

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽAN KOREN

**SINTEZA IN BIOKEMIJSKO PREIZKUŠANJE
ZA VIRALCEV BENZOATNE 4-MONOOKSIGENAZE
KOT NOVIH PROTIGLIVIČNIH SPOJIN**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽAN KOREN

**SINTEZA IN BIOKEMIJSKO PREIZKUŠANJE
ZAVIRALCEV BENZOATNE 4-MONOOKSIGENAZE
KOT NOVIH PROTIGLIVIČNIH SPOJIN
SYNTHESIS AND BIOCHEMICAL TESTING OF
BENZOATE 4-MONOOXYGENASE INHIBITORS AS
NOVEL ANTIFUNGAL COMPOUNDS**

Ljubljana, 2014

Sintezni del magistrskega dela sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove mag. farm. Biokemijsko preizkušanje spojin sem opravljal v Laboratoriju za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo na Kemijskem inštitutu pod mentorstvom asist. dr. Sabine Berne.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Mateju Sovi in somentorici asist. dr. Sabini Berne za njune napotke in pomoč pri izvedbi in pisanju magistrske naloge. Hvala prof. dr. Radovanu Komelu za sprejetje v njegovo raziskovalno skupino na Kemijskem inštitutu. Za pomoč pri izvedbi biološkega dela magistrske naloge se želim posebej zahvaliti članom njegove raziskovalne skupine: Neji Zupanec, dr. Nadi Kraševac, Jelki Lenarčič in dr. Meti Novak. Hvala tudi domačim za vso izraženo podporo pri mojem delu.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja doc. dr. Mateja Sove, mag. farm. in somentorice asist. dr. Sabine Berne.

Žan Koren

Predsednik komisije: prof. dr. Darko Černe

Članica komisije: doc. dr. Petra Kocbek

VSEBINA

KAZALO SLIK	i
POVZETEK	iii
ABSTRACT	v
SEZNAM OKRAJŠAV	vii
1. UVOD	1
1.1. RAČUNALNIŠKO PODPRTE METODE IZBIRE SPOJIN ZADETKOV	2
1.2. CITOKROMI P450 (CYP)	3
1.2.1. Nomenklatura encimov CYP	5
1.2.2. Struktura encimov CYP	6
1.2.3. Spektralne značilnosti encimov CYP	9
1.3. CITOKROM P450 REDUKTAZE (CPR)	11
1.4. GLIVNI CITOKROMI P450	12
1.5. β -KETOADIPATNA POT	13
1.6. GLIVE	15
1.6.1. <i>Cochliobolus lunatus</i>	16
1.6.2. <i>Aspergillus niger</i>	16
1.6.3. <i>Pleurotus ostreatus</i>	17
2. NAMEN DELA	18
3. MATERIALI IN METODE	19
3.1. SINTEZA SPOJINE 4	19
3.2. PRIDOBIVANJE PROTEINOV CYP53A15 IN CPR1	24
3.2.1. Priprava proteina CYP53A15	27
3.2.2. Priprava proteina CPR1	29
3.2.3. Poliakrilamidna elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE)	30

3.2.4. CO diferenčni spekter za CYP53A15	31
3.2.5. Merjenje aktivnosti NADPH CPR1	32
3.3. BIOKEMIJSKO PREIZKUŠANJE ZAVIRALCEV CYP53A15	34
3.3.1. Priprava rekonstitucijskega sistema (RS) in RP-HPLC analiza inhibitorjev	37
3.3.2. Vezavni testi	39
3.3.3. Biološki testi	40
4. REZULTATI	42
4.1. EKSPRESIJA, ČIŠČENJE IN MERJENJE AKTIVNOSTI CYP53A15	42
4.2. EKSPRESIJA, ČIŠČENJE IN MERJENJE AKTIVNOSTI CPR1	45
4.3. REKONSTITUCIJSKI SISTEM (RS) IN MERJENJE INHIBITORNEGA DELOVANJA POTENCIALNIH INHIBITORJEV Z RP-HPLC	47
4.4. VEZAVNI TESTI	50
4.5. BIOLOŠKI TESTI	52
5. RAZPRAVA	60
5.1. SINTEZA SPOJINE 4	60
5.2. EKSPRESIJA, ČIŠČENJE IN MERJENJE AKTIVNOSTI ENCIMOV CYP53A15 IN CPR1	63
5.3. UGOTAVLJANJE INHIBITORNEGA DELOVANJA SPOJIN NA REKONSTITUCIJSKI SISTEM Z RP-HPLC ANALIZO	64
5.4. VEZAVNI TESTI	65
5.5. BIOLOŠKI TESTI	65
6. SKLEPI	67
LITERATURA	68

KAZALO SLIK

Slika 1: Postopek izbire spojin	3
Slika 2: Mehanizem reakcij, ki jih katalizirajo CYP	5
Slika 3: Shematski prikaz primarne strukture encimov CYP in njeni ohranjeni elementi	7
Slika 4: Terciarna struktura encimov CYP.....	8
Slika 5: Razvoj Gaussove krivulje spektra za določitev spremembe spinskega stanja encima CYP (na primeru CYP3A4) po dodatku liganda tipa 2	10
Slika 6: Diferenčni spekter tipa 1 (na primeru CYP51 z lanosterolom).....	11
Slika 7: Razširjenost encimov CYP med različnimi glivami	12
Slika 8: Pretvorba benzoata in 4-hidroksibenzoata z β -ketoacilno potjo	14
Slika 9: Korak pretvorbe fenolnih derivatov, pri katerem je udeležen CYP53A15	15
Slika 10: Reakcijska shema sinteze Grignardovega reagenta (spojine 2)	21
Slika 11: Reakcijski shemi sinteze spojine 3.....	22
Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine 4	23
Slika 13: NaDS-PAGE analiza proteina CYP53A15 pri vsaki stopnji izolacije in čiščenja.....	43
Slika 14: CO diferenčni spekter CYP53A15 po Ni-NTA, dializi s HGE pufrom ter koncentriranju.....	44
Slika 15: NaDS-PAGE analiza CPR1, ki smo jo opravili pri dveh stopnjah izolacije encima .	46
Slika 16: Merjenje aktivnosti membranske frakcije CPR1	46
Slika 17: Pretvorba BA v 4-HBA v prisotnosti 100 μ M potencialnih inhibitorjev v odvisnosti od časa	49
Slika 18: Vezavni spektri CYP53A15 ob dodatku različnih koncentracij BA oziroma testnih spojin (A7 oz. SMB-28)	50
Slika 19: Grafični prikaz primera izračuna RGR in IGI za glivo <i>A. niger</i> z dodano testirano spojino 4-fluorobenzojsko kislino (4-FBA)	53
Slika 20: Relativna rast posamezne glive (v %) glede na kontrolo	56
Slika 21: Rast kulture <i>C. lunatus</i> 72 ur po nacepiti na gojišče.....	57
Slika 22: Rast kulture <i>C. lunatus</i> (Δ bph) 72 ur po nacepiti na gojišče.....	58
Slika 23: Rast kulture <i>A. niger</i> 72 ur po nacepiti na gojišče	58
Slika 24: Rast kulture <i>P. ostreatus</i> 72 ur po nacepiti na gojišče	59

Slika 25: Struktura BA in sinteznega produkta SZK-3 (spojina 4), potencialnega inhibitorja encima CYP53A15.....	61
Slika 26: Reakcija hidroksilacije BA do 4-HBA z encimom CYP53A15	61
Slika 27: Splošna shema kemijske reakcije z Grignardovimi reagenti	62

POVZETEK

Pogostost glivičnih okužb v svetu se povečuje. Kljub temu je večina protiglivičnih učinkovin na trgu prisotna v generičnih zdravilih, ki imajo za tarče glivne molekule, prisotne tudi v človeški celici. S stališča neželenih učinkov imajo spojine, katerih tarče so encimi, ki nimajo homologov v človeški celici, veliko prednost kot možne nove protiglivične učinkovine. V to skupino encimov spada tudi skupina citokromov CYP53, ki so zastopani v patogenih glivah, kot sta *Aspergillus fumigatus* in *Gibberella zeae*. Citokromi te skupine katalizirajo reakcijo *para* hidroksilacije benzojske kisline (BA) in njenih derivatov ter sodelujejo pri detoksifikaciji aromatskih spojin iz glivnih celic.

