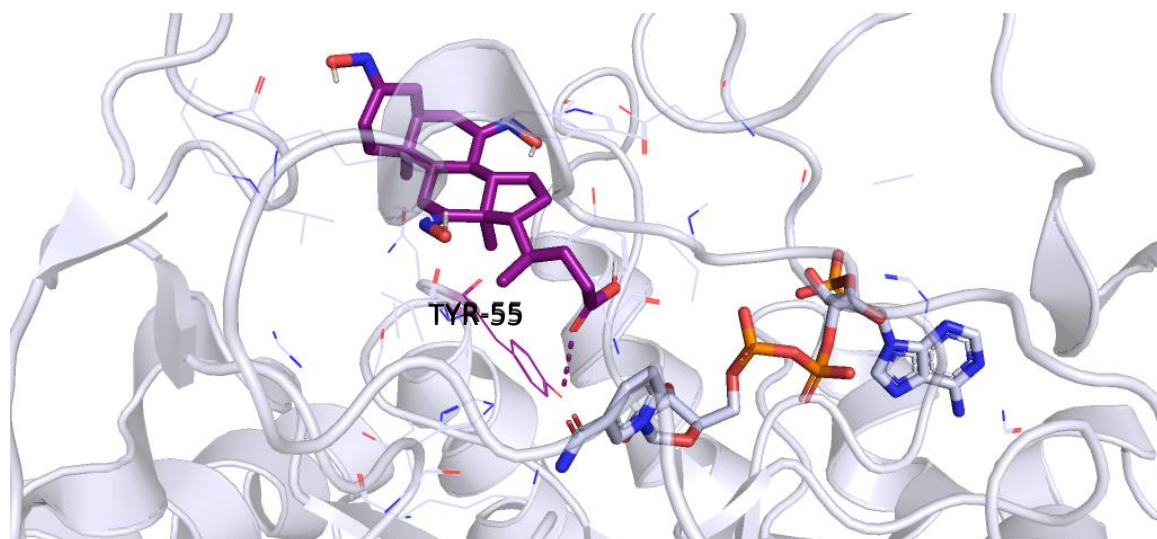
Процењена енергија везивања за једињење СБ140 је $-9,8$ kCal/mol, а за једињење СБ157 -10 kCal/mol, што их према овој анализи чини по јачини једнаким природном инхибитору урсодеоксихолату, што корелира са *in vitro* тестовима ензимске активности.

Корелација степена инхибиције ензима 3 α ХСД-3 одабраним једињењима ДС, ЛГ и СБ серије са резултатима *in silico* анализа молекулског докинга биће дата у табели 5.2.

Табела 5.2. Корелација *in vitro* и *in silico* студија инхибиције 3 α ХСД-3 одабраним кандидатима из библиотеке деривата жучних киселина.

Једињење	Структура	Инхибиција активности 3 α ХСД-3 [%]	Специфичност према 3 α ХСД-3 [%]	Енергија везивања 3 α ХСД-3 [kCal/mol]
ДС7		99,14	20,5	-8,8
ДС13		96,82	50,4	-10,3
ЛГ6		85,9	49,3	-10,1
ЛГ10		67,2	4,9	-7,9
СБ140		100	н.о.	-9,8
СБ157		100	н.о.	-10

процент инхибиције одређен је на основу есеја ензимске активности 3 α ХСД-3 са 40 μ М инхибитором; специфичност према ензиму је представљена као разлика између процента инхибиције 3 α ХСД-3 и процента инхибиције сродне хидроксистероид дехидрогеназе 17 β ХСД-5 датим једињењем; енергија везивања је процењена коришћењем програма AutoDock4; н.о. – није одређивано.



Слика 5.18. Молекулски докинг једињења SB157 у активно место 3 α ХСД-3. Штапићима су означени лиганд (обојен) и кофактор, док су линијама обележени остаци у активном месту. Назначени и обојени су остаци са којима лиганд формира водоничне везе.

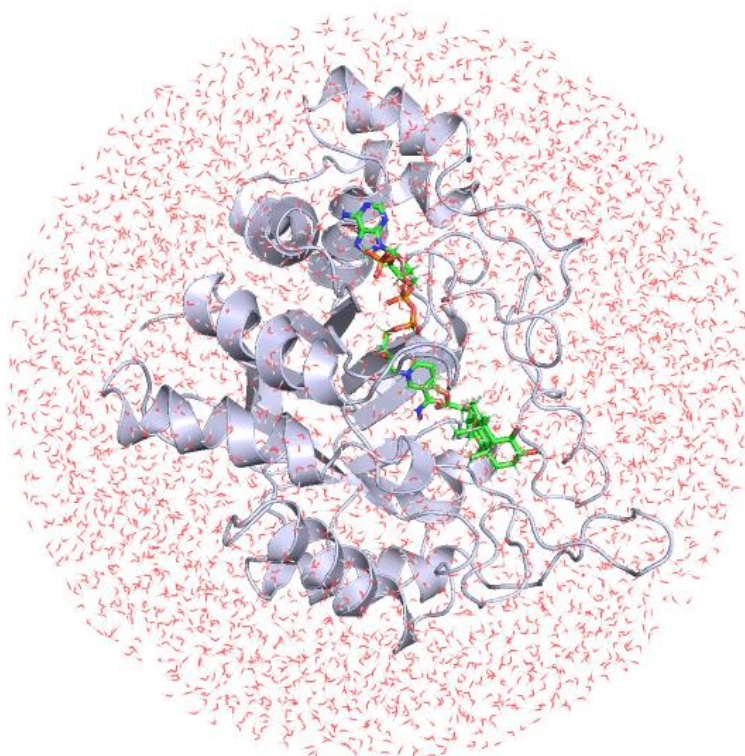
На основу упоредног приказа јачине инхибиције, специфичности инхибиције и процењене енергије везивања одабраних једињења из библиотеке деривата жучних киселина за 3 α ХСД-3 може се закључити да *in vitro* и *in silico* резултати у великој мери корелирају, што повећава њихову веродостојност, као и веродостојност комбинованог мултидисциплинарног система за скрининг лиганата коришћеног у овој дисертацији. Важно је напоменути да молекулски докинг не даје апсолутне афинитете једињења за рецептор, нити пружа апсолутну сигурност о позицији лиганда у ензиму, већ само релативно пореди афинитете везивања и даје моделе геометријски и хемијски најповољнијих конформација.

У даљем тексту биће анализирани резултати симулација молекулске динамике и кристалографских студија, а све поменуте методе у овој дисертацији (есеј ензимске активности мерењем пада апсорбанце кофактора, есеј утишавања флуоресценције триптофана у унутрашњости протеина, молекулски докинг, молекулска динамика, рендгенска кристалографија протеина) могу се објединити у брз, економичан и лако доступан систем за прелиминарне студије истраживања нових лекова и мета за лекове на основу познавања структурних основа интеракција између испитиваних ензима и лиганата (*енгл.* structure-activity relationship) чиме се штеди време и новац без губитка квалитета и веродостојности добијених резултата.

5.3. Молекулска динамика 3 α ХСД-3 – NADP⁺ са једињењем ЈГ6

За испитивање структурних промена у систему протеин-кофактор-лиганд током времена одабрано је једињење ЈГ6, које се показало као јак инхибитор 3 α ХСД-3, са микроларном IC50 вредношћу (3,64 μ M) и релативно високом специфичношћу према 3 α ХСД-3 у односу на 17 β ХСД-5. Висок афинитет рецептора према лиганду је потврђен и методом молекулског докинга, где је процењена енергија везивања приближно иста као за једињење из саме кристалне структуре, која је коришћена као рецептор за молекулски докинг (урсодеоксихолат, PDBID:1HHI, *Jin и сар. 2001*).

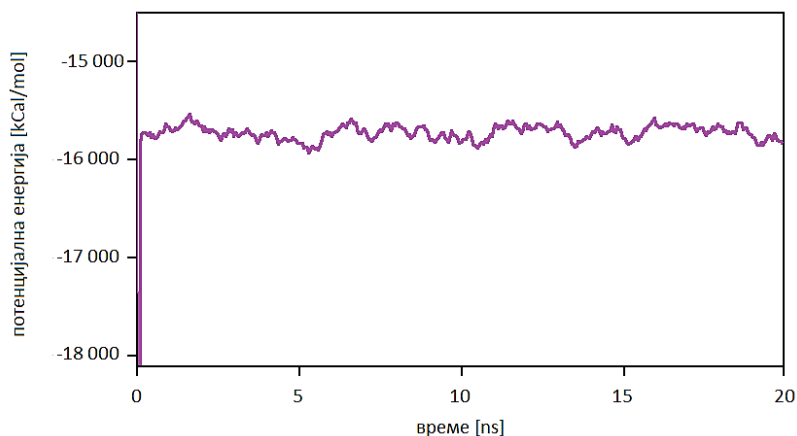
Комплекс за симулацију је садржао протеин и кофактор, чије су координате преузете из структуре 1HHI из које су уклоњене координате за молекул урсодеоксихолата и Б ланац из кристалне структуре димера. У овакав систем додате су координате за једињење ЈГ6 које су добијене молекулским докингом. Систем је виртуелно уроњен у сферу ТПЗР молекула воде и пуштен у кратку симулацију 0,1 ns еквилибрације и 0,1 ns минимизације (слика 5.19), да би се потврдило да је комплекс стабилан и да су креирани фајлови подобни за namd платформу.



Слика 5.19. Комплекс 3 α ХСД-3, NADPH и ЈГ6 уроњен у сферу воде након тест симулације молекулске динамике која је обухватала 0,1 ns еквилибрације и 0,1 ns минимизације.

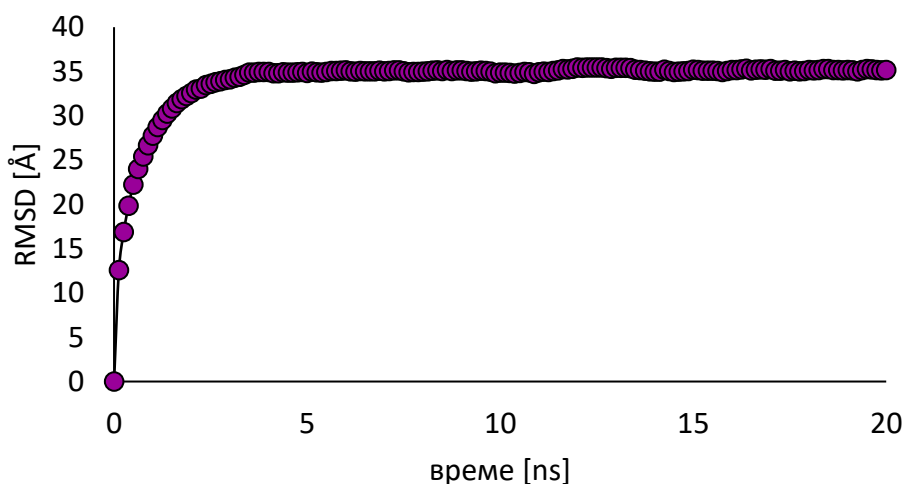
Након потврђивања исправности структуре и подобности комплекса за симулацију молекулске динамике коришћењем *namd* програма, приступило се симулацији од 0,1 ns минимизације и 20 ns еквилибрације, која је омогућила увид у понашање тернарног комплекса протеин-лиганд-кофактор током времена. Након извршене симулације одређене су вредности укупне потенцијалне енергије система, као и RMSD (*енгл.* root mean square deviation) и RMSF (*енгл.* root mean square fluctuation) вредности.

Укупна потенцијална енергија система током симулације је стабилна (слика 5.20).



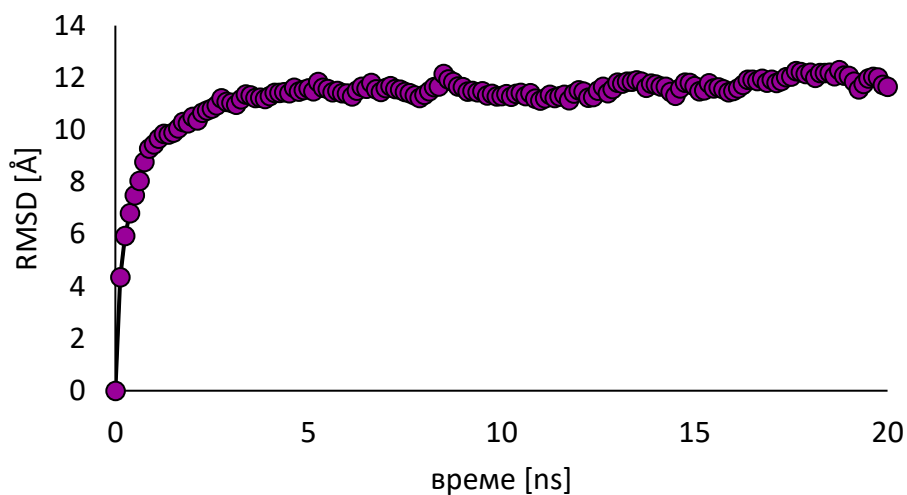
Слика 5.20. Потенцијална енергија система 3 α ХСД-3 – NADPH – ЉГ6 током 20,01 ns симулације.

Одређивање RMSD вредности уз визуелну проверу омогућило је утврђивање стабилности комплекса, али и уочавање конформационих промена које се дешавају у комплексу током времена. Најпре је анализирана RMSD вредност целог система, укључујући и молекуле воде (слика 5.21) и закључено је да након првих неколико наносекунди, током којих се дешавају одступања реда величине 30 Å не долази до значајних промена у систему.



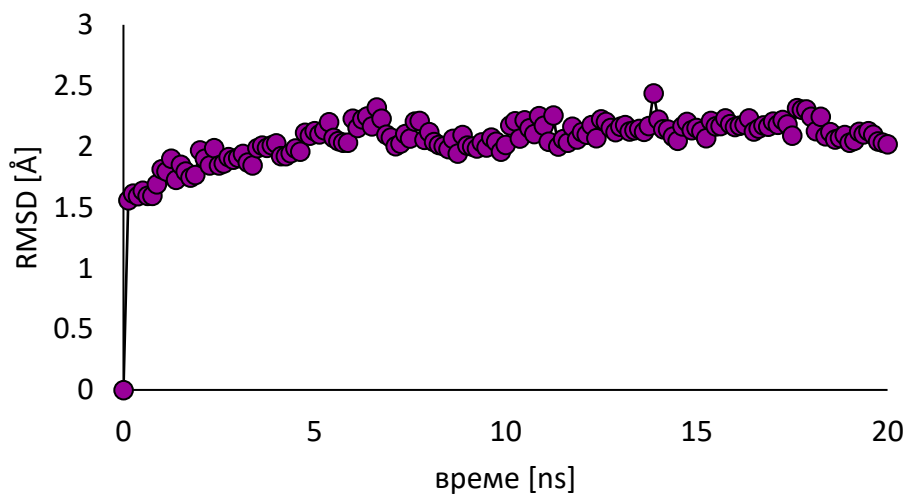
Слика 5.21. Корен средњег квадратног одступања (RMSD) система 3 α ХСД-3 – NADP⁺ – ЉГ6 у сфери воде током 20,01 ns симулације.

Када се из рачунања изузму молекули воде (слика 5.22), добија се сличан профил RMSD вредности као и приликом анализе система у коју су укључени и молекули воде, али су вредности RMSD у овом случају троструко мање (10 Å).



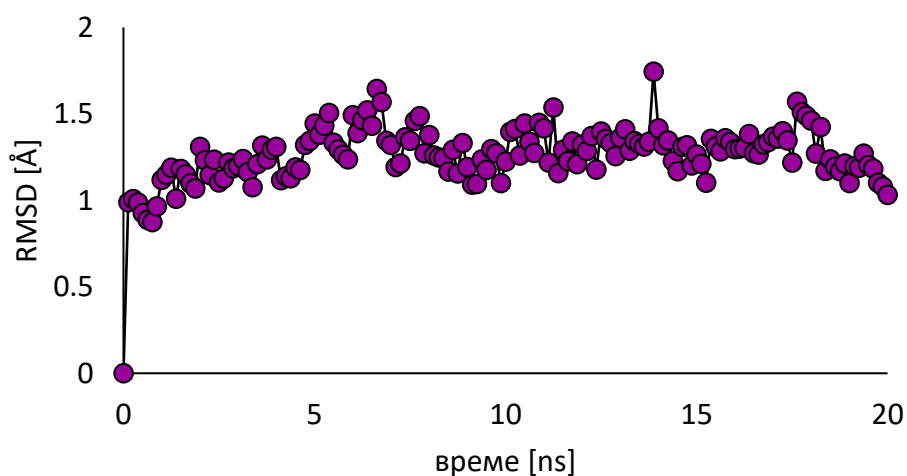
Слика 5.22. Корен средњег квадратног одступања (RMSD) система 3αХСД-3 – NADP⁺ – ЈГ6 након изузимања молекула воде из рачунања.

Када анализирамо само атоме протеина (слика 5.23), долазимо до уједначенијег RMSD профила са одступањима у распону око 1,5–2 Å.



Слика 5.23. Корен средњег квадратног одступања (RMSD) ензима 3αХСД-3 након симулације са кофактором NADP⁺ и лигандом ЈГ6 у сфери воде.

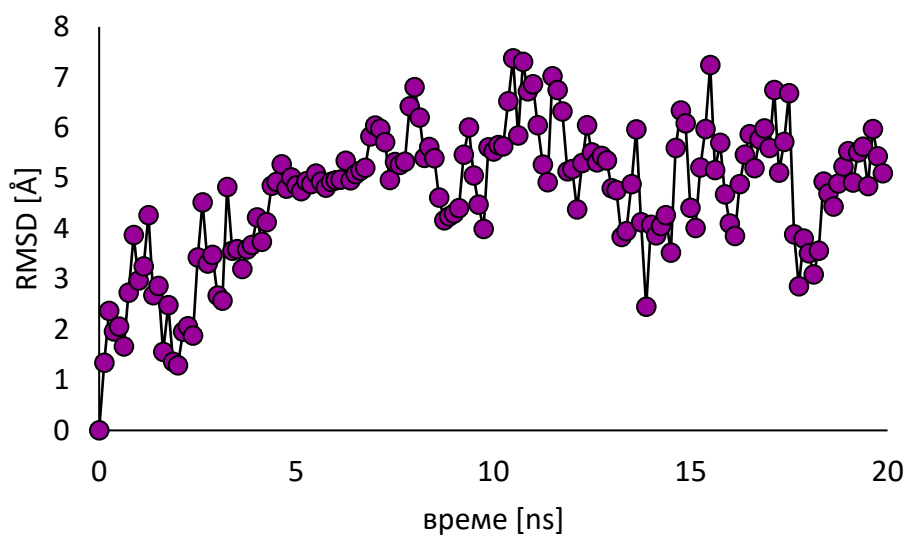
Ако из рачунања изузмемо бочне остатке аминокиселина, добијамо RMSD кичме полипептидног ланца који се креће око 1 Å (слика 5.24).



Слика 5.24. Корен средњег квадратног одступања (RMSD) Ca атома 3aXCD-3 након симулације са кофактором NADP^+ и лигандом ЉГ6 у сфери воде.

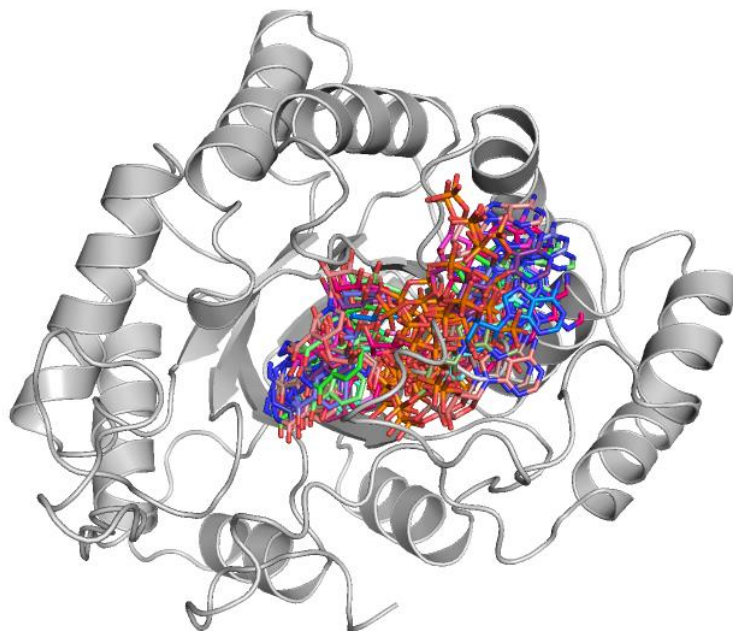
Наведени резултати говоре у прилог стабилности комплекса, тако да се највећа одступања добијају када се анализира комплекс урођен у сферу воде, док су унутар самог протеина одступања незнатна.

Било је важно испитати и RMSD вредност кофактора (молекула под редним бројем 324 у .pdb и .dcd фајловима симулације, слика 5.25) и лиганда ЉГ6 (молекула под редним бројем 326 у .pdb и .dcd фајловима симулације, слика 5.27).



Слика 5.25. Корен средњег квадратног одступања (RMSD) кофактора NADP^+ .

Да би се добило више информација о релативно великом одступању позиција атома за кофактор NADP^+ , анализирани су позиције кофактора у протеину током трајања симулације. Због прегледности је одабрано 25 равномерно распоређених фрејмова (стања система на крају датог временског корака) током симулације и приказане су позиције кофактора у односу на протеин (слика 5.26).

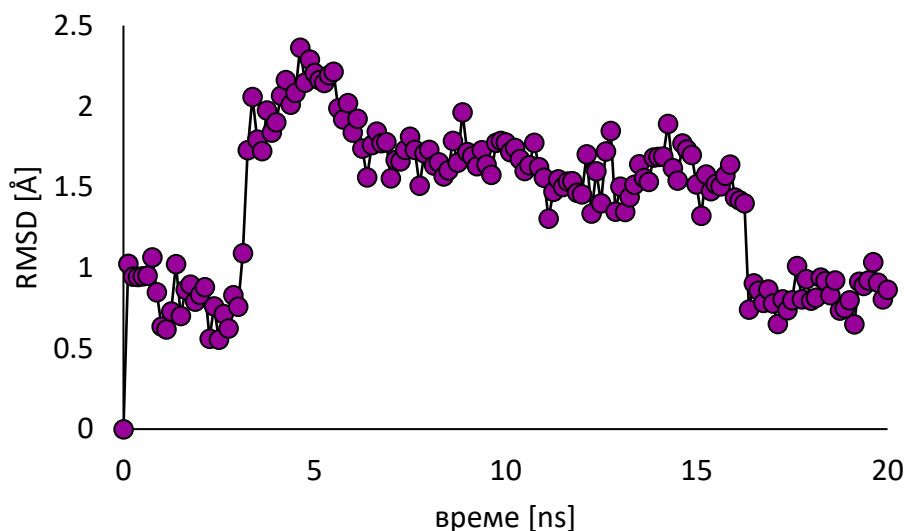


Слика 5.26. Положај кофактора NADP^+ у односу на протеин током времена трајања симулације. Сивом бојом приказан је почетни положај протеина. Штапићима су приказани молекули NADP^+ из различитих фрејмова равномерно узоркованих из трајекторије. Различитим бојама приказани су различити фрејмови узорковани из трајекторије симулације.

Утврђено је да, иако су помераји кофактора приметни, оријентација молекула остаје иста, што је сагласно са универзалним механизмом катализе описаним код алдо-кето редуктаза (*Penning 2015, Schlegel u cap. 1998*).

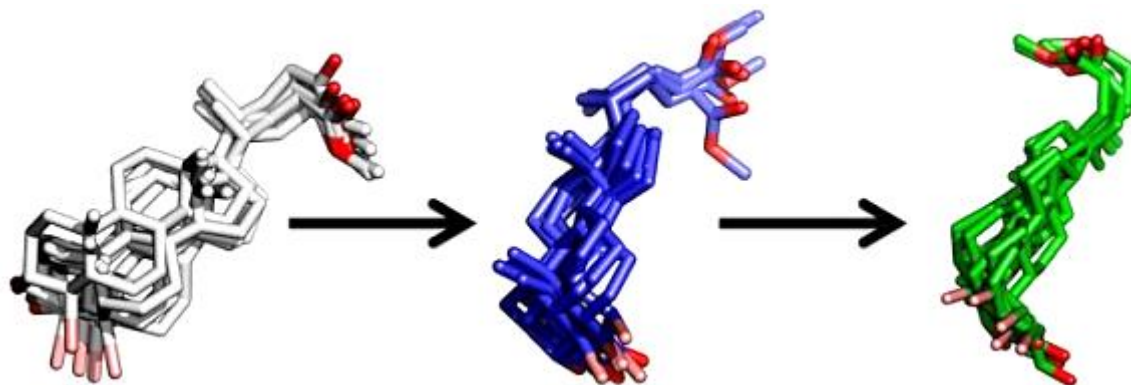
Очувана оријентација кофактора осигурава катализу у сваком моменту, с обзиром на то да је никотинамидни прстен увек окренут ка месту за везивање лиганда. Велика флексибилност кофактора може се довести у везу са великим и флексибилним активним местом овог ензима (*Sotriffer u cap. 2004*). Да би се добило више информација о понашању лиганда ЉГ6 у комплексу са $3\alpha\text{ХСД-3}$ и NADP^+ током времена, анализиран је RMSD профил лиганда (слика 5.28).

Профил RMSD за једињење ЉГ6 (слика 5.28) показује три конформације лиганда у активном месту, а ако се посматра позиција лиганда током времена може се уочити да он заузима три кластера који одговарају конформацијама RMSD профила (слика 5.29).



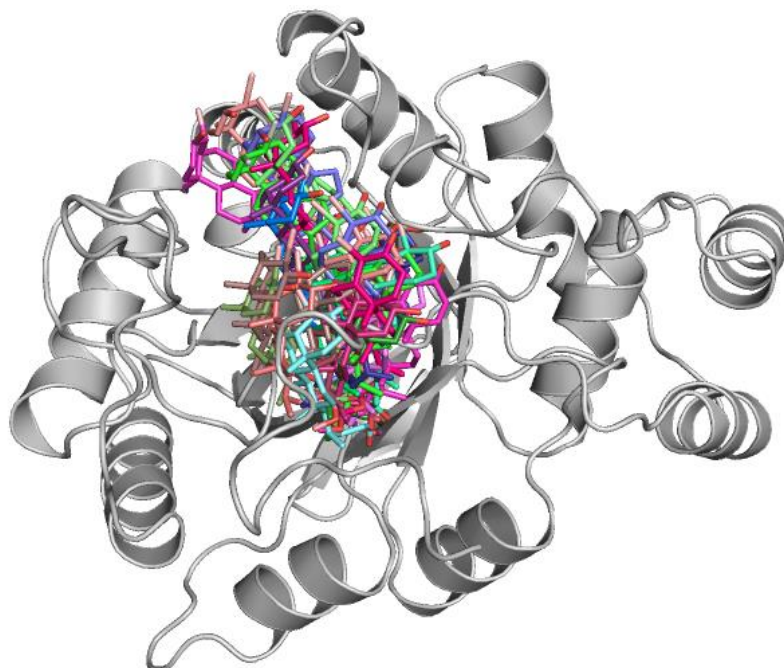
Слика 5.28. Корен средњег квадратног одступања (RMSD) лиганда ЉГ6 у симулацији тернарног комплекса са 3 α ХСД-3 и NADP⁺ у воденој сфери.

Веза једињења ЉГ6 са Y55 из каталитичке тетраде активног места 3 α ХСД-3 није стабилна, али је веза са H117 очувана током целе симулације. Положај ЉГ6 је такав да омогућава одржавање једињења у активном месту хидрофобним интеракцијама између стероидног језгра и неполарних аминокиселинских остатака ензима, као и водоничних веза између поларних група лиганда и аминокиселинских остатака протеина.



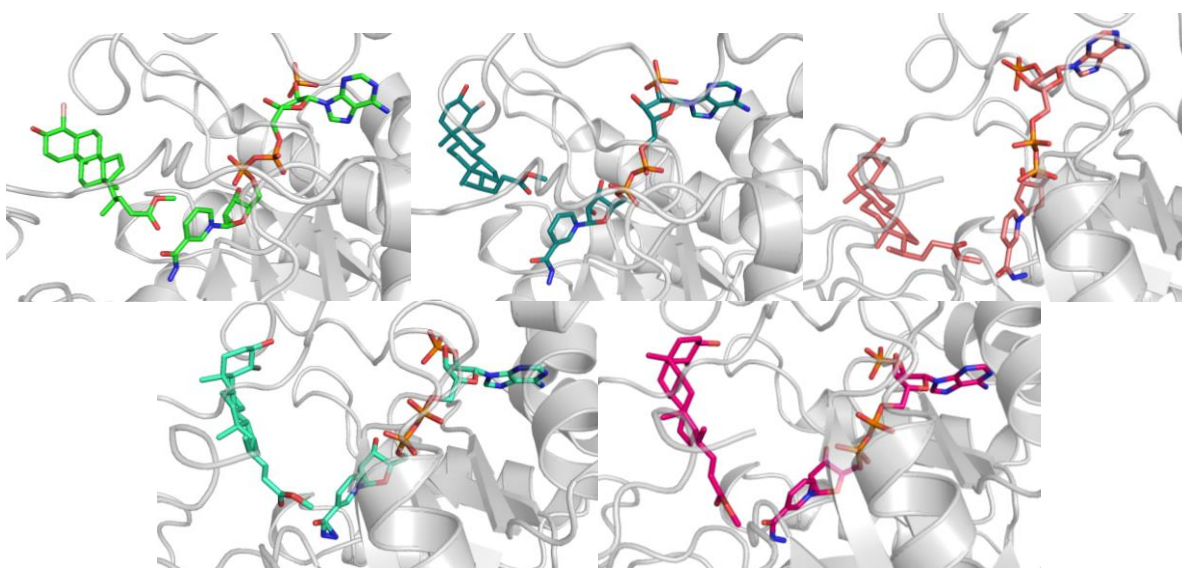
Слика 5.29. Кластери положаја једињења ЉГ6 који одговарају платоима на RMSD дијаграму.

Анализа поравнатих фрејмова узоркованих из трајекторије на први поглед одаје утисак лигананда насумично разбацаних у активном месту ензима (слика 5.30).



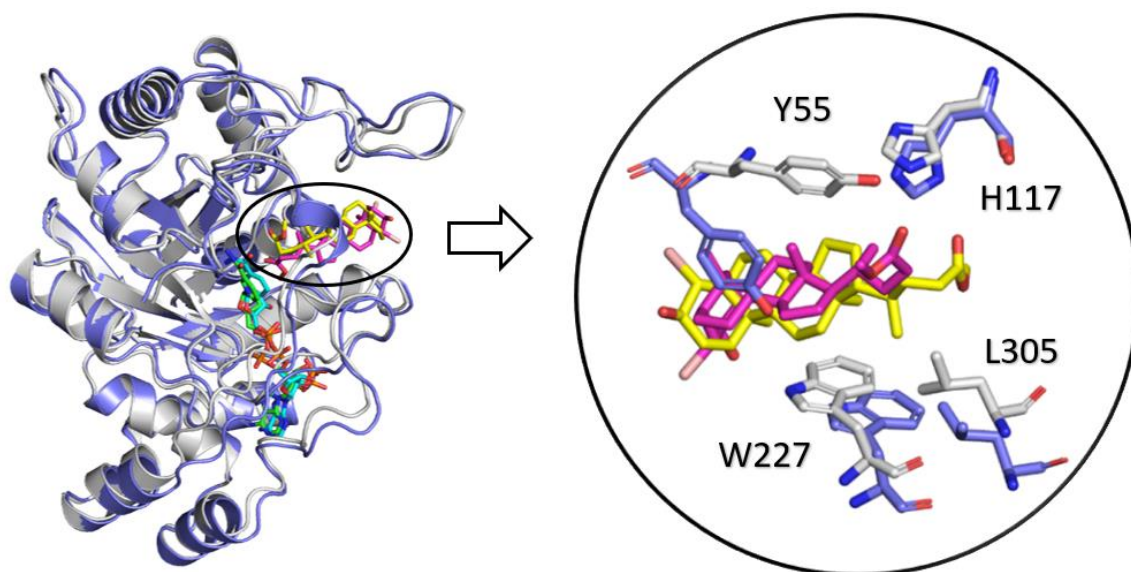
Слика 5.30. Положај ЈГ6 у односу на протеин током времена трајања симулације. Сивом бојом приказана је почетна конформација протеина. Штапићима су приказани молекули ЈГ6 из различитих фрејмова равномерно узоркованих из трајекторије. Различитим бојама приказани су различити фрејмови узорковани из трајекторије симулације.

Када се упореде позиције лиганда у односу на кофактор, може се видети да су оне очуване, тако да је карбоксилатни ањон на D прстену лиганда увек окренут ка никотинамидној групи кофактора (слика 5.31).



Слика 5.31. Узорци фрејмова трајекторије симулације са наглашеним међусобним позицијама лиганда и кофактора (штапићи).

Једињење ЛГ6 формира поларне нековалентне везе са Y55 и H117 каталитичке тетраде (слика 5.32).



Слика 5.32. Преклапање комплекса $3\alpha\text{ХСД-3} - \text{NADP}^+$ и ЛГ6 пре (сиво) и након завршетка симулације (плаво). Лиганд пре симулације означен је жутом бојом, а после симулације љубичастом. Важни аминокиселински остаци означени су на слици.

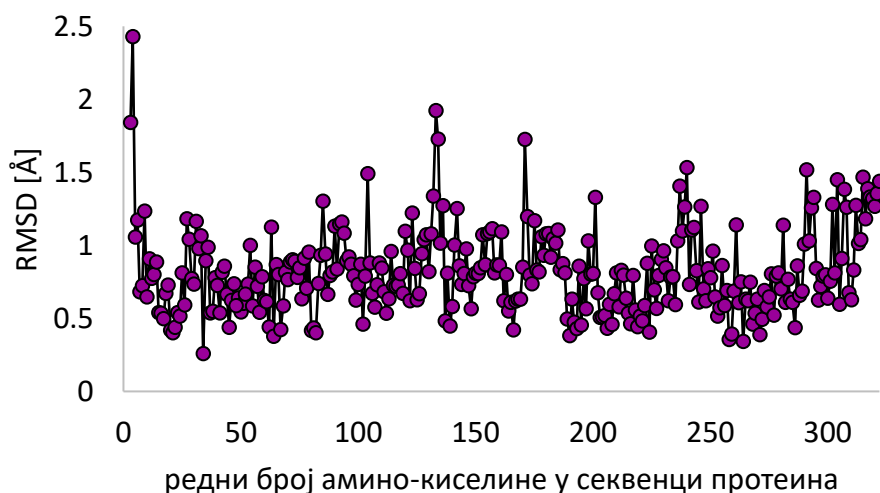
Међусобни положај ових кластера могао би се описати као да се молекули лиганда ротирају дуж осе која спаја А и D прстенове стероида у смеру супротном од кретања казаљке на сату. Кретање лиганда је ка остацима F118, F311, L308 и W227, а како се лиганд помера у активном месту, тако се и активно место прилагођава да прими метилестарску групу на D крају стероида. Кретање лиганда кроз активно место није насумично и у складу је са претходним истраживањима ензима АКР1Ц потпородице. Наиме, лиганд се најпре смешта у оксианјонско место у којем се налазе Y55, H117 и NADP^+ , као што је пронађено у комплексима $3\alpha\text{ХСД-3}$ са тестостероном, односно урсодеоксихолатом (*Jin u cap. 2001, Nahoum u cap. 2001*). Касније, он се помера ка СП3 месту, где се налазе остаци Y24, E192, S217, S221, H222, Y304 и L305, као у структури $3\alpha\text{ХСД-3}$ са андростендионом (*Zhang u cap. 2016*). Трећи кластер конформација одговара структури $17\beta\text{ХСД-5}$ у комплексу са стероидним лактонским лигандом EM1404, тако да заузима СП1 подцеп везујућег места са остацима F118, N167, L306, L308, F311 и F319, као и стероидни канал оивичен са W227 и V54 (*Qiu u cap. 2007*).