V magistrski nalogi smo benzoatno 4-monooksigenazo (CYP53A15), ki je bila identificirana v glivi *Cochliobolus lunatus*, izbrali kot tarčo in na njej preizkušali zaviralno delovanje 11 spojin. CYP53A15 in njen redoks partner, citokrom P450 reduktazo 1 (CPR1), smo izrazili v kompetentnih celicah *E. coli* C43 ter ju očistili in izolirali. CPR1 smo uporabili v membranski frakciji, CYP53A15 pa smo izolirali iz membranske frakcije in jo očistili s kolonsko kromatografijo. Aktivnost CYP53A15 smo določili z merjenjem CO-diferenčnih spektrov in je znašala 97 %.

Testne spojine, ki smo jih kupili, smo izbrali na podlagi encimskega modela in molekulskega sidranja. Eno izmed testnih spojin ([1,1'-bifenil]-4,4'-dikarboksilna kislina (**4**)) smo tudi uspešno sintetizirali z uporabo reakcije za tvorbo vezi ogljik-ogljik iz Grignardovega reagenta in aril jodida. Izbranim spojinam smo izmerili vezavne spektre z CYP53A15 pri valovni dolžini 300-500 nm. Pri tem sta spojin 4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-karboksilna kislina (**6**) in 2',4',5'-trifluoro-[1,1'-bifenil]-4-karboksilna kislina (**11**) izkazovali vezavni spekter tipa 1. Zaviralno delovanje spojin na CYP53A15 smo preverili z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z reverzno fazo (RP-HPLC). 100 μ M raztopine inhibitorjev v DMSO niso opazneje inhibirale pretvorbe BA v 4-hidroksibenzojsko kislino (4-HBA) s CYP53A15. Da bi preverili tudi biološko delovanje izbranih spojin, smo izvedli glivne teste na treh glivnih vrstah: *Cochliobolus lunatus*, *Aspergillus niger* in *Pleurotus ostreatus*. Odkrili smo, da veliko

izmed testiranih spojin zavira glivno rast, najbolj pa sta se izkazali spojini 4-(tiofen-2-il)benzojska kislina (**8**) in **11**, ki sta najmočnejše zavirali glivno rast.

Ker je spojina **11** izkazovala najboljše rezultate pri bioloških testih, predstavlja pomembno izhodišče pri nadaljnjem razvoju novih potencialnih protiglivnih učinkovin.

ABSTRACT

The incidence of fungal infections among people is increasing. Despite this fact, the majority of antifungal substances are present in generic drugs and most of them target fungal molecules which are also present in human cells. From this point of view substances, which target molecules with no homologues in human cells, have a great advantage as potential new antifungal drugs. Cytochromes CYP53 are such molecules present in fungi, like *Aspergillus fumigatus* and *Gibberella zeae*. This family of cytochromes is responsible for parahydroxylation of benzoic acid (BA) and its' derivatives, and participates in the detoxification of aromatic compounds in fungal cells.

Within the research as a part of our master's thesis, we chose benzoate 4-monooxygenase (CYP53A15), which was identified in the fungus *Cochliobolus lunatus*, as our target molecule and tested inhibitory effects of several substances. We expressed CYP53A15 and its redox partner - cytochrome P450 reductase 1 (CPR1) in *E. coli* cells. After expression, we isolated membrane fractions of both enzymes. In addition, we purified CYP53A15 with column chromatography and tested its activity with CO-differential spectra. Activity was 97 %.

Based on the results obtained from enzyme model and molecular docking we selected our test compounds. Most of them were purchased, however, one of them ([1,1'-biphenyl]-4,4'-dicarboxylic acid (**4**)) was also synthesized by C-C coupling reaction between Grignard reagent and aryl halide. Substance binding spectra were measured to determine the binding of compounds into CYP53A15 active channel. We determined binding spectra type 1 for substances 4'-fluoro-[1,1'-biphenyl]-4-carboxylic acid (**6**) and 2',4',5'-trifluoro-[1,1'-biphenyl]-4-carboxylic acid (**11**). The inhibitory effects of compounds on CYP53A15 were determined with reverse phase liquid chromatography (RP-HPLC), where we used 100 μ M DMSO solutions of inhibitors. Unfortunately, our compounds showed only weak or none inhibition of transformation of BA into 4-hydroxybenzoic acid (4-HBA). Furthermore, we performed biological testing of substances on three fungal species: *Cochliobolus lunatus*, *Aspergillus niger* and *Pleurotus ostreatus*. Most of compounds showed inhibitory activity on

fungal growth, however, the best results were obtained for 4-(thiophen-2-yl)benzoic acid (**8**) and compound **11**.

To sum up, the best results from biological testing were obtained for compound **11**, therefore, it represents the important starting point for further development of novel potential antifungal drugs.

SEZNAM OKRAJŠAV

4-HBA:	4-hidroksibenzojska kislina
A:	absorbanca
AK:	aminokislina
ALA:	δ - aminolevulinska kislina
angl.:	angleško
Ar:	aromatski obroč
B:	specifična vezava
BA:	benzojska kislina
<i>bph</i> :	gen, ki kodira zaporedje za protein CYP53A15
Δbph :	delecijska mutanta <i>C. lunatus</i> z izbitim genom <i>bph</i>
br s:	širok singlet (angl. broad singlet)
c:	molarna koncentracija v mol/l
CoA:	koencim A
CPR:	citokrom P450 reduktaza
CYP:	citokrom P450 (angl. cytochrome P450)
CYP53A15:	benzoatna 4-monooksigenaza
d:	dublet
dH ₂ O:	demineralizirana voda
DLPC:	dilauril fosfatidilholin

DMSO:	dimetilsulfoksid
DNK:	deoksiribonukleinska kislina
DTT:	ditiotreitol
ϵ :	molarni ekstincijski koeficient v $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
EDTA:	etilendiamin tetraacetna kislina
EU:	endotoksinska enota (angl. endotoxin unit)
FR:	redčitveni faktor
HEPES:	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
HGE:	hepes, glicerol, EDTA
HR:	homologna regija
HS:	visoko spinsko stanje (angl. high spin)
IGI:	začetna inhibicija rasti (angl. initial growth inhibition)
<i>i</i> PrMgCl:	izopropilmagnezijev klorid
IPTG:	izopropil- β -D-tiogalaktozid
IR:	infrardeča svetloba
J:	sklopitvena konstanta
KMDG:	kalijev fosfat, magnezijev acetat, DTT, glicerol
K _{pi} :	kalijev-fosfatni pufer
K _s :	spektralna vezavna konstanta
λ :	valovna dolžina
l:	dolžina optične poti

LAF:	komora z laminarnim pretokom zraka (angl. laminar air flow)
LB:	Lauria-Bertani tekoče gojišče
LBamp:	Lauria-Bertani gojišče z dodanim ampicilinom
LS:	nizko spinsko stanje (angl. low spin)
m:	multiplet
MBFA:	trdno gojišče s sladnim agarjem (angl. malt extract agar- Blakeslee's formula)
Milli-Q:	filtrirana in deionizirana voda
NADH:	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH:	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NaDS:	natrijev dodecilsulfat
Ni-NTA:	nikelj nitrilotriocetna kislina
NMR:	jedrska magnetna resonanca (angl. nuclear magnetic resonance)
OD:	optična gostota (angl. optical density)
PAGE:	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PMSF:	fenilmetilsulfonil fluorid
ppm:	delcev na milijon (angl. parts per million)
q:	kvartet
R _f :	retencijski faktor
RGR:	radialna hitrost rasti (angl. radial growth ratio)
RNK:	ribonukleinska kislina

RP-HPLC:	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z reverzno fazo (angl. reverse phase high pressure liquid chromatography)
rpm:	obratov na minuto (angl. rotations per minute)
RS:	rekonstitucijski sistem
S:	spinsko stanje
SRS:	substrat vezavna regija (angl. substrate recognition site)
t:	triplet
TB:	tekoče gojišče za ekspresijo (angl. terrific broth)
TES:	Tris acetat, EDTA, saharoza
THF:	tetrahidrofur
TLC:	tankoplastna kromatografija (angl. thin-layer chromatography)
TMS:	tetrametilsilan
Tris:	Tris (hidroksimetil) aminometan (2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol)
UV:	ultravijolični spekter svetlobe
V/V:	volumsko-volumski delež
Vis:	vidni spekter svetlobe