На крају овог потпоглавља дат је визуелни приказ трајекторије симулације (слика 5.33) и RMSF вредности за протеин (слика 5.34), као и његову полипептидну окосницу, сачињену од $C\alpha$ атома аминокиселина (слика 5.35).

RMSF дијаграм приказује средње вредности RMSD за сваку аминокиселину током симулације, тако да је на x-оси приказана аминокиселинска секвенца у виду редних бројева аминокиселина у протеину, док је на y-оси приказана просечна RMSD вредност за дату аминокиселину.

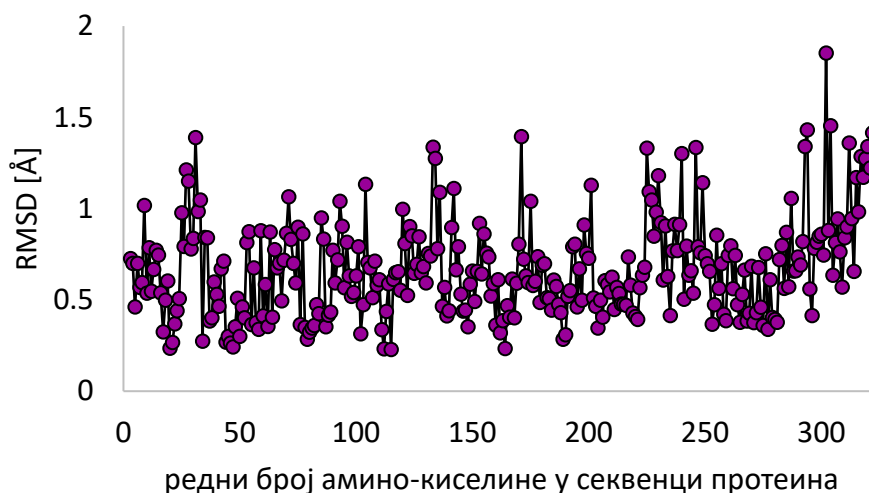


Слика 5.33. Преклопљени и поравнати узорци фрејмова из трајекторије након симулације молекулске динамике 3 α ХСД-3 са кофактором NADP⁺ и лигандом ЛГ6 у сфери воде. Љубичастом траком приказана је $C\alpha$ окосница протеина, а штапићима су приказани кофактор и лиганд.



Слика 5.34. RMSF вредности (енгл. RMSD per residue) 3 α ХСД-3 након 20 ns симулације са кофактором NADP⁺ и једињењем ЛГ6. У рачунање су узети цели молекули аминокиселина.

Неке аминокиселине су флексибилније од других, али померај сваког остатка не мора бити значајан за везивање сваког лиганда, као што ни свака мутација у протеину не изазива промену у структури и функцији, док промене на кључним местима могу играти велику улогу у препознавању и прихватању лиганда.



Слика 5.35. RMSF вредности (енгл. RMSD per residue) 3 α ХСД-3 након 20 ns симулације са кофактором NADP⁺ и једињењем ЉГ6. У обзир су узети Ca атоми аминокиселина.

Из слика 5.34 и 5.35 може се закључити да се RMSF вредност већине аминокиселина креће у опсегу до 2 Å за целе аминокиселине и око 1 Å за Ca атоме, изузев неколико остатака на N и C крају протеина, који су по природи флексибилнији. Разлике RMSF вредности за два насумично одабрана остатка су реда величине 1 Å, што одговара одступањима RMSF вредности које су приказане у претходном тексту за цео протеин односно Ca атоме протеина, тако да се може закључити да су уочене флукуације последица природних осцилација атома, веза, углова и диедара у систему током времена. Из наведених података може се закључити да је испитивани комплекс стабилан, а активно место ензима се чини довољно великим и флексибилним да без већих конформационих промена прихвати широк спектар структурно различитих једињења, међу којима је и испитивано једињење ЉГ6.

Оба налаза потврђују да је комплекс стабилан, а помераји који се примећују су очекивани с обзиром на то да је сваки живи систем динамичан, па долази до кретања атома услед истезања веза, деформација углова, торзије диедара, као и интеракција несуседних атома.

5.4. Кристалографске студије у потпородици АКР1Ц

За експерименте ове дисертације, кристализација протеина је покушавана са пречишћеним хетерологно експримираним ензимима 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5, суплементираним кофактором (NADP⁺), у апопротеинској форми или са лигандима – једињењима из библиотеке деривата жучних киселина која су се показала као најпотентнији инхибитори ензимске активности 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5 у претходним експериментима (страница 107: табела 5.2. Корелација *in vitro* и *in silico* студија инхибиције 3 α ХСД-3 одабраним кандидатима из библиотеке деривата жучних киселина). Кристализација 17 β ХСД-5 је била успешна за ензим у апопротеинској форми, као и са лигандом ДС7. Кристализација ензима 3 α ХСД-3 до момента писања ове дисертације није била успешна.

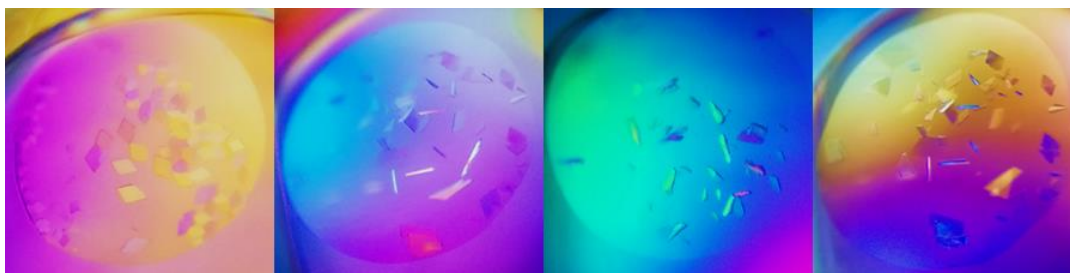
5.4.1. Кристализација ензима потпородице АКР1Ц

Експерименти кристализације постављени су помоћу робота, методом седеће капи, и ручно методом висеће капи. Ензим 17 β ХСД-5 успешно је кристалисао на оба начина описана у овој дисертацији, али кристали добијени ручним постављањем огледа висећих капи нису били погодни за снимање дифракције (слика 5.36).



Слика 5.36. Протеински кристали у ручно постављеним експериментима висеће капи 17 β ХСД-5.

У огледима кристализације методом седећих капи, постављеним помоћу робота, кристализација је била успешна у смешама 8, 48, 64, 76, 88 и 96 Morpheus комплекта као и у смеси 37 комплекта PEGs Suite I, при концентрацији протеина 40 mg/ml, у апопротеинској форми или у присуству лиганда из ДС7 (слика 5.37).



Слика 5.37. Кристали 17 β ХСД-5 под светлосним микроскопом са поларизационим објективом.

Кристали 17β ХСД-5 постављени помоћу робота су се појавили преко ноћи, док су кристали овог ензима који су постављани ручно расли 5 дана на $18\text{ }^\circ\text{C}$. Ручно постављени кристали 17β ХСД-5 су били међусобно слепљени, па нису били погодни за мерење дифракције, али су потврдили могућност кристализације 17β ХСД-5 на начин на који је могуће поновити експерименте кристализације у лабораторијама у Новом Саду.

Кристализација ензима 3α ХСД-3, нажалост, није била успешна, али су понављањем услова Couture и сарадника (2005) добијени сферулити (слика 5.38) који иако нису погодни за дифракцију, указују на то да смо на добром путу да финим подешавањима услова за кристализацију добијемо кристале који дифрактују (Bergfors 2009).



Слика 5.38. Сферулити ензима 3α ХСД-3.

5.4.2. Структура 17β ХСД-5 у апопротеинској форми

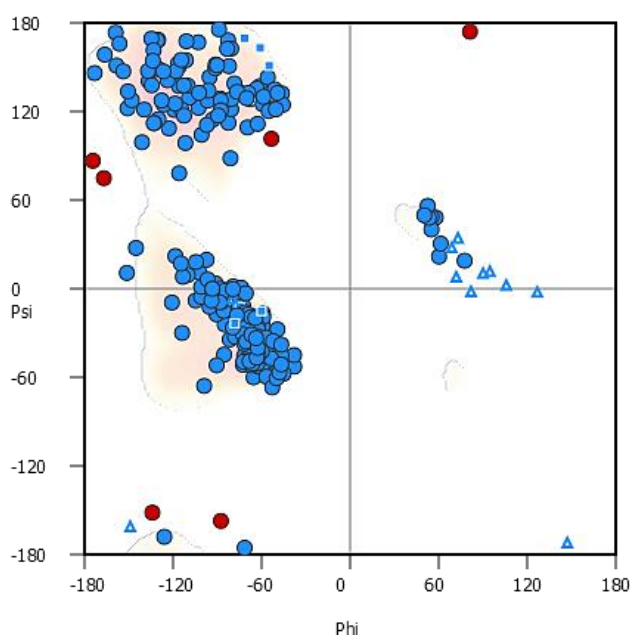
У овој дисертацији први пут је одређена структура ензима 17β ХСД-5 у апопротеинској форми, без лиганата који су намерно додати или случајно током процеса кристализације из раствора за кристализацију доспели у активно место ензима. Поред протеина и молекула воде, модел садржи само кофактор NADP^+ који је неопходан за функционисање ензима. Кристали апопротеинске форме 17β ХСД-5 добијени су коришћењем смеше под редним бројем 37 из комплета PEGs Suite I (25% w/v PEG 3000, 0,1 М Na-HEPES), са 40 mg/ml ензима (одређено спектрофотометријском методом) и односу протеинског раствора и резервоара 1:1. Кофактор је додаван у вишку (5 mM), да би се обезбедило да буде јасно виђен на $2Fo-Fc$ мапи. Непосредно пре постављања седећих капи у смешу протеина и кофактора додат је тромбин, да би се током процеса кристализације вршила *in situ* протеолиза (Plavša *u cap.* 2018).

Добијени кристали смрзнути су у течном азоту и снимани на дифрактометру Института за органску хемију и биохемију и на синхротрону у Берлину (*Gerlach u cap. 2016*). Статистика сакупених дифракционих података сумирана је у табели 5.3.

Табела 5.3. Подаци дифракционе анализе кристала 17βХСД-5 – NADP⁺

Просторна група	P1
Параметри елементарне ћелије:	
a, b, c (Å)	39,23 51,20 75,61
α, β, γ (°)	76,89 84,39 77,71
Резолуција (Å)	1,59
Број јединствених рефлексија	71762
Комплетност (%)	96,13
R _{obs}	0,221
R _{free}	0,234
Коефицијент корелације <i>F_o-F_c</i>	0,916
В фактор (Å ²)	24,356

Максимална резолуција добијеног модела протеина била је 1,59 Å, при комплетности од 96,13%. Дифракциона слика преведена је у .mtz фајл а молекулска замена вршена је помоћу програма Phaser (*McCoу u cap. 2007*) у оквиру комплета CCP4i (*Project CC, 1994*), коришћењем структуре под ПДБ кодом 1ZQ5 (*Qiu u cap. 2007*) за добијање фаза.



Слика 5.39. Рамачандранов дијаграм модела структуре 17βХСД-5 – NADP⁺. Плави кружићи означавају аминокиселинске остатке у пожељним конформацијама φ и ψ углова, плави троуглови остатке у дозвољеним, а црвени кругови остатке у недозвољеним конформацијама φ и ψ углова.

Након неколико циклуса утањивања помоћу програма Refmac5) из комплета CCP4i (Murshudov *u cap.* 2011), кобинованих са ручним утањивањем добијена је структура са R-obs фактором 0,22 и R-free фактором 0,23. Конструисан је Рамачандранов дијаграм (слика 5.39, на претходној страници) помоћу кога је утврђено да се 94,5% остатака налази у повољним регионима, 3,56% у дозвољеним регионима, док је 6 остатака (1,94%) у недозвољеним регионима ϕ и ψ углова. Добијени модел протеина (слика 5.40) је мономер, по свим карактеристикама структуре подударан до сада познатим моделима 17 β ХСД-5 (Jin *u cap.* 2001, Qiu *u cap.* 2000, Yosaatmadja *u cap.* 2006).



Слика 5.40. Структура апопротеина 17 β ХСД-5. Кофактор NADP⁺ је приказан љубичастим штапићима.

5.4.3. Структура 17 β ХСД-5 у комплексу са инхибитором ДС7

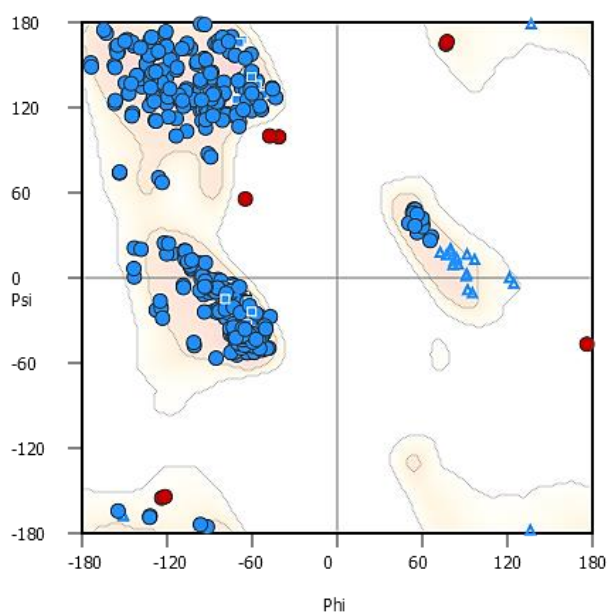
Кристали тернарног комплекса 17 β ХСД-5 са кофактором NADP⁺ и инхибитором ДС7 добијени су при спектрофотометријски одређеној концентрацији ензима 50 mg/ml (1,35 mM). Кофактор је додат у вишку (5 mM), док је инхибитор ДС7 додат тако да однос молекула ензима и инхибитора буде 1:2 (2,7 mM једињења ДС7). Употребом *Morpheus* сета за кристализацију у неколико поља МРС микротитар плоче добијени су кристали подобни за снимање дифракције, при чему су сви припадали просторној групи P1, а најбољи су добијени коришћењем смеша 96 из сета (12,5% w/v PEG 1000, 12,5% w/v PEG 3350, 12,5% v/v MPD, 0,02 M сваке аминокиселине, 0,1 M трис/бицин пуфера, pH 8,5), при односу запремина резервоара и протеина 1:1. Кристали су смрзнути у течном азоту

и снимани на дифрактометру Института за органску хемију и биохемију, као и на синхротрону у Берлину (*Gerlach u cap. 2016*). При резолуцији од 1,1 Å комплетност је била 66%, тако да је резолуција смањена на 1,4 Å да би се постигла комплетност од 93%. Подаци дифракционе анализе кристала приказани су у табели 5.4.

Табела 5.4. Подаци дифракционе анализе кристала 17βХСД-5 – NADP⁺ – ДС7

Просторна група	P1
Параметри елементарне ћелије:	
a, b, c (Å)	39,46 51,41 77,88
α, β, γ (°)	77,26 86,74 77,63
Резолуција (Å)	1,40
Број јединствених рефлексија	105500
Комплетност (%)	93,12
R _{obs}	0,167
R _{free}	0,190
Коефицијент корелације <i>F_o-F_c</i>	0,971
В фактор (Å ²)	17,321

Дифракциона слика преведена је у .mtz фајл, а молекулска замена вршена је помоћу апликације Phaser (*McCoу u cap. 2007*) у оквиру комплета CCP4i (*Project CC, 1994*), коришћењем структуре са ПДБ кодом 1ZQ5 (*Qiu u cap. 2007*) за добијање фаза.



Слика 5.41. Рамачандранов дијаграм модела структуре 17βХСД-5 – NADP⁺ – ДС7. Плави кружићи означавају аминикиселинске остатке у пожељним конформацијама φ и ψ углова, плави троуглови означавају остатке у дозвољеним, а црвени кругови остатке у недозвољеним конформацијама φ и ψ углова.

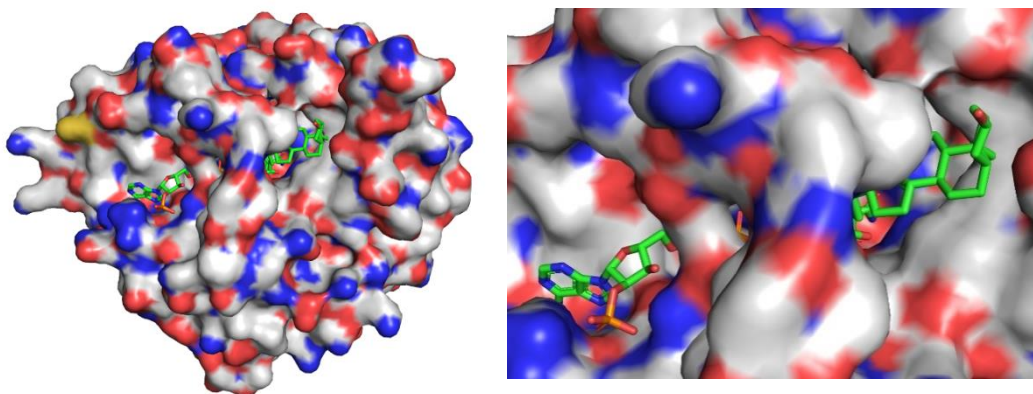
Након неколико циклуса утацњавања помоћу апликације Refmac5 (*Murshudov u cap. 2011*), који су смењивани са ручним утацњавањем добијена је структура тернарног комплекса са R-obs фактором 0,17 и R-free 0,19. Конструисан је Рамачандранов дијаграм помоћу којег је утврђено да се 96,28% остатака налази у повољним регионима, 2,43% у дозвољеним регионима, док је 8 остатака (1,29%) у недозвољеним регионима ϕ и ψ углова (слика 5.41, на претходној страни).

Добијени модел тернарног комплекса се састоји од два идентична ланца окренута један према другом, у којима се јасно издвајају електронске густине лиганда (слика 5.42). Ланци по структурним карактеристикама у потпуности одговарају до сада објављеним моделима структуре 17 β ХСД-5 (*Jin u cap. 2001*, *Qiu u cap. 2000*, *Yosaatmadja u cap. 2006*).



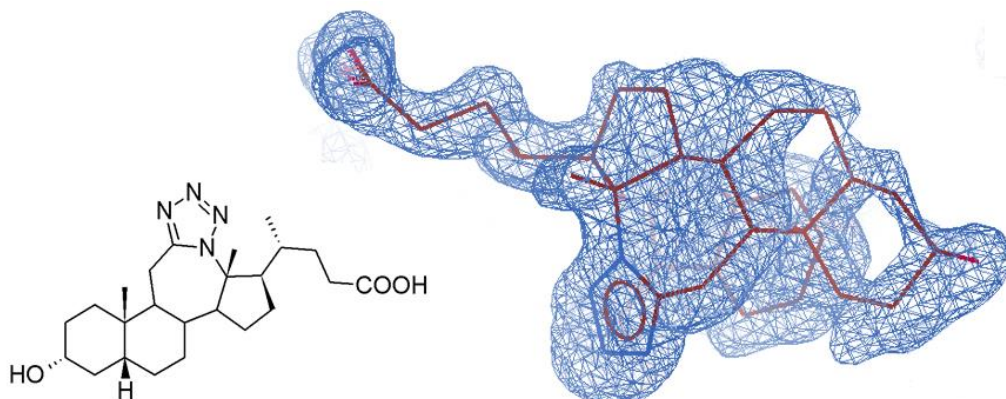
Слика 5.42. Структура димера 17 β ХСД-5 – NADP⁺ – DC7. Љубичастим штапићима у оба ланца приказани су молекули кофактора и лиганда.

У активним местима налазе се NADP⁺ и инхибитор DC7 (слика 5.43).



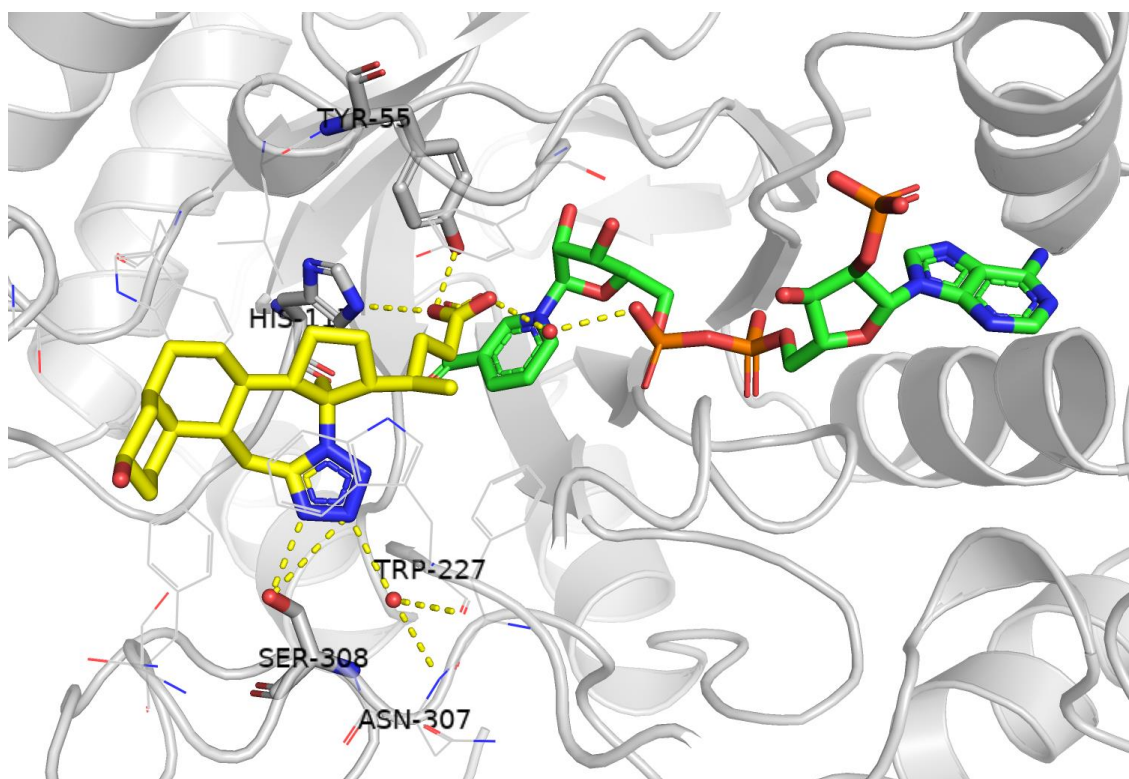
Слика 5.43. Површина протеина 17 β ХСД-5 приказана као сфера, из које извирују молекули кофактора NADP⁺ и инхибитора DC7 приказани као штапићи.

Електронска густина инхибитора је јасно и недвосмислено дефинисана и одговара структури инхибитора (слика 5.44).



Слика 5.44. Структура и електронска густина инхибитора ДС7 из модела протеинског комплекса.

Анализом добијеног модела структуре, утврђено је да једињење означено као ДС7 формира неколико кључних водоничних веза које му омогућавају задржавање у активном месту ензима 17β ХСД-5 (слика 5.45). Једињење је својим D стероидним прстеном окренуто ка кофактору, што омогућава близак контакт карбоксилата са никотинамидним прстеном кофактора.

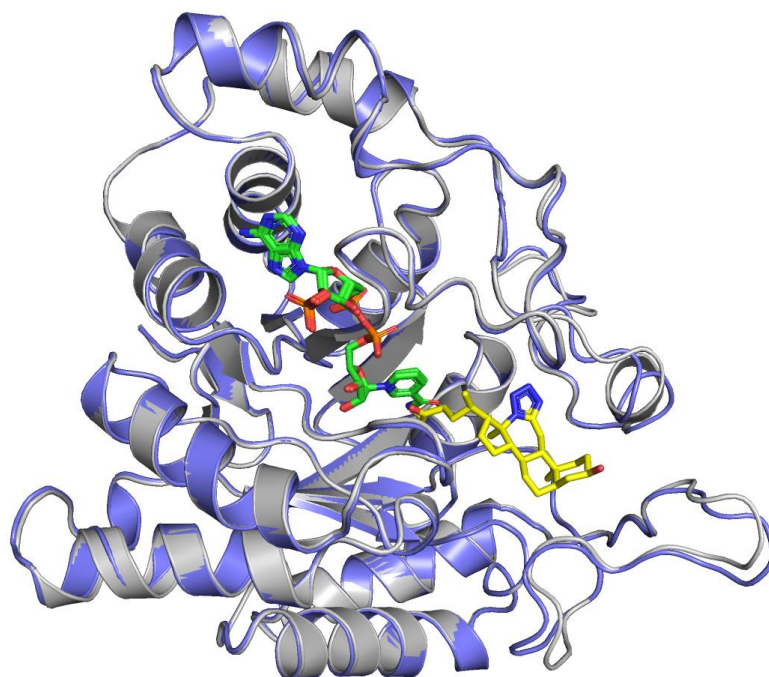


Слика 5.45. Једињење ДС7 (жути штапићи) и кофактор (зелени штапићи) у активном месту ензима 17β ХСД-5 (сиво). Контакти које ДС7 остварује са околним молекулима воде, кофактора и протеина приказани су испрекиданом жутијим линијама.

Са једне стране, карбоксилатни анјон делује као дозор водоничне везе атомима кисеоника Y55 и азота H117 из каталитичке тетраде, док са друге стране као акцептор остварује водоничну везу са молекулом воде, преко кога је у контакту са атомом кисеоника из пирофосфатне групе кофактора, чиме се вероватно осигурава повољна оријентација лиганда према кофактору. Тетразолски прстен, куплован на проширени С прстен стероида формира водоничне везе са бочним остатком S308, као и са окосницом протеина на позицијама аминокиселина D307 и Y227.

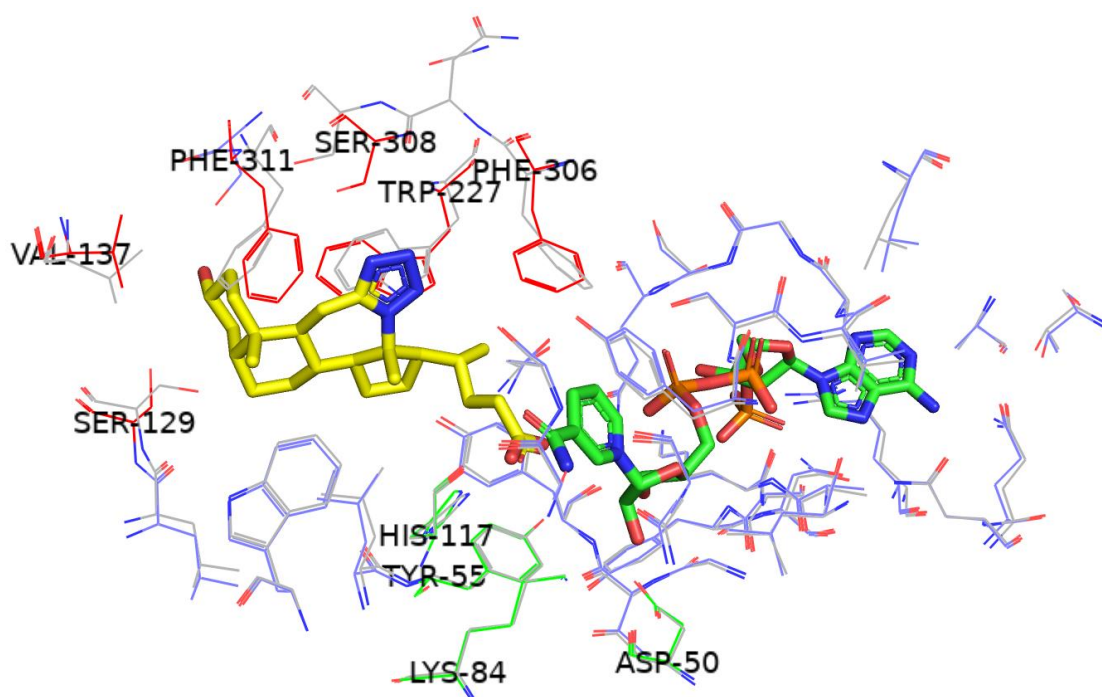
На овај начин једињење које није специфично дизајнирано за инхибицију 17 β ХСД-5, улази у његово активно место, које је структурирано тако да може да прихвати широк спектар хемијски разноврсних лиганата. Ово једињење помоћу водоничних веза које остварује са атомима који сачињавају окосницу полипептидног ланца ензима, као и аминокиселинским остацима активног места и молекулом коензима осигурава своје везивање у активном месту, чиме би могло ометати везивање супстрата и инхибирати ензимску активност, као што је показано у *in vitro* есејима и молекулском докингy.

Поравнање модела структура 17 β ХСД-5 у апопротеинској форми и са инхибитором ДС7, одређених у оквиру ове дисертације, показала су сличности и разлике у активном месту две форме ензима, са и без везаног лиганда. Позиција кофактора, као и грубе карактеристике структуре готово су идентичне у оба модела (слика 5.46).



Слика 5.46. Преклапање модела структуре 17 β ХСД-5 у апопротеинској форми (сиво) и са везаним лигандом ДС7 (плаво). Зелени штапићи представљају кофактор, а жути лиганд ДС7.

Поглед у активно место ензима 17 β ХСД-5 нам открива неколико промена, које могу указивати на индуковано прилагођавање структуре ензима супстрату, што је показано у радовима Couture 2005 и Sotriffer 2004. Иако су позиције аминокиселинских остатака у активном месту око кофактора (зелени штапићи), као и позиције остатака каталитичке тетраде (зелене линије) готово идентичне у присуству и одсуству лиганда (ДС7, жути штапићи), извесне промене се дешавају у оквиру подцепова за везивање стероида (црвене линије). Бочни остаци S129, V137 и S308 се измештају даље од лиганда, док се прстенови бочних остатака F306, F311 и W227 ротирају ка лиганду. На овај начин ензим се прилагођава лиганду и осигурава се његово боље позиционирање у активном месту. Поред тога, ротирање W227 може довести до молекуларног слагања (*енгл.* stacking интеракција) са тетразолним прстеном лиганда (слика 5.47).



Слика 5.47. Структура активног места 17 β ХСД-5 у апопротеинској форми (сиво) и са везаним лигандом ДС7 (плаво). Кофактор је приказан зеленим штапићима. Лиганд ДС7 је приказан жути штапићима. Остаци из каталитичке тетраде модела са везаним лигандом истакнути су зеленом бојом. Остаци из модела са везаним лигандом чија позиција се разликује од позиције у апопротеинској форми истакнути су црвеном бојом.

Сазнања о структурној основи везивања једињења ДС7 у активно место 17 β ХСД-5 могу бити корисна за дизајн нових инхибитора који би боље одговарали активном месту овог ензима и сродних ензимских форми. Ако би оваква једињења прошла преклиничке и клиничке фазе истраживања, могла би наћи употребну вредност у терапији патолошких стања повезаних са повећаном експресијом или активношћу 17 β ХСД-5, међу којима су и неки облици канцера.

6. ЗАКЉУЧАК

У овој дисертацији комбиновани су *in vitro*, *in silico* и кристалографски експерименти да би се у библиотеци деривата жучних киселина пронашла једињења која би деловала као инхибитори ензима хумане 3 α -хидроксистероид дехидрогеназе типа 3. Најпре су једињења из библиотеке тестирана у ензимском есеју активности 3 α ХСД-3, да би се издвојила она која показују значајнији инхибиторни потенцијал према 3 α ХСД-3. За ова једињења, која су се у прелиминарном тесту показала као најпотентнији инхибитори 3 α ХСД-3, варирањем концентрације у ензимском есеју одређена је IC50 вредност, а тестирањем инхибиције сродног ензима 17 β ХСД-5 одређена је њихова специфичност. Једињење ЉГ6 је одабрано за мерење утишавања природне флуоресценције триптофана у ензиму 3 α ХСД-3. Структурне основе инхибиције одређене су методама молекулског докинга за једињења ЉГ6, ЉГ10, ДС7, ДС13, СБ140 и СБ157, а за једињење ЉГ6 и симулацијама молекулске динамике. За прецизније расветљавање структурне основе инхибиције ензима из потпородице АКР1Ц одређене су кристалне структуре ензима 17 β ХСД-5 у апопротеинској форми и у форми ко-кристала са лигандом ДС7.

Из ове дисертације може се извести неколико закључака, који указују и на правце будућих истраживања:

- Једињења ДС7, ДС13, ЉГ6, ЉГ10, СБ140 и СБ156 показала су се као најуспешнији инхибитори 3 α ХСД-3 и треба их узети као полазну основу за синтезу потентнијих инхибитора овог ензима или других чланова АКР1Ц потпородице (*енгл.* structure-aided drug design);
- Једињења која специфично инхибирају 3 α ХСД-3 могла би се користити за лечење патолошких стања узрокованих претераном експресијом 3 α ХСД-3, као и за расветљавање функција овог, још увек недовољно истраженог ензима;
- Једињења која поред 3 α ХСД-3 инхибирају и 17 β ХСД-5 могла би бити основа за креирање допунске терапије за одређене видове канцера који су осетљиви на стероидне хормоне (неки типови канцера дојке и простате), и који показују отпорност на хемиотерапеутике широког спектра (неки типови канцера плућа, бешике, дебелог црева);

- Кристалографски подаци ензима 17 β ХСД-5 и анализе трајекторије симулације молекулске динамике ензима 3 α ХСД-3 указују на већ описан модел индукованог везивања лиганда у активно место ензима, где не долази до великих структурних промена на вишим нивоима структуре ензима, него мали помераји бочних остатака у активном месту помажу у бољем везивању лиганда;
- Појава сферулита приликом покушаја кристализације ензима 3 α ХСД-3 указује на услове које треба фино подешавати, да би се у будућности добили кристали овог ензима, о чијој структури се далеко мање зна у односу на 17 β ХСД-5;
- Комбинација *in vitro* приступа тестирања једињења мерењем потрошње кофактора у ензимској реакцији, уз утврђивање јачине инхибиције мерењем IC50 вредности и специфичности мерењем инхибиције сродне хидроксистероид дехидрогеназе 17 β ХСД-5, и *in silico* приступа молекулског докинга и молекулске динамике поуздан је, релативно брз и економичан систем за прелиминарно тестирање једињења за које је потребно утврдити да ли инхибирају ензим 3 α ХСД-3, а исти приступ, имајући у виду велику сличност чланова потфамилије, требао би бити могућ и за друге чланове АКР1Ц.