Ime aminokislina (AK)	Tričrkovna oznaka AK	Enočrkovna oznaka AK
alanin	Ala	A
cistein	Cys	C
asparaginska kislina	Asp	D
glutaminska kislina	Glu	E
fenilalanin	Phe	F
glicin	Gly	G
histidin	His	H
izolevcin	Ile	I
lizin	Lys	K
levcin	Leu	L
metionin	Met	M
asparagin	Asn	N
prolin	Pro	P
glutamin	Gln	Q
arginin	Arg	R
serin	Ser	S
treonin	Thr	T
valin	Val	V
triptofan	Trp	W
tirozin	Tyr	Y

1. UVOD

Pogostost glivičnih okužb se v svetu povečuje, zlasti so temu podvržene osebe z oslabljenim imunskim sistemom. Kljub temu, da večino glivičnih okužb povzročita seva *Aspergillus* spp. in *Candida* spp., so se tudi nekatere druge glive pokazale za pomembne oportunistične patogene. Eno izmed vodilnih podjetij na področju raziskav trga (GBI research) v svoji raziskavi iz leta 2010 ugotavlja, da na trgu protiglivičnih učinkovin prevladujejo generična farmacevtska podjetja, medtem ko je bilo v fazi raziskav in razvoja (angl. R&D) tistega leta le 38 novih protiglivičnih spojin. Razen celične stene, ki je sestavni del glivnih celic, so glivne celice metabolno zelo podobne sesalskim, kar otežuje odkrivanje novih učinkovin, ki bi delovale specifično le na glive. Spojine s protiglivičnim delovanjem, ki se trenutno uporabljajo v medicini so azoli, ki zavirajo sintezo ergosterola, polienski antibiotiki, ki motijo prenos snovi preko celične membrane glivnih celic, ehinokandini, ki zavirajo delovanje encima 1,3- β -glukan sintaze, ki je odgovorna za izgradnjo celične stene, in nukleozidni analogi, ki preprečujejo sintezo DNK in RNK [1].

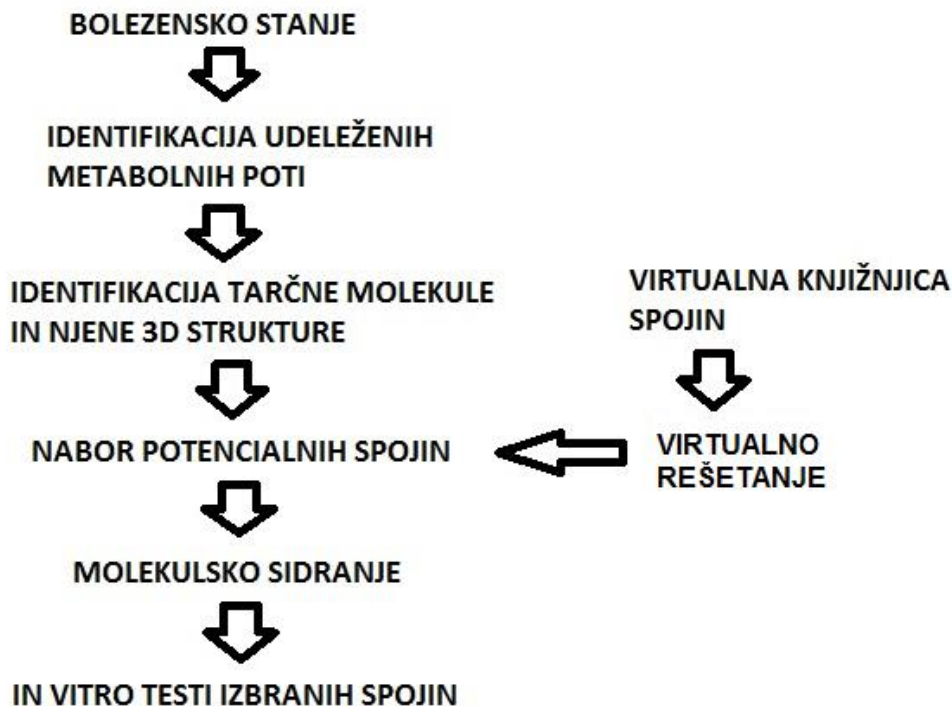
Glivni citokromi P450 (CYP) so velika skupina encimov, ki igrajo osrednjo vlogo pri metabolnih procesih glivne celice. V to skupino spada tudi glivna lanosterol 14- α demetilaza, CYP51, ki je tarča azolnih protiglivičnih učinkovin. Vendar pa le te ne učinkujejo samo na glivni CYP51, ampak tudi na citokrome sesalskih celic, ki so odgovorni za metabolizem ksenobiotikov. Posledica tega so neželene interakcije zdravil in s tem povezani neželeni stranski učinki in toksičnost. S tega stališča imajo glivni citokromi, ki nimajo homologov v sesalskih celicah, velik potencial kot nove terapevtske tarče. Encimi družine CYP53 so zastopani v številnih glivah, tudi v patogenih *Aspergillus fumigatus* in *Gibberella zeae*, medtem ko jih ne najdemo pri višjih evkariontih. Ti encimi katalizirajo hidroksilacijo benzojske kisline (BA) na mestu 4, nekaterih njenih derivatov in naravno prisotnih fenolnih spojin, ki rastlinam služijo kot obramba pred glivami. Kot glavni encim, udeležen pri detoksifikaciji BA, je bila identificirana benzoatna 4-monooksigenaza (CYP53A15; benzoatna para-hidroksilaza, bph) v glivi *Cochliobolus lunatus*. Prav tako je bilo dokazano zaviranje

aktivnosti omenjenega encima z naravno prisotnimi fenolnimi spojinami, s čimer se je pokazala možnost za razvoj učinkovin s protiglivičnim delovanjem [1].

1.1. RAČUNALNIŠKO PODPRTE METODE IZBIRE SPOJIN ZADETKOV

Virtualno reševanje se je v preteklosti izkazalo kot pomembno orodje pri odkrivanju novih zdravilnih učinkovin. Računalniški programi, ki omogočajo izračun interakcijskih sil med različnimi ligandi in tarčnimi molekulami ter hkrati izris tridimenzionalne slike interakcij, postajajo vse pomembnejše orodje pri iskanju zadetkov znotraj (virtualnih) knjižnic spojin. Osnovni korak na poti odkrivanja novih zdravilnih učinkovin je določitev potencialnih ligandov, ki bi specifično interagirali s proteinskimi tarčami. Ko poznamo strukturo tarčne molekule, se s pomočjo računalniških algoritmov iz knjižnic spojin izberejo molekule, ki bi najbolj interagirale z aktivnim mestom tarče, čemur pravimo virtualno reševanje [2].

Molekulska sidranje je metoda, ki med seboj poveže dve molekulske strukturi, tarčo in ligand. Zato je ta metoda zelo priročna za modeliranje tridimenzionalnih struktur kompleksov ligand-receptor in ugotavljanje stabilnosti teh kompleksov, ki jih določa specifično biološko prepoznavanje med omenjenima molekulama. Izmed spojin, ki jih izberemo z virtualnim reševanjem, potem določimo najbolj primerne za *in vitro* testiranje s pomočjo molekulskega sidranja (slika 1) [2].



Slika 1: Postopek izbire spojin. Shematski prikaz postopka izbire spojin, ki bi lahko predstavljale potencialno zdravilno učinkovino, z uporabo metod virtualnega rešetanja in molekulskega sidranja; povzeto po [2].