Након сагледавања добијених резултата могло би се поставити питање како то да деривати жучних киселина, који би требало да се специфично везују само за 3 α ХСД-3, показују инхибиторну активност и према сродном ензиму 17 β ХСД-5? Одговор вероватно лежи у чињеници да су испитивани деривати хемијски модификовани, тако да се удаљавају од своје природе жучних киселина и више подсећају на стероиде или ксенобиотику који могу да се вежу у активно место различитих АКР1Ц. У сваком случају, на основу резултата истраживања спроведених у оквиру ове дисертације могу се извући закључци који би водили у оба правца синтезе, специфичних инхибитора 3 α ХСД-3, али и дуалних инхибитора 3 α ХСД-3 и 17 β ХСД-5, а оба правца су корисна за фундаменталну науку, али и терапијску примену код одређених патолошких стања, у првом реду неких облика канцера.

7. ЛИТЕРАТУРА

- Adeniji AO, Chen M, Penning TM. 2013. AKR1C3 as a target in castrate resistant prostate cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 137:136-149.
- Agís-Balboa RC, Pinna G, Zhubi A, Maloku E, Veldic M, Costa E, Guidotti A. 2006. Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(39):14602-7.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3):403-410.
- 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.
- Bade BC & Cruz CSD. 2020. Lung cancer 2020: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in Chest Medicine*. 41(1):1-24.
- Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. 10(5):411-421.
- Barski OA, Tipparaju SM, Bhatnagar A. 2008. The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metabolism Reviews*. 40(4):553-624.
- Bergfors TM. 2009. Protein crystallization. International University Line, San Diego, CA.
- Berman HM, Kleywegt J, Nakamura H, Markley JL. 2014. The Protein Data Bank archive as an open data resource. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 28(10):1009-1014.
- Bjedov S, Jakimov D, Pilipović A, Poša M, Sakač M. 2017. Antitumor activity of newly synthesized oxo and ethylidene derivatives of bile acids and their amides and oxazolines. *Steroids*. 120:19-25.
- Bjedov S, Jakimov D, Poša M, Klisurić OR, Sakač M. 2017. Synthesis and antitumor activity of alkylated bile acids and oxazolines. *Tetrahedron*. 73(49):6932-6941.
- Bohren KM, Bullock B, Wermuth B, Gabbay KH. 1989. The aldo-keto reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. *Journal of Biological Chemistry*. 264(16):9547-51.
- Bollag DM, Edelstein SJ, Rozycki MD. 1996. Proteins methods. Wiley, Hoboken, NJ.
- Bortolozzi R, Bresolin S, Rampazzo E, Paganin M, Maule F, Mariotto E, Boso D, Minuzzo S, Agnusdei V, Viola G, te Kronnie G, Cazzaniga G, Basso G, Persano L. 2018. AKR1C enzymes sustain therapy resistance in paediatric T-ALL. *British Journal of Cancer*. 118(7):985-994.

- Brooks BR, Brooks III CL, Mackerell Jr AD, Nilsson L, Petrella RJ, Roux B, Won Y, Archontis G, Bartels C, Boresch S, Caflisch A, Caves L, Cui Q, Dinner AR, Feig M, Fischer S, Gao J, Hodoseck M, Im W, Kuczera K, Lazaridis T, Ma J, Ovchinnikov V, Paci E, Pastor RW, Post CB, Pu JZ, Schaefer M, Tidor, Venable BR, Woodcock HL, Wu X, Yang W, York DM, Karplus M. 2009. CHARMM: the biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*. 30(10):1545-1614.
- Browning DF, Godfrey RE, Richards KL, Robinson C, Busby SJ. 2019. Exploitation of the *Escherichia coli* lac operon promoter for controlled recombinant protein production. *Biochemical Society Transactions*. 47(2):755-763.
- Byrns MC, Jin Y, Penning TM. 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.
- Chan WT, Verma CS, Lane DP, Gan SK. 2013. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. *Bioscience Reports*. 33:(6).
- Cosconati S, Forli S, Perryman AL, Harris R, David S, Olson AJ. 2011. Virtual Screening with AutoDock: theory and practice. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 5:597-607.
- Couture JF, Pereira De Jésus-Tran K, Roy AM, Cantin L, Côté PL, Legrand P, Luu-The V, Labrie F, Breton R. 2005. Comparison of crystal structures of human type 3 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase reveals an “induced-fit” mechanism and a conserved basic motif involved in the binding of androgen. *Protein Science*. 14(6):1485-1497.
- Crawley JN, Glowa JR, Majewska MD, Paul SM. 1986. Anxiolytic activity of an endogenous adrenal steroid. *Brain Research*. 398(2):382-385.
- Dallakyan S & Olson AJ. 2015. Small-molecule library screening by docking with PyRx. Chemical biology in Humana Press, New York, NY.
- De Ruyck J, Famerée M, Wouters J, Perpète EA, Preat J, Jacquemin D. 2007. Towards the understanding of the absorption spectra of NAD(P) H/NAD (P)+ as a common indicator of dehydrogenase enzymatic activity. *Chemical Physics Letters*, 450(1-3): 119-122.
- Deng HB, Adikari M, Parekh HK, Simpkins H. 2004. Ubiquitous induction of resistance to platinum drugs in human ovarian, cervical, germ-cell and lung carcinoma tumor cells overexpressing isoforms 1 and 2 of dihydrodiol dehydrogenase. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 54(4):301-307.
- Denny WA. 2001. Prodrug strategies in cancer therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 36(7-8):577-595.
- Desmond JC, Mountford JC, Drayson MT, Walker EA, Hewison M, Ride JP, Luong QT, Hayden RE, Vanin EF, Bunce CM. 2003. The aldo-keto reductase AKR1C3 is a novel suppressor of cell differentiation that provides a plausible target for the non-cyclooxygenase-dependent antineoplastic actions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Research*. 63(2):505-512.

- Dias R, de Azevedo J, Walter F. 2008. Molecular docking algorithms. *Current Drug Targets*. 9(12):1040-1047.
- Díaz-González F & Sánchez-Madrid F. 2015. NSAIDs: learning new tricks from old drugs. *European Journal of Immunology*. 45(3):679-686.
- Donkor ES, Dayie NT, Adiku TK. 2014. Bioinformatics with basic local alignment search tool (BLAST) and fast alignment (FASTA). *Journal of Bioinformatics and Sequence Analysis*. 6(1):1-6.
- Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 66(4):486-501.
- Ericsson UB, Hallberg BM, DeTitta GT, Dekker N, Nordlund P. 2006. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Analytical Biochemistry*. 357(2):289-298.
- Evans P. 2014. CCP4 tools for X-ray integration and data processing. *Nihon Kessho Gakkaishi*, 56:s24-s24.
- Flanagan JU, Yosaatmadja Y, Teague RM, Chai MZL, Turnbull AP, Squire CJ. 2012. Crystal Structures of Three Classes of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Complex with Aldo-Keto Reductase 1C3. *PLoS ONE*. 7(8).
- Flück, CE, Meyer-Böni M, Pandey AV, Kempná P, Miller WL, Schoenle EJ, Biason-Lauber A. 2011. Why boys will be boys: two pathways of fetal testicular androgen biosynthesis are needed for male sexual differentiation. *The American Journal of Human Genetics*. 89(2):201-218.
- Foloppe N & MacKerell Jr. AD. 2000. All-Atom Empirical Force Field for Nucleic Acids: 1) Parameter Optimization Based on Small Molecule and Condensed Phase Macromolecular Target Data. *Journal of Computational Chemistry*. 21:86-104.
- Frederick CA, Williams LD, Ughetto G, Van der Marel GA, Van Boom JH, Rich A, Wang, AH. 1990. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. *Biochemistry*. 29(10):2538-2549.
- Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson GA, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian HP, Izmaylov AF, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg JL, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Montgomery JA, Peralta JE Jr, Ogliaro F, Bearpark M, Heyd JJ, Brothers E, Kudin KN, Staroverov VN, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell A, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Rega N, Millam JM, Klene M, Knox JE, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Zakrzewski VG, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Dapprich S, Daniels AD, Farkas Ö, Foresman JB, Ortiz JV, Cioslowski J, Fox DJ. 2016. Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc. Wallingford CT.

- Froger A, Hall JE. 2007. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *The Journal of Visualized Experiments*. 6:253.
- Gerlach M, Mueller U, Weiss MS. 2016. The MX beamlines BL14.1-3 at BESSY II. *Journal of Large-Scale Research Facilities*. 2(0):47.
- Gobec S, Brožič P, Lanišnik Rižner T. 2005. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their analogues as inhibitors of aldo-keto reductase AKR1C3: new lead compounds for the development of anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 15(23): 5170-5175.
- Grant BJ, Skjaerven L, Yao XQ. 2021. The Bio3D packages for structural bioinformatics. *Protein Science*. 30(1):20-30.
- Grbović LM, Pavlović KJ, Jovanović-Šanta SS, Vasiljević BR. 2019. Microwave-assisted Synthesis of Bile Acids Derivatives: An Overview. *Current Organic Chemistry*. 23(3): 256-275.
- Griffin, LD & Mellon SH. 1999. Selective serotonin reuptake inhibitors directly alter activity of neurosteroidogenic enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96(23):13512-13517.
- Hanahan D & Weinberg, RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5): 646-674.
- Hansen LH, Knudsen S, Sørensen SJ. 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.
- Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. 2012. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualisation, and analysis platform, *Journal of Cheminformatics*. 4:1-17.
- Heredia VV, Kruger RG, Penning TM. 2003. Steroid-binding site residues dictate optimal substrate positioning in rat 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD or AKR1C9). *Chemico-Biological Interactions*. 143:393-400.
- Hornig NC & Holterhus PM. 2021. Molecular basis of androgen insensitivity syndromes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 523:111146.
- Hsin J, Arkhipov A, Yin Y, Stone JE, Schulten K. 2008. Using VMD: an introductory tutorial. *Current Protocols in Bioinformatics*. 24(1):5-7.
- Huang J, Rauscher S, Nawrocki G, Ran T, Feig M, de Groot BL, Grubmuller H, MacKerell Jr. AD 2016. CHARMM36m: An Improved Force Field for Folded and Intrinsically Disordered Proteins. *Nature Methods*. 14:71-73.
- Hudis CA & Gianni L. 2011. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. *The Oncologist*. 16(Supplement 1):1-11.
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of*

Molecular Graphics. 14(1):33-38.

Hyndman D, Bauman DR, Heredia VV, Penning TM. 2003. The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chemico-biological interactions*. 143:621-631.

HyperPhysics. Georgia State University, <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/>

Ide H, Lu Y, Noguchi T, Muto S, Okada H, Kawato S, Horie S. 2018. Modulation of AKR1C2 by curcumin decreases testosterone production in prostate cancer. *Cancer Science*. 109(4):1230-1238.

Ji Q, Aoyama C, Nien YD, Liu PI, Chen PK, Chang L, Stanczyk FZ, Stolz A. 2004. Selective loss of AKR1C1 and AKR1C2 in breast cancer and their potential effect on progesterone signaling. *Cancer Research*. 64(20):7610-7617.

Ji Q, Chang L, Van Den Berg D, Stanczyk FZ, Stolz A. 2003. Selective reduction of AKR1C2 in prostate cancer and its role in DHT metabolism. *The Prostate*. 54(4):275-289.

Jin Y, Stayrook SE, Albert RH, Palackal NT, Penning TM, Lewis M. 2001. Crystal structure of human type III 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/bile acid binding protein complexed with NADP⁺ and ursodeoxycholate. *Biochemistry*. 40(34):10161-10168.

Judes G, Dagdemir A, Karsli-Ceppioglu S, Lebert A, Dauplat MM, Rifai K, Daures M, Dubois L, Bignon YJ, Penault-Llorca F i Bernard-Gallon D. 2016. Molecular and Epigenetic Biomarkers in Luminal Androgen Receptor: A Triple Negative Breast Cancer Subtype. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*. 20(10):610-613.

Kabsch W. 2010. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 66(2):133-144.

Karplus M & McCammon JA. 2002. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology*. 9(9):646-652.

Khanim F, Davies N, Veliça P, Hayden R, Ride J, Pararasa C, Chong MG, Gunther U, Veerapen N, Winn P, Farmer R, Trivier E, Rigoreau L, Drayson M, Bunce C. 2014. Selective AKR1C3 inhibitors do not recapitulate the anti-leukaemic activities of the pan-AKR1C inhibitor medroxyprogesterone acetate. *British Journal of Cancer*. 110(6):1506-1516.

Kuang LJ, Chen SX, Huang Y, Luo WJ, Jiang HH, Hu QH, Zhang PF, Yi H. 2006. Proteomics-based identification of secreted protein dihydrodiol dehydrogenase as a novel serum markers of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 54(1):87-94.

Lackie J. 2010. A dictionary of biomedicine. Oxford University Press, Oxford, UK.

Lengauer T, Rarey M. 1996. Computational methods for biomolecular docking. *Current Opinion in Structural Biology*. 6(3):402-406.

Lewis MJ, Wiebe JP, Heathcote JG. 2004. Expression of progesterone metabolizing enzyme genes (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A2) is altered in human breast carcinoma. *BMC Cancer*. 4(1):27.

- Li T & Chiang JY. 2012. Bile acid signaling in liver metabolism and diseases. *Journal of lipids*.
- Li T & Chiang, JY. 2014. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. *Pharmacological Reviews*. 66(4):48-983.
- Li WW, Baker N, Baldrige K, McCammon JA, Ellisman MH, Gupta A, Holst M, McCulloch AD, Michailova A, Papadopoulos P, Olson A, Sanner M, Arzberger PW. 2006. National Biomedical Computation Resource (NBCR): developing end-to-end cyberinfrastructure for multiscale modeling in biomedical research. *CTWatch Quarterly*. 2(3).
- Liedtke AJ, Adeniji AO, Chen M, Byrns MC, Jin Y, Christianson DW, Marnett LJ, Penning TM. 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.
- Lovering AL, Ride JP, Bunce CM, Desmond JC, Cummings SM, White SA. 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.
- Mayerhöfer TG, Popp J. 2019. Beer's law derived from electromagnetic theory. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 215:345-347.
- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. 2007. Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*. 40(4):658-674.
- Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. 2011. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*. 7(2):146-157.
- Miller WL & Auchus RJ. 2011. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*. 32(1):81-151.
- Möller G, Deluca D, Gege C, Rosinus A, Kowalik D, Peters O, Droscher P, Elger W, Adamski J, 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.
- Mori S & Barth HG. 2013. Size exclusion chromatography. Springer Science & Business Media, Berlin, Germany.
- Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ. 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*. 19(14):1639-1662.
- Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. 2009. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*. 16:2785-91.

- Murshudov GN, Skubák P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, Winn MD, Long F, Vagin AA. 2011. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 67(4):355-367.
- Nahoum V, Gangloff A, Legrand P, Zhu DW, Cantin L, Zhorov BS, Van LT, Labrie F, Breton R, Lin SX. 2001. Structure of the human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 in complex with testosterone and NADP at 1.25-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*. 276(45):42091-42098.
- Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. 2008. Lehninger principles of biochemistry. Macmillan, New York, NY.
- Nelson LR & Bulun SE. 2001. Estrogen production and action. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 45(3):S116-S124.
- Nelson MT, Humphrey W, Gursoy A, Dalke A, Kalé LV, Skeel RD, Schulten K. 1996. NAMD: a parallel, object-oriented molecular dynamics program. *The International Journal of Supercomputer Applications and High Performance Computing*. 10(4):251-268.
- Nettleship JE, Brown J, Groves MR, Geerlof A. 2008. Methods for protein characterization by mass spectrometry, thermal shift (ThermoFluor) assay, and multiangle or static light scattering in Structural Proteomics. Humana Press. Totowa, NJ.
- Oppermann U. 2007. Carbonyl reductases: the complex relationship of mammalian carbonyl and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 47:293-322.
- Ordóñez-Morán P & Muñoz A. 2009. Nuclear receptors: genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle*. 8(11):1675-1680.
- Pan BF & Nelson JA. 2007. Dihydrodiol dehydrogenase in drug resistance and sensitivity of human carcinomas. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 59:697-702.
- Pecorino L. 2012. Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics. Oxford University press, Oxford, UK.
- Pedretti A, Villa L, Vistoli G. 2003. Atom-type description language: a universal language to recognize atom types implemented in the VEGA program. *Theoretical Chemistry Accounts*. 109:229-232.
- Penning TM, Burczynski ME, Jez JM, Hung CF, Lin HK, Ma H, Moore M, Palackal N, 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. *Biochemical Journal*. 351(1):67-77.
- Penning TM, Jonnalagadda S, Trippier PC, Rižner TL. 2021. Aldo-Keto Reductases and Cancer Drug Resistance. *Pharmacological Reviews*. 73(3):1150-1171.

- Penning TM. 2015. The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-Biological Interactions*. 234:236-246.
- pET System Manual, Novagen, <https://www.merckmillipore.com/>
- Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, Skeel RD, Kalé L, Schulten, K. 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*. 26(16):1781-1802.
- Pinna G. 2020. Allopregnanolone, the neuromodulator turned therapeutic agent: thank you, next? *Frontiers in Endocrinology*. 11:236.
- Pippione AC, Carnovale IM, Bonanni D, Sini M, Goyal P, Marini E, Pors K, Adinolfi S, Zonari D, Festuccia C, Wahlgren WY, Friemann R, Bagnati R, Boschi D, Oliaro-Bosso S, Lolli ML. 2018. Potent and selective aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) inhibitors based on the benzoisoxazole moiety: application of a bioisosteric scaffold hopping approach to flufenamic acid. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 150:930-945.
- Plavša JJ, Řezáčová P, Kugler M, Pachl P, Brynda J, Voburka Z, Čelić A, Petri ET, 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):300-306.
- Project CC. 1994. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*. 50(Pt 5):760-763.
- Qiu W, Zhou M, Mazumdar M, Azzi A, Ghanmi D, Labrie F, Lin SX. 2007. Structure-based inhibitor design for an enzyme that binds different steroids: a potent inhibitor for human type 5 17β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*. 282(11): 8368-8379.
- R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rawla P. 2019. Epidemiology of prostate cancer. *World Journal of Oncology*. 10(2):63.
- Reddy DS, Rogawski MA. 2002. Stress-induced deoxycorticosterone-derived neurosteroids modulate GABA(A) receptor function and seizure susceptibility. *The Journal of Neuroscience*. 22(9):3795-805.
- Ren J, Williams N, Clementi L, Krishnan S, Li WW. 2010. Opal web services for biomedical applications. *Nucleic Acids Research*. 38:724-731.
- Rhodes G. 2006. Crystallography made crystal clear: a guide for users of macromolecular models. Elsevier/Academic Press, Amsterdam, Netherlands.
- Ricciotti E & Fitzgerald GA. 2011. Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 31(5):986-1000.
- Rižner TL & Penning TM. 2014. Role of aldo-keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism. *Steroids*. 79:49-63.

- Rosano GL & Ceccarelli EA. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. 5:172.
- Rupp B. 2009. Biomolecular crystallography: Principles, practice, and application to structural biology. Garland Science, New York, NY.
- Sands DE. 1993. Introduction to crystallography. Courier Corporation, Chelmsford, MA.
- Schlegel BP, Jez JM, Penning TM. 1998. Mutagenesis of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase reveals a “push-pull” mechanism for proton transfer in aldo-keto reductases. *Biochemistry*. 37:3538-3548.
- Schuster D, Kowalik D, Kirchmair J, Laggner C, Markt P, Aebischer-Gumy C, Ströhle F, Möller G, Wolber G, Wilckens T, Langer T, Odermatt A, 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.
- Sherbet DP, Papari-Zareei M, Khan N, Sharma KK, Brandmaier A, Rambally S, Chattopadhyay A, Andersson S, Agarwal AK, Auchus RJ. 2007. Cofactors, redox state, and directional preferences of hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 265:83-88.
- Shiiba M, Yamagami H, Yamamoto A, Minakawa Y, Okamoto A, Kasamatsu A, Sakamoto Y, Uzawa K, Takiguchi Y, Tanzawa, H. 2017. Mefenamic acid enhances anticancer drug sensitivity via inhibition of aldo-keto reductase 1C enzyme activity. *Oncology reports*. 37(4):2025-2032.
- Shirato A, Kikugawa T, Miura N, Tanji N, Takemori N, Higashiyama S, Yokoyama M. 2014. Cisplatin resistance by induction of aldo-keto reductase family 1 member C2 in human bladder cancer cells. *Oncology letters*. 7(3):674-678.
- Shoichet BK, McGovern SL, Wei B, Irwin JJ. 2002. Lead discovery using molecular docking. *Current Opinion in Chemical Biology*. 6(4):439-446.
- Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed K, Jones M. 2002. Aromatase – a brief overview. *Annual Review of Physiology*. 64(1):93-127.
- SnapGene software, Insightful Science, <http://www.snapgene.com/>
- Sottriffer CA, Krämer O, Klebe G. 2004. Probing flexibility and “induced-fit” phenomena in aldose reductase by comparative crystal structure analysis and molecular dynamics simulations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 56(1):52-66.
- Staels B & Fonseca VA. 2009. Bile acids and metabolic regulation: mechanisms and clinical responses to bile acid sequestration. *Diabetes Care*. 32(suppl 2):S237-S245.
- Stecklebroeck S, Oyesanmi B, Jin Y, Lee SH, Kloosterboer HJ, Penning TM. 2006. Tibolone metabolism in human liver is catalyzed by 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities of the four isoforms of the aldo-keto reductase (AKR) 1C subfamily. *Journal of*

Pharmacology and Experimental Therapeutics. 316(3):1300-1309.

- Steiner RA, Lebedev AA, Murshudov GN. 2003. Fisher's information in maximum-likelihood macromolecular crystallographic refinement. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 59(12):2114-2124.
- Sulkowski E. 1985. Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*. 3(1):1-7.
- Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Shi W, Jiang J, Yao PP, Zhu HP. 2017. Risk factors and preventions of breast cancer. *International Journal of Biological Sciences*. 13(11):1387.
- Škorić DD, Klisurić OR, Jakimov DS, Sakač MN, Csanádi JJ. 2021. Synthesis of new bile acid-fused tetrazoles using the Schmidt reaction. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 17(1):2611-2620.
- The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger LLC., <https://pymol.org/2/>
- Trauger JW, Jiang A, Stearns BA, LoGrasso PV. 2002. Kinetics of allopregnanolone formation catalyzed by human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase type III (AKR1C2). *Biochemistry*. 41(45):13451-13459.
- Ugochukwu E, Smee C, Guo K, Lukacik P, Kavanagh K, Debreczeni JE, von Delft F, Weigelt J, Sundstrom M, Arrowsmith C, Edwards A, Oppermann U. 2006. Crystal structure of human 3-alpha hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase (AKR1C4) complexed with NADP+. *To be published*.
- Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, Kundu S, Zhong S, Shim JE, Darian E, Guvench O, Lopes P, Vorobyov I, MacKerell Jr. AD. 2010. CHARMM General Force Field (CGenFF): A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry*. 31:671-90.
- Vargo-Gogola T & Rosen JM. 2007. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature Reviews Cancer*. 7(9):659-672.
- Veitch ZW, Guo B, Hembruff SL, Bewick AJ, Heibein AD, Eng J, Cull S, Maclean DA, Parissenti AM. 2009. Induction of 1C aldoketoreductases and other drug dose-dependent genes upon acquisition of anthracycline resistance. *Pharmacogenetics and genomics*. 19(6):477-488.
- Veliça P, Davies NJ, Rocha PP, Schrewe H, Ride JP, Bunce CM. 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):1-12.
- Veliça P. 2010. Comparison of human and mouse AKR1C enzymes: implications for modeling human cancer (*Ph.D. thesis*).
- Very Simple IC50 Tool Kit – Calculate, Measure, Determine IC50 Online, <http://www.ic50.tk/>.
- Wakabayashi I, Yasui K. 2000. Wogonin inhibits inducible prostaglandin E(2) production in macrophages. *European Journal of Pharmacology*. 406:477-81.

- Wang HW, Lin CP, Chiu JH, Chow KC, Kuo KT, Lin CS, Wang LS. 2007. Reversal of inflammation-associated dihydrodiol dehydrogenases (AKR1C1 and AKR1C2) overexpression and drug resistance in nonsmall cell lung cancer cells by wogonin and chrysin. *International Journal of Cancer*. 120(9):2019-2027.
- Weinberg RA & Hanahan D. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100(1):57-70.
- Woo KJ, Jeong YJ, Inoue H, Park JW, Kwon TK. 2005. Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA-binding activity. *FEBS Letters*. 579:705-11.
- Yammine A, Gao J, Kwan AH. 2019. Tryptophan Fluorescence Quenching Assays for Measuring Protein-ligand Binding Affinities: Principles and a Practical Guide. *Bio-Protocol*. 9(11):e3253.
- Yosaatmadja Y, Flanagan JU, Squire CJ. 2006. Structural basis of NSAID selectivity for the aldo-keto reductase 1C family. *To be published*.
- Zeng CM, Chang LL, Ying MD, Cao J, He QJ, Zhu H, Yang B. 2017. Aldo-keto reductase AKR1C1-AKR1C4: functions, regulation, and intervention for anti-cancer therapy. *Frontiers in Pharmacology*. 8:119.
- Zhang B, Hu XJ, Wang XQ, Thériault JF, Zhu DW, Shang P, Labrie F, Lin SX. 2016. Human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase type 3: structural clues of 5 α -DHT reverse binding and enzyme down-regulation decreasing MCF7 cell growth. *Biochemical Journal*. 473(8):1037-1046.
- Zhang B, Zhu DW, Hu XJ, Zhou M, Shang P, Lin SX. 2014. Human 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (3 α -HSD3): the V54L mutation restricting the steroid alternative binding and enhancing the 20 α -HSD activity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 141:135-143.
- Zhang S & Cahalan MD. 2007. Purifying plasmid DNA from bacterial colonies using the QIAGEN Miniprep Kit. *Journal of Visualized Experiments*. 6:e247.
- Zoete V, Cuendet MA, Grosdidier A, Michielin O. 2011. SwissParam, a Fast Force Field Generation Tool For Small Organic Molecules. *Journal of Computational Chemistry*. 32(11):2359-68.

ПРИЛОГ 1

Листа скраћеница коришћених у дисертацији

AIF (*енгл.* apoptosis induction factor) – фактор за индукцију апоптозе

АКР – суперфамилија алдо-кето редуктаза

АКР1 – породица алдо-кето редуктаза 1

АКР1Б – потпородица алдо-кето редуктаза 1Б

АКР1Ц – потпородица алдо-кето редуктаза 1Ц

ARE (*енгл.* antioxidant response element) – секвенца ДНК која препознаје антиоксидансе

BSA (*енгл.* bovine serum albumin) – говеђи серумски албумин

СОХ-2 (*енгл.* cyclooxygenase 2) – циклооксигеназа типа 2

ЦНС – централни нервни систем

DTT – дитиотреитол

EDTA – етилендиаминтетрасирћетна киселина

EndA1 – бактеријска ендонуклеаза 1

ФАСТА / FASTA – формат приказивања секвенце аминокиселина или нуклеотида

FPLC (*енгл.* fast protein liquid chromatography) – течна хроматографија ниског притиска

FXR (*енгл.* farnesoid X receptor) – фарнезоидни X рецептор

ГАБА – γ -аминобутерна киселина

GPCR (*енгл.* G-protein coupled receptor) – рецептор везан са G протеином

HEPES – 4-(2-хидроксиетил)-1-пиперазинетан сулфонска киселина

HER2 (*енгл.* human epidermal growth factor receptor 2) – рецептор за хумани епидермални фактор раста 2

IC50 – концентрација лиганда при којој се постиже 50% инхибиције биолошке активности или процеса

IL-6 – интерлеукин 6

IPTG (*енгл.* isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)

ЈАК киназе (*енгл.* JAK – Janus kinase)

Лас оперон, LacA, LacY, LacZ, LacUV5 – лактозни оперон, гени под његовом контролом чији производи регулишу метаболизам лактозе, мутирани лактозни промотер

LacZ Δ M15 – парцијална делеција LacZ гена

Lon – бактеријска цитоплазматска протеаза активирана стресом

МАР киназе (*енгл.* MAPK – mitogen activated protein kinase)

MCS (*енгл.* multiple cloning site) – место вишеструког клонирања или полилинкер на вектору, секвенца која садржи места препознавања за више рестрикционих ендонуклеаза

MPD – 2-метил-2,4-пентадиол

NAD(P) – никотинамид аденин динуклеотид (фосфат)

НМДА – Н-метил-Д-аспартат

Nrf2 (*енгл.* nuclear factor erythroid 2-related factor 2) – транскрипциони фактор типа 2 повезан са нуклеарним еритроидним фактором 2

NSAID (*енгл.* non-steroidal anti-inflammatory drugs) – нестероидни противупални лекови

NVT – систем у коме су константни број молекула, запремина система и температура

NVE – систем у коме су константни број молекула, запремина система и енергија

NPT – систем у коме су константни број молекула, притисак система и температура

ompT (*енгл.* outer membrane protein protease VII) – бактеријска мембранска протеаза

PCR (*енгл.* polymerase chain reaction) – ланчана реакција полимеразе

PCT (*енгл.* pre-crystallization test) – прекристализацијски тест

ПДБ (*енгл.* PDB – Protein Data Bank)

PEG (*енгл.* polyethylene glycol) – полиетиленгликол

ПГ Х2/Ф2/Д2 (*енгл.* PG H2/F2/D2) – простагландини Х2/Ф2/Д2

PI3K – фосфатидилинозитол-3 киназе (*енгл.* phosphatidylinositol 3-kinase)

PKC – протеин киназа Ц (*енгл.* protein kinase C)

PQ – фенантренхинон

PSA (*енгл.* prostate specific antigen) – антиген специфичан за простату

PXR (*енгл.* pregnane X receptor) – прегнански X рецептор

RecA1 – бактеријска рекомбиназа 1

RMSD (*енгл.* root mean square deviation) – корен средњег квадратног одступања

RMSF (*енгл.* root mean square fluctuation) – промена RMSD током времена

SDS-PAGE (*енгл.* sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) – електрофореза на полиакриламидном гелу са натријум додецил сулфатом

СП 1/2/3 (*енгл.* SP – steroid pocket 1/2/3) – стероидни џеп активног места АКР1Ц

ССРИ / SSRI (*енгл.* selective serotonin reuptake inhibitors) – селективни инхибитори преузимања серотонина

ТЕМЕД – тетраметиленетилендиамин

ТИМ буренце (*енгл.* TIM barrel – triose isomerase barrel)

VDR (*енгл.* vitamin D receptor) – рецептор за Д витамин

11βПГФ2α (*енгл.* 11βPGF2α) – 11β простагландин Ф2α

17 β ХСД-5 – 17 β хидроксистероид дехидрогеназа типа 5

20 α ХСД – 20 α хидроксистероид дехидрогеназа

3 α ХСД-1 – 3 α -хидроксистероид дехидрогеназа типа 1

3 α ХСД-3 – 3 α -хидроксистероид дехидрогеназа типа 3

Скраћенице аминокиселина:

амино-киселина	трословна	једнословна
аланин	Ala	A
аргинин	Arg	R
аспарагин	Asn	N
аспартат	Asp	D
цистеин	Cys	C
глутамат	Glu	E
глутамин	Gln	Q
глицин	Gly	G
хистидин	His	H
изолеуцин	Ile	I
леуцин	Leu	L
лизин	Lys	K
метионин	Met	M
фенилаланин	Phe	F
пролин	Pro	P
серин	Ser	S
треонин	Thr	T
триптофан	Trp	W
тирозин	Tyr	Y
валин	Val	V

ПРИЛОГ 2

Компоненте смеша у комерцијално доступним комплетима који су коришћени за тзв. *shotgun* кристализацију 17βХСД-5 и покушаје кристализације 3αХСД-3. Експерименти су рађени методом дифузије испаравањем, при чему су у седећој капљици тестирани односи смеше за кристализацију и протеина 1:1, 1:2 и 2:1.