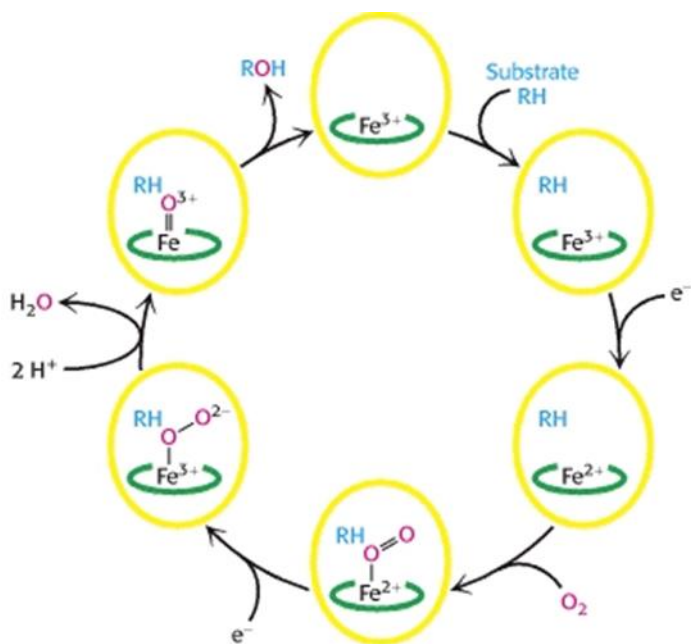
1.2. CITOKROMI P450 (CYP)

CYP pripadajo veliki naddružini genov in encimov, ki je prisotna v vseh kraljestvih živih organizmov [3]. M. Klingenberg je leta 1958 odkril redoks komponento v mikrosomalni frakciji jeter in jo poimenoval “ogljikov monoksid vezavni pigment”. Ker je “pigment” izkazoval maksimum absorpcije pri 450 nm, so ga kasneje poimenovali P450 [4]. Danes je znanih okoli 18.500 encimov iz skupine CYP [5]. Vse bolj se potrjuje dejstvo, da je ta skupina encimov najbolj številčna in raznolika prav v genomih rastlin in gliv. Nekateri glivni genomi imajo namreč preko 150 genov za encime CYP, ki tako predstavljajo več kot 1% vseh genov [6]. Encimi CYP so ključni igralci zlasti v primarnih presnovnih procesih. V tej fazi presnovnih procesov potečejo manjše kemijske spremembe, kot so npr. redukcije, oksidacije, hidrolize, s katerimi postanejo molekule bolj hidrofilne in je olajšano kasnejše izločanje teh snovi skozi ledvice. Druga faza presnove, kjer prav tako sodelujejo encimi CYP, omogoča

pretvorbo vnesenih spojin v primerih, ko s prvo fazo pretvorba ni bila možna ali ko je nastal reaktiven metabolit. V drugi fazi gre v večini primerov za pripajanje polarnih skupin npr. glukuronske kisline na molekule, s čimer se zagotovi večja vodotopnost snovi [7]. Encimi CYP, kamor spada tudi CYP53A15, so udeleženi v presnovne procese razgradnje ksenobiotikov. Pogosto pa so encimi CYP tudi del biosinteznega genskega kompleksa, ki je odgovoren za naravne produkte gliv, kot je mikotoksin fumonisin [6]. Za potek reakcij s encimi CYP je odgovorno železo v hemu citokromov. Pri teh reakcijah gre večinoma za dodajanje ali odcepljanje polarne skupine, ki navadno poteka po naslednji reakcijski shemi:



Pri čemer je R-H substrat in R-OH oksidiran substrat (produkt reakcije) [7]. Izvor dveh elektronov za reakcijo sta večinoma koencima NADPH/NADH, do encima pa se elektrona preneseta preko redoks partnerjev [8]. Število poznanih redoks partnerjev in mehanizmov prenosa elektronov je zelo veliko [9]. Eden izmed dveh elektronov je potreben za redukcijo Fe^{3+} v Fe^{2+} obliko železa, ki veže molekularni kisik. Drugi elektron pa je potreben za nadaljnjo aktivacijo vezanega kisika, tako da se en atom kisika lahko prenese na molekulo substrata. Drugi atom kisika se pri tem reducira v vodo. Rezultat reakcije je substrat z vezanim kisikom (slika 2) [4].



Slika 2: Mehanizem reakcij, ki jih katalizirajo CYP [10].

1.2.1. Nomenklatura encimov CYP

Poimenovanje encimov CYP, ki ga je uvedel D. Nebert leta 1987 [4] temelji na aminokislinski (AK) podobnosti med encimi [11]. Ključ za poimenovanje je sledeč: vse encime CYP opredeljuje simbol CYP, arabsko število se uporablja za poimenovanje družin, velika tiskana črka za poimenovanje poddružin in arabsko število za poimenovanje posameznih genov [11]. V isto družino spadata dva encima, katerih podobnost AK zaporedja je večja od 40 %, v isto poddružino pa dva citokroma, ki imata AK podobnost večjo od 55 % [12].

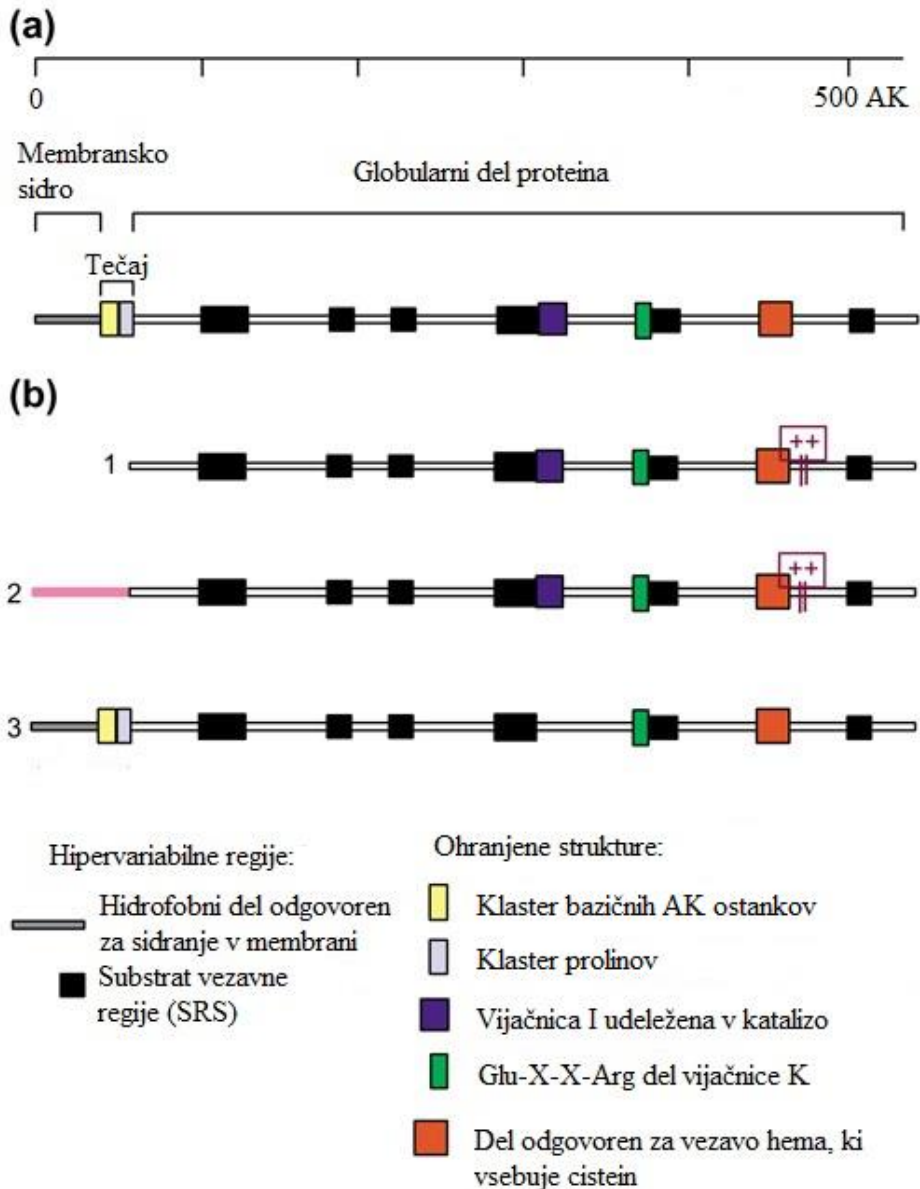
Leta 1998 je bil dodatno uveden klanski način klasifikacije encimov CYP. Ta predvideva združevanje dveh ali več družin CYP v klane. Vendar pa se je klansko poimenovanje izkazalo za problematično pri klasifikaciji glivnih CYP, ker je njihovo število pri glivah preveliko, da bi lahko učinkovito izvedli filogenetsko analizo [12].

1.2.2. Struktura encimov CYP

Določanje strukture encimov CYP je bilo težavno, ker je pri raztapljanju z detergenti nastala denaturirana oblika, ki je absorbirala pri 420 nm. To se je spremenilo, ko so ugotovili da dodatek poliolov, kot je 20-30 % glicerol, ohrani aktivnost encimov CYP pri raztapljanju z detergenti [4].