PEGs Suite I, Qiagen, <https://www.qiagen.com/>

смеша	со	пуфер	преципитант
A1		0.1 M Na-acetate pH 4.6	40 %(v/v) PEG 200
A2		0.1 M Na-acetate pH 4.6	30 %(v/v) PEG 300
A3		0.1 M Na-acetate pH 4.6	30 %(v/v) PEG 400
A4		0.1 M Na-acetate pH 4.6	25 %(v/v) PEG 550 MME
A5		0.1 M Na-acetate pH 4.6	25 %(w/v) PEG 1000
A6		0.1 M Na-acetate pH 4.6	25 %(w/v) PEG 2000 MME
A7		0.1 M MES pH 6.5	40 %(v/v) PEG 200
A8		0.1 M MES pH 6.5	30 %(v/v) PEG 300
A9		0.1 M MES pH 6.5	30 %(v/v) PEG 400
A10		0.1 M MES pH 6.5	25 %(v/v) PEG 550 MME
A11		0.1 M MES pH 6.5	25 %(w/v) PEG 1000
A12		0.1 M MES pH 6.5	25 %(w/v) PEG 2000 MME
B1		0.1 M Na-HEPES pH 7.5	40 %(v/v) PEG 200
B2		0.1 M Na-HEPES pH 7.5	30 %(v/v) PEG 300
B3		0.1 M Na-HEPES pH 7.5	30 %(v/v) PEG 400
B4		0.1 M Na-HEPES pH 7.5	25 %(v/v) PEG 550 MME
B5		0.1 M Na-HEPES pH 7.5	25 %(w/v) PEG 1000
B6		0.1 M Na-HEPES pH 7.5	25 %(w/v) PEG 2000 MME
B7		0.1 M TRIS HCl pH 8.5	40 %(v/v) PEG 200
B8		0.1 M TRIS HCl pH 8.5	30 %(v/v) PEG 300
B9		0.1 M TRIS HCl pH 8.5	30 %(v/v) PEG 400
B10		0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	25 %(v/v) PEG 550 MME
B11		0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	25 %(w/v) PEG 1000
B12		0.1 M TRIS HCl pH 8.5	25 %(w/v) PEG 2000 MME
C1		0.1 M Na-acetate pH 4.6	25 %(w/v) PEG 3000
C2		0.1 M Na-acetate pH 4.6	25 %(w/v) PEG 4000
C3		0.1 M Na-acetate pH 4.6	25 %(w/v) PEG 6000
C4		0.1 M Na-acetate pH 4.6	25 %(w/v) PEG 8000
C5		0.1 M Na-acetate pH 4.6	20 %(w/v) PEG 10000
C6		0.1 M Na-acetate pH 4.6	15 %(w/v) PEG 20000
C7		0.1 M MES pH 6.5	25 %(w/v) PEG 3000
C8		0.1 M MES pH 6.5	25 %(w/v) PEG 4000
C9		0.1 M MES pH 6.5	25 %(w/v) PEG 6000
C10		0.1 M MES pH 6.5	25 %(w/v) PEG 8000
C11		0.1 M MES pH 6.5	20 %(w/v) PEG 10000
C12		0.1 M MES pH 6.5	15 %(w/v) PEG 20000
D1		0.1 M Na-HEPES pH 7.5	25 %(w/v) PEG 3000
D2		0.1 M Na-HEPES pH 7.5	25 %(w/v) PEG 4000
D3		0.1 M Na-HEPES pH 7.5	25 %(w/v) PEG 6000
D4		0.1 M Na-HEPES pH 7.5	25 %(w/v) PEG 8000
D5		0.1 M Na-HEPES pH 7.5	20 %(w/v) PEG 10000
D6		0.1 M Na-HEPES pH 7.5	15 %(w/v) PEG 20000

D7		0.1 M TRIS HCl pH 8.5	25 %(w/v) PEG 3000
D8		0.1 M TRIS HCl pH 8.5	25 %(w/v) PEG 4000
D9		0.1 M TRIS HCl pH 8.5	25 %(w/v) PEG 6000
D10		0.1 M TRIS HCl pH 8.5	25 %(w/v) PEG 8000
D11		0.1 M TRIS HCl pH 8.5	20 %(w/v) PEG 10000
D12		0.1 M TRIS HCl pH 8.5	15 %(w/v) PEG 20000
E1	0.2 M Na-fluoride		20 %(w/v) PEG 3350
E2	0.2 M K-fluoride		20 %(w/v) PEG 3350
E3	0.2 M NH ₄ -fluoride		20 %(w/v) PEG 3350
E4	0.2 M Li-chloride		20 %(w/v) PEG 3350
E5	0.2 M Mg-chloride		20 %(w/v) PEG 3350
E6	0.2 M Na-chloride		20 %(w/v) PEG 3350
E7	0.2 M Ca-chloride		20 %(w/v) PEG 3350
E8	0.2 M K-chloride		20 %(w/v) PEG 3350
E9	0.2 M NH ₄ -chloride		20 %(w/v) PEG 3350
E10	0.2 M Na-iodide		20 %(w/v) PEG 3350
E11	0.2 M K-iodide		20 %(w/v) PEG 3350
E12	0.2 M NH ₄ -iodide		20 %(w/v) PEG 3350
F1	0.2 M Na-thiocyanate		20 %(w/v) PEG 3350
F2	0.2 M K-thiocyanate		20 %(w/v) PEG 3350
F3	0.2 M Li-nitrate		20 %(w/v) PEG 3350
F4	0.2 M Mg-nitrate		20 %(w/v) PEG 3350
F5	0.2 M Na-nitrate		20 %(w/v) PEG 3350
F6	0.2 M K-nitrate		20 %(w/v) PEG 3350
F7	0.2 M NH ₄ -nitrate		20 %(w/v) PEG 3350
F8	0.2 M Mg-formate		20 %(w/v) PEG 3350
F9	0.2 M Na-formate		20 %(w/v) PEG 3350
F10	0.2 M K-formate		20 %(w/v) PEG 3350
F11	0.2 M NH ₄ -formate		20 %(w/v) PEG 3350
F12	0.2 M Li-acetate		20 %(w/v) PEG 3350
G1	0.2 M Mg-acetate		20 %(w/v) PEG 3350
G2	0.2 M Zn-acetate		20 %(w/v) PEG 3350
G3	0.2 M Na-acetate		20 %(w/v) PEG 3350
G4	0.2 M Ca-acetate		20 %(w/v) PEG 3350
G5	0.2 M K-acetate		20 %(w/v) PEG 3350
G6	0.2 M NH ₄ -acetate		20 %(w/v) PEG 3350
G7	0.2 M Li-sulfate		20 %(w/v) PEG 3350
G8	0.2 M Mg-sulfate		20 %(w/v) PEG 3350
G9	0.2 M Na-sulfate		20 %(w/v) PEG 3350
G10	0.2 M K-sulfate		20 %(w/v) PEG 3350
G11	0.2 M NH ₄ -sulfate		20 %(w/v) PEG 3350
G12	0.2 M di-Na-tartrate		20 %(w/v) PEG 3350
H1	0.2 M K/Na-tartrate		20 %(w/v) PEG 3350
H2	0.2 M di-NH ₄ -tartrate		20 %(w/v) PEG 3350
H3	0.2 M Na-phosphate		20 %(w/v) PEG 3350
H4	0.2 M di-Na-phosphate		20 %(w/v) PEG 3350
H5	0.2 M K-phosphate		20 %(w/v) PEG 3350
H6	0.2 M di-K-phosphate		20 %(w/v) PEG 3350
H7	0.2 M NH ₄ -phosphate		20 %(w/v) PEG 3350
H8	0.2 M di-NH ₄ -phosphate		20 %(w/v) PEG 3350
H9	0.2 M tri-Li-citrate		20 %(w/v) PEG 3350
H10	0.2 M tri-Na-citrate		20 %(w/v) PEG 3350
H11	0.2 M tri-K-citrate		20 %(w/v) PEG 3350
H12	0.18 M tri-NH ₄ -citrate		20 %(w/v) PEG 3350

PEGs Suite II, Qiagen, <https://www.qiagen.com/>

смеша	соли	пуфер	преципитанти	
A1	0.1 M Ca-chloride	0.1 M Na-acetate pH 4.6	15 %(w/v) PEG 400	
A2		0.1 M MES pH 6.5	15 %(w/v) PEG 400	
A3	0.2 M Mg-chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	15 %(w/v) PEG 400	
A4	0.2 M tri-Na-citrate	0.1 M TRIS pH 8.5	15 %(w/v) PEG 400	
A5	0.1 M Mg-chloride	0.1 M Na-acetate pH 4.6	25 %(w/v) PEG 400	
A6	0.2 M Li-sulfate	0.1 M TRIS pH 8.5	25 %(w/v) PEG 400	
A7	0.2 M Ca-chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	28 %(w/v) PEG 400	
A8	0.1 M Ca-chloride	0.1 M Na-acetate pH 4.6	30 %(w/v) PEG 400	
A9	0.1 M Na-acetate	0.1 M MES pH 6.5	30 %(w/v) PEG 400	
A10	0.1 M Mg-chloride	0.1 M MES pH 6.5	30 %(w/v) PEG 400	
A11	0.2 M Mg-chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	30 %(w/v) PEG 400	
A12	0.2 M tri-Na-citrate	0.1 M TRIS pH 8.5	30 %(w/v) PEG 400	
B1	0.1 M Na-chloride	0.1 M BICINE pH 9.0	30 %(w/v) PEG 550 MME	
B2	0.01 M Zn-sulfate	0.1 M MES pH 6.5	25 %(w/v) PEG 550 MME	
B3		0.1 M HEPES pH 7.5	25 %(w/v) PEG 1000	
B4		0.1 M TRIS pH 8.5	30 %(w/v) PEG 1000	
B5			15 %(w/v) PEG 1500	
B6		0.1 M HEPES pH 7.5	20 %(w/v) PEG 1500	
B7			30 %(w/v) PEG 1500	
B8	0.01 M Ni-chloride	0.1 M TRIS pH 8.5	20 %(w/v) PEG 2000 MME	
B9			25 %(w/v) PEG 2000 MME	
B10	0.1 M Na-acetate	0.1 M MES pH 6.5	30 %(w/v) PEG 2000 MME	
B11	0.2 M Na-acetate	0.1 M HEPES pH 7.5	20 %(w/v) PEG 3000	
B12	0.2 M Li-sulfate	0.1 M TRIS pH 8.5	30 %(w/v) PEG 3000	
C1		0.1 M Na-acetate pH 4.6	4 %(w/v) PEG 4000	
C2			8 %(w/v) PEG 4000	
C3		0.1 M Na-acetate pH 4.6	8 %(w/v) PEG 4000	
C4	0.2 M Mg-chloride	0.1 M MES pH 6.5	10 %(w/v) PEG 4000	
C5	0.1 M Na-acetate	0.1 M HEPES pH 7.5	12 %(w/v) PEG 4000	
C6		0.1 M TRIS pH 8.5	12 %(w/v) PEG 4000	
C7	0.2 M Li-sulfate	0.1 M TRIS pH 8.5	16 %(w/v) PEG 4000	
C8	0.2 M Na-acetate	0.1 M TRIS pH 8.5	16 %(w/v) PEG 4000	
C9	0.2 M Mg-chloride	0.1 M TRIS pH 8.5	16 %(w/v) PEG 4000	
C10		0.1 M Na-acetate pH 4.6	18 %(w/v) PEG 4000	
C11	0.2 M Li-sulfate	0.1 M TRIS pH 8.5	20 %(w/v) PEG 4000	
C12	0.2 M Ca-chloride	0.1 M TRIS pH 8.5	20 %(w/v) PEG 4000	
D1	0.1 M Na-acetate	0.1 M HEPES pH 7.5	22 %(w/v) PEG 4000	
D2		0.1 M Na-acetate pH 4.6	25 %(w/v) PEG 4000	
D3	0.2 M Mg-chloride	0.1 M MES pH 6.5	25 %(w/v) PEG 4000	
D4	0.2 M Ca-chloride	0.1 M TRIS pH 8.5	25 %(w/v) PEG 4000	
D5			30 %(w/v) PEG 4000	
D6	0.1 M Mg-chloride	0.1 M Na-acetate pH 4.6	30 %(w/v) PEG 4000	
D7		0.1 M MES pH 6.5	30 %(w/v) PEG 4000	
D8	0.2 M Ca-chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	30 %(w/v) PEG 4000	
D9	0.2 M Li-sulfate	0.1 M TRIS pH 8.5	30 %(w/v) PEG 4000	
D10	0.2 M Na-acetate	0.1 M TRIS pH 8.5	30 %(w/v) PEG 4000	
D11	0.2 M Mg-chloride	0.1 M TRIS pH 8.5	30 %(w/v) PEG 4000	
D12			35 %(w/v) PEG 4000	
E1		0.1 M TRIS pH 8.5	8 %(w/v) PEG 4000	0.8 M Li-chloride
E2			10 %(w/v) PEG 4000	20 %(w/v) Isopropanol
E3		0.1 M tri-Na-citrate pH 5.6	10 %(w/v) PEG 4000	10 %(w/v) Isopropanol

E4			0.1 M HEPES pH 7.5	10 %(w/v) PEG 4000	5 %(w/v) Isopropanol
E5			0.1 M HEPES pH 7.5	10 %(w/v) PEG 4000	20 %(w/v) Isopropanol
E6	0.2 M NH4-sulfate		0.1 M Na- acetate pH 4.6	12 %(w/v) PEG 4000	
E7	0.2 M NH4-sulfate			15 %(w/v) PEG 4000	
E8	0.2 M NH4-sulfate		0.1 M tri-Na-citrate pH 5.6	15 %(w/v) PEG 4000	
E9	0.2 M NH4-sulfate		0.1 M HEPES pH 7.5	16 %(w/v) PEG 4000	10 %(w/v) Isopropanol
E10	0.2 M NH4-sulfate			20 %(w/v) PEG 4000	
E11	0.2 M Mg-sulfate			20 %(w/v) PEG 4000	10 %(w/v) Glycerol
E12	0.1 M tri-Na-citrate			20 %(w/v) PEG 4000	5 %(w/v) Isopropanol
F1	0.1 M tri-Na-citrate			20 %(w/v) PEG 4000	20 %(w/v) Isopropanol
F2			0.1 M MES pH 6.5	20 %(w/v) PEG 4000	0.6 M Na-chloride
F3			0.1 M HEPES pH 7.5	20 %(w/v) PEG 4000	10 %(w/v) Isopropanol
F4	0.2 M NH4-sulfate	0.1 M Na-acetate		22 %(w/v) PEG 4000	
F5	0.2 M NH4-sulfate		0.1 M Na-acetate pH 4.6	25 %(w/v) PEG 4000	
F6	0.2 M NH4-sulfate		0.1 M tri-Na-citrate pH 5.6	25 %(w/v) PEG 4000	
F7	0.2 M Li-sulfate	0.1 M Na-acetate	0.1 M HEPES pH 7.5	25 %(w/v) PEG 4000	
F8	0.1 M Na-acetate			25 %(w/v) PEG 4000	8 %(w/v) Isopropanol
F9	0.2 M NH4-sulfate			30 %(w/v) PEG 4000	
F10	0.2 M NH4-sulfate		0.1 M Na-acetate pH 4.6	30 %(w/v) PEG 4000	
F11	0.2 M NH4-sulfate		0.1 M Na-acetate-acetate pH 5.6	30 %(w/v) PEG 4000	
F12			0.1 M TRIS pH 8.5	32 %(w/v) PEG 4000	0.8 M Li-chloride
G1	0.2 M Li-sulfate		0.1 M TRIS pH 8.5	25 %(w/v) PEG 5000 MME	
G2	0.2 M NH4-sulfate		0.1 M MES pH 6.5	30 %(w/v) PEG 5000 MME	
G3	0.1 M K-chloride		0.1 M TRIS pH 8.5	3 %(w/v) PEG 6000	
G4	0.01 M Mg-chloride			10 %(w/v) PEG 6000	
G5	2.0 M Na-chloride			12 %(w/v) PEG 6000	
G6				15 %(w/v) PEG 6000	5 %(w/v) Glycerol
G7	0.05 M K-chloride	0.01 M Mg-chloride		15 %(w/v) PEG 6000	
G8	0.01 M tri-Na-citrate			16 %(w/v) PEG 6000	
G9			0.05 M Imidazole pH 8.0	20 %(w/v) PEG 6000	
G10	0.1 M Li-chloride		0.1 M HEPES pH 7.5	25 %(w/v) PEG 6000	
G11	0.5 M Li-chloride		0.1 M TRIS pH 8.5	28 %(w/v) PEG 6000	
G12	1.0 M Li-chloride	0.1 M Na-acetate		30 %(w/v) PEG 6000	
H1	0.01 M tri-Na-citrate			33 %(w/v) PEG 6000	
H2	0.5 M Li- sulfate			2 %(w/v) PEG 8000	
H3	1.0 M Li-sulfate			2 %(w/v) PEG 8000	
H4				4 %(w/v) PEG 8000	
H5	0.2 M Li-chloride	0.05 M Mg-sulfate		8 %(w/v) PEG 8000	
H6			0.1 M TRIS pH 8.5	8 %(w/v) PEG 8000	
H7	0.2 M Zn-acetate		0.1M Imidazole pH 6.5	10 %(w/v) PEG 8000	
H8	0.2 M Ca-acetate		0.1 M HEPES pH 7.5	10 %(w/v) PEG 8000	
H9	0.05 M Mg-acetate	0.1 M Na-acetate		10 %(w/v) PEG 8000	
H10	0.2 M Mg-acetate			10 %(w/v) PEG 8000	
H11			0.1 M HEPES pH 7.5	10 %(w/v) PEG 8000	10 %(w/v) Ethylene Glycol
H12				10 %(w/v) PEG 8000	10 %(w/v) PEG 1000

JCSG+, Molecular Dimensions, <https://www.moleculardimensions.com/>

смеша	со	буфер	pH	преципитант
A1	0.2 M Li-sulfate	0.1 M Na- acetate	4.5	50 % w/v PEG 400
A2		0.1 M Na- citrate	5.5	20 % w/v PEG 3000
A3	0.2 M NH4-citrate dibasic		-	20 % w/v PEG 3350
A4	0.02 M Ca-chloride dihydrate	0.1 M Na- acetate	4.6	30 % v/v MPD
A5	0.2 M Mg-formate dihydrate		-	20 % w/v PEG 3350