Prva računalniška analiza celotnega AK zaporedja CYP iz podganjih jeternih mikrosomov iz *Pseudomonas putida* je bila opravljena 1982. leta. Zaporedji sta bili dokaj homologni, nista pa bili podobni drugim hemoproteinom npr. hemoglobinu, peroksidazi, citokromu c. V encimih sta bili najdeni dve močno homologni regiji (HR1 in HR2) ter dve slabše homologni regiji med regijama HR1 in HR2. Regiji HR1 in HR2 vsebujeta cisteinski AK ostanek blizu centra homolognih regij. HR1 je lociran na N-proksimalni polovici encima in je bogat s hidrofилnimi AK ostanki, ter je v obliki vijačnice (angl. helix). HR2 je blizu C-terminalnega konca, ima bolj hidrofobne lastnosti in kompleksno sekundarno strukturo: obrat (angl. turn) - ravnina (angl. sheet) - vijačnica (angl. helix). AK zaporedji v teh dveh regijah sta dobro ohranjeni v vseh encimih CYP [13].

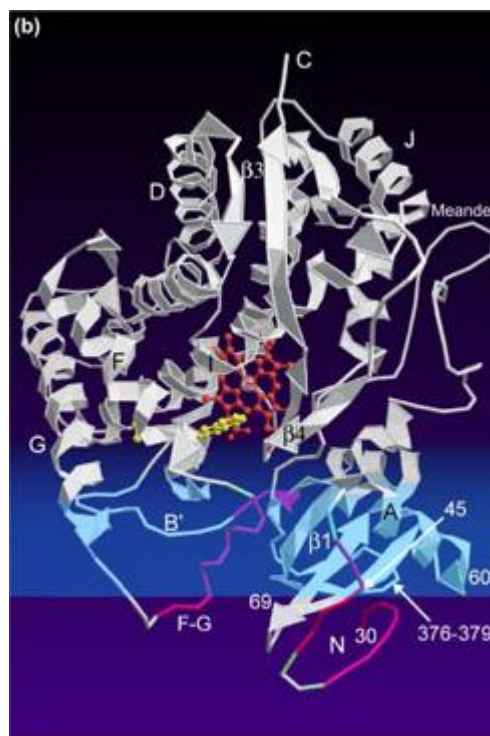
AK podobnost med različnimi encimi CYP je ponavadi dokaj majhna (slika 3), lahko celo manjša od 20 %, popolnoma pa so ohranjene le tri AK. Kljub temu pa je njihova struktura kar podobna. Najbolje ohranjena je struktura proteina okoli hema [14].



Slika 3: Shematski prikaz primarne strukture encimov CYP in njeni ohranjeni elementi.

a: Značilnosti encimov CYP, ki so vezani na endoplazmatski retikulum. b: topna oblika encimov CYP (1), mitohondrijsko vezana oblika encimov CYP (2), membransko vezana oblika encimov CYP (3). N-terminalni del CYP je slabo ohranjen in se močno razlikuje med različnimi proteini. Razlog za to najdemo v dejstvu, da je ta regija odločilna za vezavo mikrosomalnih in mitohondrijskih encimov v membrano in za položaj topnih encimov CYP znotraj bakterij [13]. Pri mikrosomalnem tipu encimov je dokaj pogosto zaporedje prolinov (Pro-Pro-X-Pro), ki služi kot tečaj med hidrofobnim N-terminalnim delom proteina, odgovornim za sidranje v membrano in ostalim globularnim delom proteina. Za mitohondrijsko obliko je značilna prisotnost dveh pozitivnih nabojev, ponavadi argininov, na začetku vijajčnice L. To je značilno tudi za bakterijske, v citoplazmi topne, CYP. »X« na shemi predstavljajo spremenljive AK; povzeto po [15].

Molekula substrata se nahaja v notranjem žepu, nad hemom, nasproti kisik-vezavnega mesta (slika 4) [16]. Vezavna mesta za substrate sestavlja šest regij, ki so odgovorne za prepoznavo in vezavo substratov, ter tako določajo specifičnost encimov za substrate. Te regije poimenujejo SRS1 - SRS6. Dostop substrata do vezavnega mesta v obliki tunela je močno odvisen od položaja fleksibilnih regij na vhodu. Njihova konformacija se po vezavi substrata močno spremeni. SRS regije (C-terminalni del vijačnice F, N-terminalni del vijačnice G, N-terminalni del vijačnice I, $\beta 3$ regija in centralni del $\beta 5$ regije ter ravninska regija) zavzemajo okoli 80 AK med okoli 500 AK, kolikor jih je v strukturi encimov CYP [15].

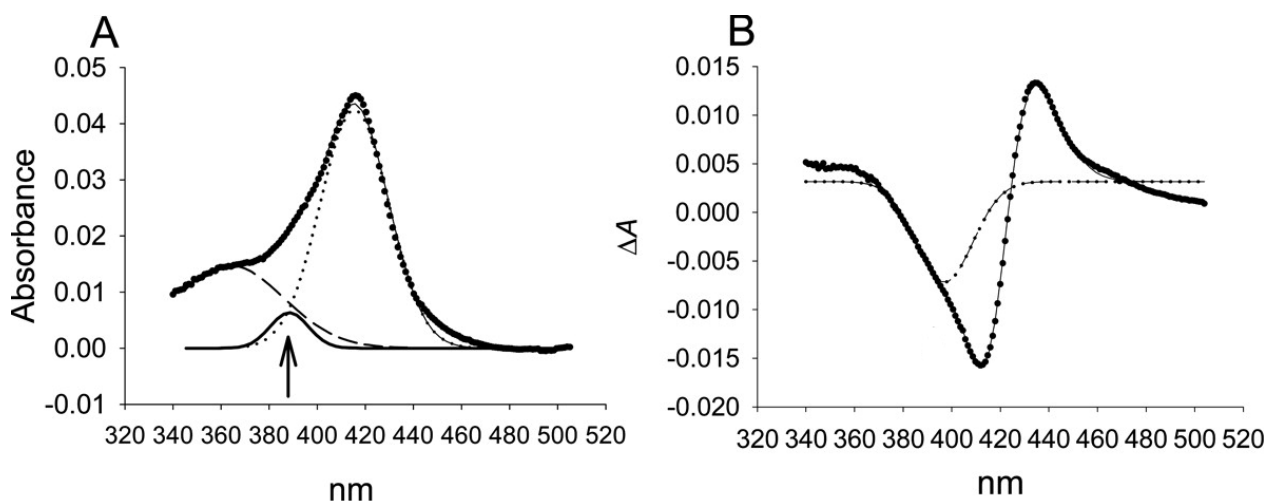


Slika 4: Terciarna struktura encimov CYP. V sredinskem delu se nahaja hem z železom (rdeče obarvanje), stisnjen med proksimalno vijačnico L, ki vsebuje hem-vezavno zanko z najbolj značilnim zaporedjem encimov CYP (Phe-X-X-Gly-X-Arg-X-Cys-X-Gly, kjer “X” predstavlja spremenljivo AK) in distalno vijačnico I. Železo v hemu ima koordinacijsko število pet in je vezano z aksialnim žveplovim ligandom, tiolatnim ionom, ki ga zagotavlja cistein na mestu 357 proksimalne (L) vijačnice [16]. Vijačnica I vsebuje drugo dokaj značilno zaporedje encimov CYP (Ala/Gly-Gly-X-Asp/Glu-Thr-Thr/Ser) in je povezana s prenosom protonov do hema. Tretje prepoznavno zaporedje encimov CYP vsebuje vijačnica K (Glu-X-X-Arg) in je povezano s pravilnim zvitjem dela proteina, ki je izpostavljen na površini [15].

1.2.3. Spektralne značilnosti encimov CYP

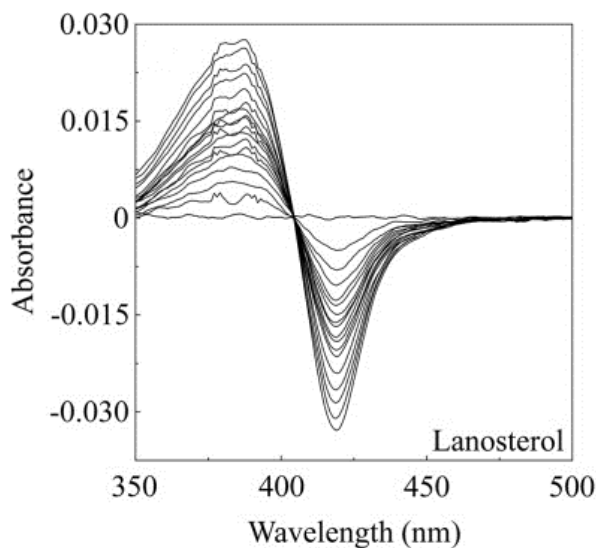
Glavno orodje za identifikacijo encimov CYP je UV/Vis spektroskopija. Kompleks železa v hemoproteinu z ogljikovim monoksidom izkazuje absorpcijski spekter med 448 nm in 452 nm, ki se značilno razlikuje od Soretovih absorpcijskih vrhov hemoproteinov. V oksidirani obliki (Fe^{3+}) obstajajo encimi CYP v ravnotežnem stanju med visoko in nizko spinsko konfiguracijo, ki se razlikujeta v UV/Vis absorpcijskih vrhovih. Razlike v absorpciji in ekstincijskih koeficientih pri 390 nm in 420 nm nam omogočajo določitev ravnotežne konstante, ki je pogoj za določanje deleža posamezne spinske oblike železa [17]. V nizkem spinskem stanju: $S=1/2$ je železo šestkrat koordinirano, medtem ko je v visokem spinskem stanju: $S=5/2$, železo petkrat koordinirano. Ionski radij železa v visokem spinskem stanju (HS) je večji, kot ionski radij železa v nizkem spinskem stanju (LS) in se zaradi pomanjkanja prostora premakne iz ravnine porfirinskih obročev [18]. Spekter encima CYP brez vezanega substrata izkazuje nizko spinski Soretov pas pri valovni dolžini okoli 420 nm. V odsotnosti substrata voda tvori šesti ligand Fe^{3+} v koordinacijskem kompleksu in tako stabilizira nizko spinsko stanje [19].

Obstaja več tipov ligandov, ki različno interagirajo z železom. Ligandi tipa 2 tvorijo kompleks z železom v encimih CYP in stabilizirajo nizki redukcijski potencial (LS) CYP ter preprečijo vezavo kisika na hem v proteinu. S tem preprečijo, da bi protein kataliziral reakcijo. Visoko spinska oblika železa je namreč tista, ki bolj prispeva k redukciji s CPR. Ligandi tipa 2 so predvsem inhibitorji, ki z vezavo na železo izrinejo vodo kot šesti ligand le tega. Pri tem se pojavi povečana absorpcija med 425 nm in 435 nm ter zmanjša absorpcija pri 390 nm, pri čemer je izobestična točka pri okoli 420 nm (Slika 5) [19].



Slika 5: Razvoj Gaussove krivulje spektra za določitev spremembe spinskega stanja encima CYP (na primeru CYP3A4) po dodatku liganda tipa 2. A: majhna količina visoko spinske oblike encima CYP v odsotnosti liganda se na absolutnem spektru vidi kot vrh pri 390 nm (označeno s puščico). Na diferenčnem spektru (odebeljena črta) se vidi nizko spinski Soretov vrh pri 420 nm. B: diferenčni spekter (odebeljena črta) z nasičeno koncentracijo liganda tipa 2 (imidazola), ki povzroči nastanek absorpcijskega vrha med 425 nm in 435 nm [19].

Vezava ligandov tipa 1 (slika 6), ki so običajno substrati, povzroči prenos elektronov na encime CYP in je razlog spinskemu obratu železa iz nizkega v visoko spinsko stanje, s čimer se poveča redukcijski potencial hema [20]. Pri tem se zmanjša Soretov vrh absorpcije pri 420 nm in poveča absorpcijski vrh pri 390 nm, pri čemer se izobestična točka pojavi pri 407 nm [19]. Poznamo še tretji tip ligandov, ki povzročijo nastanek spektra reverznega tipa 1. Ta je zrcalna različica spektra ligandov tipa 1, vendar pa pri tem tipu ligandov ne pride do spremembe valovnih dolžin maksimuma, ki se pojavljajo pri spektrih ligandov tipa 2. Reverzni tip spektra ima torej absorpcijski maksimum pri 420 nm in absorpcijski minimum pri 390 nm [21].



Slika 6: Diferenčni spekter tipa 1 (na primeru CYP51 z lanosterolom). Absorpcijski vrh je viden pri 390 nm [22].

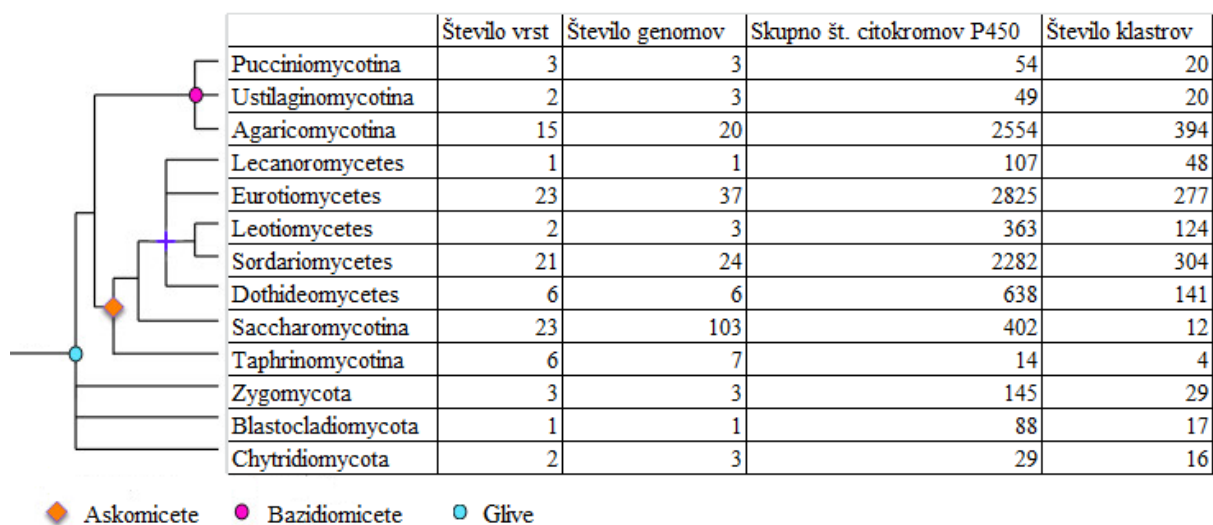
1.3. CITOKROM P450 REDUKTAZE (CPR)

Splošno velja, da je specifičnost za substrat in potek kemijske reakcije domena aktivnega mesta encima CYP. Vseeno pa na izid reakcij, ki jih katalizirajo ti encimi, vplivajo tudi redoks partnerji pri reakcijah. 2. Razred encimov CYP, to je evkariontska mikrosomalna skupina encimov CYP, ima kot redoks partner membransko vezano diflavin CPR, ki vsebuje kofaktorja flavin adenin dinukleotid in flavin mononukleotid. Poznanih je več oblik encima, pri čemer je AK podobnost presenetljivo nizka za encime, ki so dobro ohranjeni med številnimi vrstami, zaradi česar se pojavlja vprašanje o funkcionalnem pomenu različnih oblik encimov CPR v glivah. CYP53A15 iz *C. lunatus* v kombinaciji z različnimi oblikami encimov CPR, BA pretvarja v različne produkte npr. 4-hidroksibenzojsko kislino (4-HBA) in 3,4-dihidroksibenzojsko kislino. Ti fenolni derivati nadalje vstopajo v β -ketoacidno pot, ki je centralna pot pretvorbe/razgradnje aromatskih spojin in odstranitve BA. Elektrostatske sile med osnovnimi ostanki encima CYP in klastri negativno nabitih kislinskih ostankov CPR so pomembne pri konformaciji in stabilizaciji kompleksa CYP-redoks partner. Kristalografski in NMR podatki kažejo, da se CPR nahaja v ravnotežju dveh fizikalnih oblik, odprti in zaprti konformaciji, ki se razlikujeta v orientaciji flavin mononukleotid-vezavne domene. Prenos

elektronov k citokromu ali drugemu prejemniku elektronov je možen le, ko se reduktaza nahaja v odprti konformaciji, pri čemer izpostavi novo AK zaporedje na površini flavin mononukleotid-vezavnega dela. Flavin mononukleotid-vezavna domena vsake CPR pa specifično vpliva na premike hema in posledično nastanek drugačnega kompleksa CPR z encimom CYP. Rezultat je nastanek drugačnega produkta, kljub istemu substratu, zaradi različnih CPR. Pri fluorimetričnih testih se je izkazalo, da CPR partner vpliva tudi na specifičnost za substrat. To je povezano tudi z dejstvom, da so nekatere oblike CPR konstantno izražene v glivah, medtem ko je ekspresija drugih bolj odvisna od prisotnosti ksenobiotikov v okolju - njihova ekspresija je bolj inducibilna [6].