A6	0.2 M	Li-sulfate	0.1 M	Phosphate/citrate	4.2	20	% w/v	PEG 1000
A7			0.1 M	CHES	9.5	20	% w/v	PEG 8000
A8	0.2 M	NH4-formate			-	20	% w/v	PEG 3350
A9	0.2 M	NH4-chloride			-	20	% w/v	PEG 3350
A10	0.2 M	K-formate			-	20	% w/v	PEG 3350
A11	0.2 M	NH4-phosphate monobasic	0.1 M	Tris	8.5	50	% v/v	MPD
A12	0.2 M	K-nitrate			-	20	% w/v	PEG 3350
B1	0.8 M	NH4-sulfate	0.1 M	Citrate	4.0			
B2	0.2 M	Na-thiocyanate			-	20	% w/v	PEG 3350
B3			0.1 M	BICINE	9.0	20	% w/v	PEG 6000
B4			0.1 M	HEPES	7.5	10	% w/v	PEG 8000
						8	% v/v	Ethylene glycol
B5			0.1 M	Na- cacodylate	6.5	40	% v/v	MPD
						5	% w/v	PEG 8000
B6			0.1 M	Phosphate/citrate	4.2	40	% v/v	Ethanol
						5	% w/v	PEG 1000
B7			0.1 M	Na- acetate	4.6	8	% w/v	PEG 4000
B8	0.2 M	Mg-chloride hexahydrate	0.1 M	Tris	7.0	10	% w/v	PEG 8000
B9			0.1 M	Citrate	5.0	20	% w/v	PEG 6000
B10	0.2 M	Mg-chloride×6H ₂ O	0.1 M	Na- cacodylate	6.5	50	% v/v	PEG 200
B11	1.6 M	Na-citrate tribasic×2H ₂ O			6.5			
B12	0.2 M	K-citrate tribasic×H ₂ O			-	20	% w/v	PEG 3350
C1	0.2 M	Na-chloride	0.1 M	Phosphate/citrate	4.2	20	% w/v	PEG 8000
C2	1.0 M	Li-chloride	0.1 M	Citrate	4.0	20	% w/v	PEG 6000
C3	0.2 M	NH4-nitrate			-	20	% w/v	PEG 3350
C4			0.1 M	HEPES	7.0	10	% w/v	PEG 6000
C5	0.8 M	Na-phosphate monobasic×2H ₂ O	0.1 M	Na- HEPES	7.5			
	0.8 M	K-phosphate monobasic						
C6			0.1 M	Phosphate/citrate	4.2	40	% v/v	PEG 300
C7	0.2 M	Zn-acetate×2H ₂ O	0.1 M	Na- acetate	4.5	10	% w/v	PEG 3000
C8			0.1 M	Tris	8.5	20	% v/v	Ethanol
C9			0.1 M	Na-/K- phosphate	6.2	25	% v/v	1,2-Propanediol
						10	%v/v	Glycerol
C10			0.1 M	BICINE	9.0	10	% w/v	PEG 20,000
						2	% v/v	1,4-Dioxane
C11	2.0 M	NH4-sulfate	0.1 M	Na- acetate	4.6			
C12					-	10	% w/v	PEG 1000
						10	% w/v	PEG 8000
D1					-	24	% w/v	PEG 1500
						20	% v/v	Glycerol
D2	0.2 M	Mg- chloride×6H ₂ O	0.1 M	Na- HEPES	7.5	30	% v/v	PEG 400
D3	0.2 M	Na-chloride	0.1 M	Na-/K- phosphate	6.2	50	% v/v	PEG 200
D4	0.2 M	Li-sulfate	0.1 M	Na- acetate	4.5	30	% w/v	PEG 8000
D5			0.1 M	HEPES	7.5	70	% v/v	MPD
D6	0.2 M	Mg-chloride×6H ₂ O	0.1 M	Tris	8.5	20	% w/v	PEG 8000
D7	0.2 M	Li-sulfate	0.1 M	Tris	8.5	40	% v/v	PEG 400
D8			0.1 M	Tris	8.0	40	% v/v	MPD
D9	0.17 M	NH4-sulfate			-	26	% w/v	PEG 4000
						15	% v/v	Glycerol
D10	0.2 M	Ca-acetate×H ₂ O	0.1 M	Na- cacodylate	6.5	40	% v/v	PEG 300
D11	0.14 M	Ca-chloride×2H ₂ O	0.1 M	Na- acetate	4.6	14	% v/v	2-Propanol
						30	% v/v	Glycerol
D12	0.04 M	K-phosphate monobasic			-	16	% w/v	PEG 8000
						20	% v/v	Glycerol

E1	1.0 M	Na-citrate tribasic×2H ₂ O	0.1 M	Na- cacodylate	6.5				
E2	2.0 M	NH ₄ -sulfate	0.1 M	Na- cacodylate	6.5				
	0.2 M	Na-chloride							
E3	0.2 M	Na-chloride	0.1 M	HEPES	7.5	10	% v/v	2-Propanol	
E4	1.26 M	NH ₄ -sulfate	0.1 M	Tris	8.5				
	0.2 M	Li-sulfate							
E5			0.1 M	CAPS	10.5	40	% v/v	MPD	
E6	0.2 M	Zn-acetate×2H ₂ O	0.1 M	Imidazole	8.0	20	% w/v	PEG 3000	
E7	0.2 M	Zn- acetate×2H ₂ O	0.1 M	Na- cacodylate	6.5	10	% v/v	2-Propanol	
E8	1.0 M	NH ₄ -phosphate dibasic	0.1 M	Na- acetate	4.5				
E9	1.6 M	Mg-sulfate×7H ₂ O	0.1 M	MES	6.5				
E10			0.1 M	BICINE	9.0	10	% w/v	PEG 6000	
E11	0.16 M	Ca-acetate hydrate	0.1 M	Na- cacodylate	6.5	14	% w/v	PEG 8000/	
						20	% v/v	Glycerol	
E12			0.1 M	Imidazole	8.0	10	% w/v	PEG 8000	
F1	0.05 M	Cesium chloride	0.1 M	MES	6.5	30	% v/v	Jeffamine® M-600	
F2	3.2 M	NH ₄ -sulfate	0.1 M	Citrate	5.0				
F3			0.1 M	Tris	8.0	20	% v/v	MPD	
F4			0.1 M	HEPES	7.5	20	% v/v	Jeffamine M-600	
F5	0.2 M	Mg-chloride hexahydrate	0.1 M	Tris	8.5	50	% v/v	Ethylene glycol	
F6			0.1 M	BICINE	9.0	10	% v/v	MPD	
F7	0.8 M	Succinic acid			7.0				
F8	2.1 M	DL-Malic acid			7.0				
F9	2.4 M	Na-malonate dibasic×H ₂ O			7.0				
F10	1.1 M	Na-malonate dibasic×H ₂ O	0.1 M	HEPES	7.0	1	% v/v	Jeffamine ED-2003	
F11	1.0 M	Succinic acid	0.1 M	HEPES	7.0	1	% w/v	PEG 2000 MME	
F12			0.1 M	HEPES	7.0	30	% v/v	Jeffamine® M-600	
G1			0.1 M	HEPES	7.0	30	% v/v	Jeffamine® ED-2003	
G2	0.02 M	Mg-chloride×6H ₂ O	0.1 M	HEPES	7.5	22	% w/v	Poly(acrylic acid Na- salt) 5100	
G3	0.01 M	Cobalt(II)chloride×6H ₂ O	0.1 M	Tris	8.5	20	% w/v	Polyvinylpyrrolidone	
G4	0.2 M	TMAO	0.1 M	Tris	8.5	20	% w/v	PEG 2000 MME	
G5	0.2 M	Cobalt(II)chloride×6H ₂ O	0.1 M	HEPES	7.5	12	% w/v	PEG 3350	
	5 mM	Cadmium chloride×5H ₂ O							
	5 mM	Mg-chloride×6H ₂ O							
	5 mM	Nickel(II)chloride×6H ₂ O							
G6	5 mM	Na-malonate dibasic×H ₂ O			-	20	% w/v	PEG 3350	
G7	0.2 M	Succinic acid			-	15	% w/v	PEG 3350	
G8	0.1 M	DL-Malic acid			-	20	% w/v	PEG 3350	
G9	0.15 M	K-thiocyanate			-	30	% w/v	PEG 2000 MME	
G10	0.1 M	K-bromide			-	30	% w/v	PEG 2000 MME	
G11	0.15 M	NH ₄ -sulfate	0.1 M	Bis-Tris	5.5				
G12	2.0 M	Na-chloride	0.1 M	Bis-Tris	5.5				
H1	3.0 M	Mg-formate×2H ₂ O	0.1 M	Bis-Tris	5.5				
H2	0.3 M	NH ₄ -sulfate	0.1 M	Bis-Tris	5.5	1	% w/v	PEG 3350	
H3			0.1 M	Bis-Tris	5.5	25	% w/v	PEG 3350	
H4	1.0 M	Ca-chloride×2H ₂ O	0.1 M	Bis-Tris	5.5	45	% v/v	MPD	
H5	0.2 M	NH ₄ -acetate	0.1 M	Bis-Tris	5.5	45	% v/v	MPD	
H6	0.2 M	NH ₄ -acetate	0.1 M	Bis-Tris	5.5	17	% w/v	PEG 10,000	
H7	0.1 M	NH ₄ -sulfate	0.1 M	Bis-Tris	5.5	25	% w/v	PEG 3350	
H8	0.2 M	Na-chloride	0.1 M	Bis-Tris	5.5	25	% w/v	PEG 3350	
H9	0.2 M	Li-sulfate	0.1 M	Bis-Tris	5.5	25	% w/v	PEG 3350	
H10	0.2 M	NH ₄ -acetate	0.1 M	Bis-Tris	5.5	25	% w/v	PEG 3350	

H11	0.2 M	Mg-chloride×6H ₂ O	0.1 M	Bis-Tris	5.5	25	% v/v	PEG 3350
H12	0.2 M	NH ₄ -acetate	0.1 M	HEPES	7.5	45	% v/v	MPD

Morpheus, Molecular Dimensions, <https://www.moleculardimensions.com/>

смеша	лиганди		пуфер		pH	преципитант		
A1	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
A2	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
A3	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
A4	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 1	6.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
A5	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
A6	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
A7	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
A8	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 2	7.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
A9	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
A10	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
A11	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
A12	0.06 M	Divalents	0.1 M	Buffer System 3	8.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
B1	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
B2	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
B3	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
B4	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 1	6.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
B5	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
B6	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
B7	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
B8	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 2	7.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
B9	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
B10	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
B11	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
B12	0.09 M	Halogens	0.1 M	Buffer System 3	8.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
C1	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
C2	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
C3	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
C4	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 1	6.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
C5	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
C6	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
C7	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
C8	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 2	7.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
C9	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
C10	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
C11	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
C12	0.09 M	NPS	0.1 M	Buffer System 3	8.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
D1	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
D2	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
D3	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
D4	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 1	6.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
D5	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
D6	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
D7	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
D8	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 2	7.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
D9	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
D10	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2

D11	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
D12	0.12 M	Alcohols	0.1 M	Buffer System 3	8.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
E1	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
E2	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
E3	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
E4	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 1	6.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
E5	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
E6	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
E7	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
E8	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 2	7.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
E9	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
E10	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
E11	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
E12	0.12 M	Ethylene glycols	0.1 M	Buffer System 3	8.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
F1	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
F2	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
F3	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
F4	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 1	6.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
F5	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
F6	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
F7	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
F8	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 2	7.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
F9	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
F10	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
F11	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
F12	0.12 M	Monosaccharides	0.1 M	Buffer System 3	8.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
G1	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
G2	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
G3	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
G4	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 1	6.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
G5	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
G6	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
G7	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
G8	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 2	7.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
G9	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
G10	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
G11	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
G12	0.1 M	Carboxylic acids	0.1 M	Buffer System 3	8.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
H1	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
H2	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
H3	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 1	6.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
H4	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 1	6.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
H5	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
H6	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
H7	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 2	7.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
H8	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 2	7.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4
H9	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 1
H10	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 2
H11	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 3	8.5	30	% v/v	Precipitant Mix 3
H12	0.1 M	Amino acids	0.1 M	Buffer System 3	8.5	37.5	% v/v	Precipitant Mix 4

NPS - Nitrate Phosphate Sulfate

БИОГРАФИЈА КАНДИДАТА

Маја Мариновић је рођена 8. маја 1991. године у Врбасу. Основно и средње образовање стекла је у ОШ „Ђура Даничић" и гимназији „Јован Јовановић Змај" у Новом Саду. Основне студије биологије уписала је 2010. године на Природно-математичком факултету у Новом Саду и завршила 2014. године са просечном оценом 10.0. Мастер студије уписала је 2014. и завршила 2015. године са просечном оценом 10.0.



Маја се упознаје са истраживачким радом током средње школе, љубазношћу проф. др Силване Андрић и њених сарадника. Из ове сарадње произашли су мастер рад „Стрес ремети експресиони профил молекулских маркера митохондријалне биогенезе у стероидогеним ћелијама адултних мужјака пацова" и Изузетна награда Универзитета у Новом Саду за истраживачки рад студента.

Маја је награђивана за највишу просечну оцену током основних и мастер студија, а од Природно-математичког факултета проглашена је за најбољег студента генерације 2014. Добитница је стипендија фонда „Доситеја", Министарства просвете, науке и технолошког развоја, као и грантова ФЕБС-а, ЕМБО-а и организација при Чешкој академији наука за курсеве из области макромолекулске кристалографије.

Од 2015. године Маја је докторант на катедри за биохемију и молекуларну биологију под менторством проф. др Анђелке Ћелић. Тренутно је запослена као истраживач сарадник на пројекту „Синтеза, карактеризација и биолошка истраживања стероидних деривата и њихових молекулских агрегата" под руководством проф. др Марије Сакач.

Током докторских студија Маја је учествовала на неколико међународних пројеката тако да је део експерименталног рада обављала у Љубљани, Братислави, Прагу, Минску и Порту. Као докторант била је ангажована на практичној настави из неколико предмета из области биохемије и молекуларне биологије за студенте основних и мастер студија биологије и физике.

Коаутор је 4 рада и бројних саопштења на домаћим и међународним скуповима.

Маја се такмичи у дизању тегова и освајала је бројна домаћа, једно европско и једно светско првенство у категорији до 75 кг. Говори енглески и италијански језик.

Радови на којима је Маја коаутор:

Starovlah IM, Radovic SM, **Marinovic MA**, Kostic TS, Andric SA. 2017. Psychophysical stress disturbs expression of mitochondrial biogenesis markers in hypothalamus and adenohypophysis. *Biologia Serbica*. 39(2):43-51.

Bekić SS, **Marinović MA**, Petri ET, Sakač MN, Nikolić AR, Kojić VV, Ćelić AS. 2018. Identification of D-seco modified steroid derivatives with affinity for estrogen receptor α and β isoforms using a nontranscriptional fluorescent cell assay. *Steroids*. 130:22-30.

Kuzminac IZ, Jakimov DS, Bekić SS, Ćelić AS, **Marinović MA**, Savić MP, Raičević VN, Kojić VV, Sakač MN. 2021. Synthesis and anticancer potential of novel 5,6-oxygenated and/or halogenated steroidal D-homo lactones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 30:115935.

Marinović MA, Petri ET, Grbović LJ, Vasiljević B, Jovanović-Šanta S, Bekić SS, Ćelić AS. 2022. Investigation of the potential of bile acid methyl esters as inhibitors of aldo-keto reductase 1C2: insight from molecular docking, virtual screening, experimental assays and molecular dynamics. *Molecular informatics*.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Идентификација деривата жучних киселина као лиганада хумане рекомбинантне 3 α -хидроксистероид дехидрогеназе типа 3 (3 α ХСД-3) и структурне основе модулације ензимске активности, докторска дисертација
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
Природно-математички факултет Универзитета у Новом Саду Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић" у Београду Институт за органску хемију и биохемију Чешке академије наука у Прагу
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
„Синтеза, карактеризација и биолошка испитивања стероидних деривата и њихових молекулских агрегата“, ОИ 172021 "Development of structural methods to the study of pharmacologically active enzymes", мултилатерална сарадња Србија-Чешка-Словачка, DS 50 „Развој метода крисалографије протеина у Војводини“, АПВ Покрајински комитет за образовање, науку и технолошки развој, 142-451-3177/2020-03
1. Опис података
1.1. Врста студије Студија користи <i>in vitro</i> (есеји активности рекомбинантно експримираних протеина), <i>in silico</i> (симулације молекулског докинга и молекулске динамике) и кристалографске технике како би из библиотеке деривата жучних киселина издвојила потенцијалне инхибиторе 3 α хидроксистероид дехидрогеназе типа 3, проценила јачину и специфичност везивања испитиваних једињења, и предложила структурне основе протеин-лиганд интеракција. У сврхе истраживања поред 3 α ХСД-3, рекомбинантно је експримирана и коришћена и сродна ензимска изоформа 17 β ХСД-5. 1.2. Врсте података: квалитативни и квантитативни

1.3. Начин прикупљања података

структуре протеина доступне у ПДБ бази података
резултати ензимских есеја из записа спектрофотометра/флуориметра
координате лиганда након симулација молекулског докинга
трајекторија система након симулације молекулске динамике
запис о компонентама енергије током симулације молекулске динамике
фотографије кристалографских налаза
дифракционе мапе кристала

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

Excel фајл, датотека .xlsx
Текст фајл, датотека .pdb, .pdbqt, .log, .r
JPG фајл, датотека .jpg, .png
Остало, датотека .dcd, .xds

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

број варијабли: 1 до 9, у зависности од испитиваног једињења
број мерења: 6 до 50, у зависности од природе методе

1.3.3. Поновљена мерења

не

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

да

2. Прикупљање података

2.1. Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

експерименти, спектрофотометријски и флуориметријски есеји ензимске активности хетерологно експримираних протеина, кристализација, снимање дифракције кристала и одређивање структуре протеина

остало, *in silico* симулације молекулског докинга и молекулске динамике

2.1.2. Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину

спектрофотометар, флуориметар, дифрактометар, синхротрон, програмски пакети код *in silico* огледа

2.2. Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

Да ли матрица садржи недостајуће податке? Не.

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података?

статистичким анализама и коришћењем контролних експеримената

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

контролом са другог корисничног налога

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Google Drive репозиторијум.

3.1.2. URL drive.google.com/drive/folders/18c-RXPmSCLHXEv4Vz1gBGkUi0uXvB_g7?

3.1.3. DOI није додељен

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу? Да.

3.2. Метаподаци и документација података

нема метаподатака

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? ∞

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да.

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да.

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена? Не.

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Не.

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Не.

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити јавно доступни

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Маја Мариновић, maja@dbe.uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Маја Мариновић, maja@dbe.uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима

другим истраживачима

Маја Мариновић, maja@dbe.uns.ac.rs