1.4. GLIVNI CITOKROMI P450

Trenutno je znanih skoraj 10.000 AK zaporedij encimov CYP iz gliv, ki so razvrščeni v 292 družin in so bili najdeni v več kot sto vrstah gliv (slika 7). Izjemna funkcionalna in evolucijska pestrost glivnih encimov CYP predstavlja glavno oviro pri njihovi klasifikaciji. Encimi CYP v glivah izkazujejo zelo majhno podobnost v AK zaporedju, z izjemo nekaterih ohranjenih AK ostankov, ki so značilni za vse encime CYP. Najbolj ohranjeno je vezavno zaporedje za hem. Vezavna mesta za substrate so veliko bolj variabilna [12].

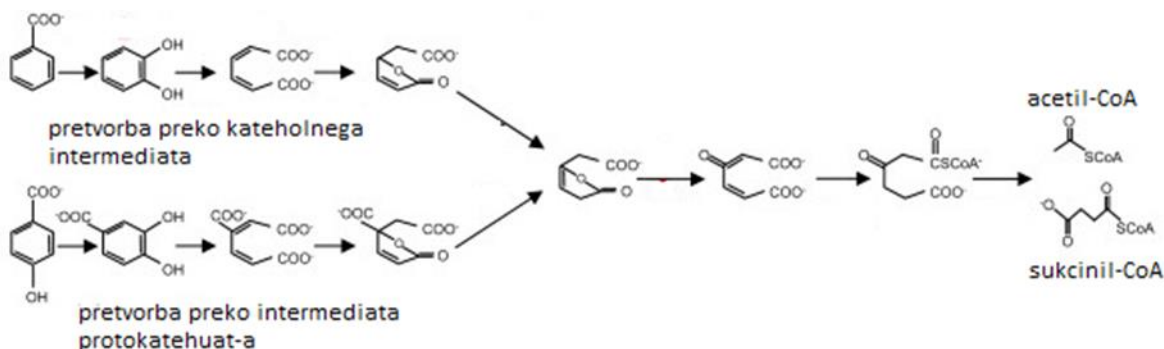


Slika 7: Razširjenost encimov CYP med različnimi glivami; povzeto po [12].

Najbolj razširjena encima CYP v glivah sta CYP51 in CYP61. Ta dva encima sta udeležena v biosintezi ergosterola v glivah. Najdemo ju ne samo v glivah ampak tudi v celicah številnih živalskih in rastlinskih vrst. CYP51 je lanosterol 14 α -demetilaza in je udeležena pri 14-demetilaciji prekursorjev sterola, ki je značilen za vse organizme. CYP61 naj bi se razvil iz CYP51 in je sterol Δ 22-desaturaza, ki je udeležena pri zadnjih korakih pretvorbe ergosterola [12].

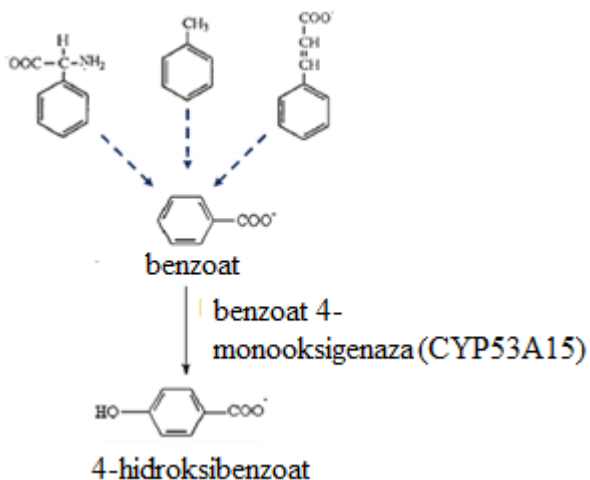
1.5. β -KETOADIPATNA POT

Aromatske komponente so med najbolj množično zastopanimi skupinami ogljikovih spojin v naravi. To so strukturno raznolike spojine, ki pa se presnavljajo v majhno število strukturno enostavnih skupnih intermediatov, kot sta katehol in protokatehuat [23]. CYP53A15 je član razmeroma dobro raziskane skupine glivnih encimov CYP53. Encimi omenjene skupine so odgovorni za pretvorbo spojin v fenolne derivate, ki se potem vključujejo v β -ketoadipatno pot razgradnje aromatskih komponent [6]. β -ketoadipatna pot je kromosomsko določena konvergentna pot presnove aromatskih spojin, ki je močno prisotna v presnovnih procesih bakterij in gliv. Poznana sta dva mehanizma β -ketoadipatne presnove. Po prvem se protokatehuat, kot intermediat presnove fenolnih komponent (npr. *p*-krezol, 4-hidroksibenzoat, monomeri lignina...) pretvarja v β -ketoadipat. Drugi mehanizem pa je odgovoren za pretvorbo katehola, ki izhaja iz številnih aromatičnih in amino-aromatičnih ogljikovodikov. Tudi ta se pretvori v β -ketoadipat. Produkt obeh mehanizmov se preko dveh nadaljnjih korakov presnavlja v končne produkte β -ketoadipatne poti, to so intermedii Krebsovega cikla/cikla trikarboksilnih kislin [24].



Slika 8: Pretvorba benzoata in 4-hidroksibenzoata z β -keto adipatno potjo. Pretvorba poteka preko katehola in protokatehuata do intermediatov Krepsovega cikla (sukcinil-CoA oz. acetil-CoA); povzeto po [23].

Razgradnja benzoata, ki je za glive toksičen, poteka preko oksidacije do katehola. Kateholni aromatski obroč je nato pretvorjen v cis,cis mukonat in kasneje v β -keto adipat-enol-lakton, ta pa je pretvorjen v acetil-CoA in sukcinil-CoA (slika 8) [23]. Z raziskavo je bilo dokazano, da je skupina CYP53 posebej pomembna pri glivah, ki so patogene za rastline, saj sodeluje pri detoksifikaciji fenilnih rastlinskih komponent, kot sta BA in izoevgenol, s katerimi se rastlina brani pred napadi gliv. Zaradi močno upočasnjene rasti pri glivah z izbitim genom *bph* v prisotnosti BA domnevamo, da je BA glavni substrat za CYP53, pri čemer je glavni redoks partner CPR1. Dokazano je bilo tudi, da se inhibitorni učinek BA poveča v prisotnosti drugih fenolnih spojin. To lahko pojasnimo tako, da tvorba kompleksa med CYP53A15 in CPR2 zaradi presnove teh fenolnih komponent zmanjša količino razpoložljivega CYP53A15 za kompleks s CPR1 in posledično povzroči nastanek toksičnih intermediatov. BA se s CYP53 v glivah pretvori v 4-HBA (slika 9) v procesu detoksifikacije aromatskih komponent. Lahko pa CYP53 pretvarja tudi druge substrate (npr. fenilglicin, toluen, cimeto kislino). Mono-substituirani fenilni obroč je kot substrat možen le, če je substitucija na določenem mestu na obroču in v primeru določenih skupin, medtem ko karboksilna skupina poskrbi za orientacijo substrata v aktivno mesto [6].



Slika 9: Korak pretvorbe fenolnih derivatov, pri katerem je udeležen CYP53A15. Ta benzoat pretvarja v 4-hidroksibenzoat s hidroksilacijo 4. mesta aromatskega obroča; povzeto po [25].

1.6. GLIVE

Glive imajo velik, tako pozitiven kot negativen vpliv v vsakdanjem življenju. Proizvajajo širok spekter metabolitov, antibiotikov in encimov, ki so zastopani na mnogih področjih od medicine do tehnologije detergentov. Prav tako so glive močno zastopane v biotehnologiji, kjer jih uporabljajo kot »biološke tovarne« za ekspresijo številnih proteinskih sistemov. Po drugi strani pa glive proizvajajo številne toksine, ki škodijo človeku in ostalim živim bitjem ter tako povečujejo stroške za njihovo odstranjevanje [26].

Predvideva se, da je na svetu okoli 1,5 milijonov glivnih vrst, pri čemer je opisanih manj kot 5 % vseh vrst [26].

Pri našem delu smo biološke teste izvajali na treh vrstah gliv: *Cochliobolus lunatus*, *Aspergillus niger* in *Pleurotus ostreatus*. *C. lunatus* spada med bazidiomicete (odprtotosnice), ki skupaj z askomicetami (zaprtotosnice) tvorijo podkraljestvo tako imenovanih višjih gliv. Med askomicete spadata glivi *A. niger* in *C. lunatus*. Askomicete se nespolno razmnožujejo s pomočjo konidijev (nespolnih spor), ki se nahajajo na konidioforah. Oblika kondiofor je eden izmed kriterijev, ki nam pomaga pri identifikaciji posamezne vrste gliv [27].

1.6.1. Cochliobolus lunatus

C. lunatus je teleomorfna gliva, ki se razmnožuje s popolnim spolnim ciklom s pomočjo askospor. Nespolna oblika glive oziroma anamorf, ki se razmnožuje s konidiji, se imenuje *Curvularia lunata* [28].

C. lunatus je rastlinski patogen, ki se pojavlja predvsem na sirku, sladkornem trsu, koruzi, rižu in prosu [26]. Poleg tega je gliva lahko patogena tudi za ljudi. Infekcije lahko povzroči tako pri imunsko oslabljenih kot tudi zdravih ljudeh, pri čemer se infekcije s to glivo pojavljajo zlasti v tropskih in subtropskih predelih. Infekcije se najpogosteje manifestirajo kot: alergijski sinusitis, keratitis, endoftalmitis (vnetje oči), infekcije kože in pljuč [29].

1.6.2. Aspergillus niger

Glive *A. niger* so večinoma prisotne v obliki, ki se razmnožuje nespolno s konidiji. *A. niger* je močno razširjen saprofit, ki najpogosteje uspeva na gnijočih rastlinskih materialih, kot je kompost pa tudi na skladiščenih žitih. Prvotno se je *A. niger* uporabljal v industriji, kjer so ga v postopku fermentacije uporabljali za pridobivanje encimov in kislin, kot so npr. amilaza, laktaza, pektinaza, glukonska in citronska kislina. Sama po sebi pa se gliva uporablja za testiranje uspešnosti protiglivnih spojin/konzervansov, saj je nanje zelo odporna. Glivi smo vsakodnevno izpostavljeni, kljub temu pa se okužbe z njo pri ljudeh pojavijo redko in tako ne predstavlja pomembnega človeškega patogena. Aspergiloza je okužba pulmonarnega trakta z glivo *A. niger* pri ljudeh, ki pa se pojavlja zlasti pri imunsko oslabljenih [27]. Glive iz rodu *Aspergillus* proizvajajo mikotoksine, kamor spadajo aflatoksini in okratoksini [30]. Med njimi je najbolj znan okratoksin A, ki se lahko pojavi v hrani in krmi, pri čemer pa je njegovo delovanje nefrotoksično, imunotoksično, teratogeno in karcinogeno. Izvor slednjega je tudi *A. niger* [31]. Odsotnost zdravju škodljivih toksinov v hrani je dobro nadzirana s pogoji fermentacije, kjer se uporablja *A. niger* [27].

1.6.3. *Pleurotus ostreatus*

Gliva, ki jo v slovenščini imenujemo bukov ostrigar, je užitna goba iz družine bazidiomicet. Je vedno bolj pomembna v kmetijstvu, biotehnologij in zdravstvu. Razmnožujejo se predvsem spolno z obliko spor, ki se imenujejo bazidiospore. Pomembna je predvsem zaradi sposobnosti razgrajevanja snovi, ki vsebujejo lignin (npr. les). Prav tako pa so rezultat njenega sekundarnega metabolizma produkti, ki se uporabljajo v farmacevtski industriji kot inhibitorji hidrosimetilglutaril-koencim A reduktaze za uravnavanje ravni holesterola (spojina lovastatin). Najdemo jo predvsem na odmrlih drevesih [32].

2. NAMEN DELA

Osnovni namen magistrske naloge bo z biološkimi in *in vitro* testiranjem preveriti inhibitorno delovanje izbranih kupljenih in sintetiziranih spojin na tarčno molekulo, encim CYP53A15, ter na glivno rast. Poleg tega želimo na podlagi rezultatov predhodnih raziskav sintetizirati nove inhibitorje encima CYP53A15 in preveriti tudi njihovo inhibitorno delovanje.

V okviru sinteznega dela magistrske naloge želimo sintetizirati spojine, katerih struktura posnema strukturo BA, ki je substrat tarčnega encima. Sintetizirane spojine bodo vsebovale bifenilni fragment, s katerim naj bi preprečili njihovo presnovo z encimom CYP53A15 in dosegli inhibitorno delovanje.

V nadaljevanju bomo izvedli ekspresijo, čiščenje in izolacijo tarčnega encima CYP53A15, ki je bil identificiran v glivi *C. lunatus* in njegovega redoks partnerja CPR1. Po ekspresiji in izolaciji bomo z metodo CO-diferenčnega spektra za CYP53A15 in s testom aktivnosti reduktaz s citokromom c za CPR1 preverili aktivnost izraženih in izoliranih encimov. Aktivna encima bosta namreč predpogoj za uspešno izpeljane *in vitro* spektrofotometrične teste. Z izvedbo testov želimo pridobiti informacije o načinu vezave posamezne spojine v aktivno mesto encima CYP53A15 in z metodo RP-HPLC preveriti inhibitorno delovanje spojin na rekonstitucijski sistem, ki ga bosta sestavljala CYP53A15 in CPR1.

V zadnji stopnji bomo izvedli še biološke teste s spojinami. Teste bomo izvedli na treh glivnih vrstah: *Cochliobolus lunatus*, *Aspergillus niger* in *Pleurotus ostreatus*. S tem bomo preverili biološko delovanje spojin in njihov vpliv na glivno rast.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. SINTEZA SPOJINE 4

Uporabljali smo reagente in topila proizvajalcev: Merck, Sigma-Aldrich, Acros Organics.

Reagenti, ki smo jih uporabili pri sintezi: etil 4-jodobenzoat, izopropilmagnezijev klorid ($i\text{PrMgCl}$), kobaltov (II) bromid, sarkozin, železov (II) acetoacetat ($\text{Fe}(\text{acac})_2$), D-glukozaminijev klorid, cezijev (I) karbonat.

Topila, ki smo jih uporabili pri sintezi in čiščenju: dietileter, petroleter, sveže predestilirani tetrahidrofuran (THF), prečiščena voda, dioksan, etilacetat.

Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabili pri našem delu:

-laboratorijska tehtnica Mettler toledo PB403-S,

-grelna pištola Skil 8000,

-rotavapor Buchi waterbath B-480,

-magnetno mešalo IKA RTC basic.

Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC)

Uporabljali smo plošče Silikagel 60 F254 (Merck) z 0,2 mm nanosom silikagela z dodanim fluorescenčnim indikatorjem na aluminijasti podlagi. Za razločevanje lis na kromatografski ploščici smo uporabljali UV svetlobo valovnih dolžin 254 nm ali 366 nm. Uporabljena mobilna faza je bila petroleter/dietileter = 10:1 (V/V).

Kolonska kromatografija

Za ločevanje s kolonsko kromatografijo smo uporabljali Silikagel 60 (0,040 - 0,063 mm) proizvajalca Merck. Uporabljene mobilne faze so navedene pri opisu sinteze.

Spektroskopske metode

Jedrska magnetna resonanca (NMR)

¹H-NMR spektre smo posneli z Bruker Avance spektrometrom na Fakulteti za farmacijo. Uporabili smo devterirani topili CDCl₃ in DMSO-*d*₆ ter interni standard tetrametilsilan (TMS). Kemijski premiki so navedeni v ppm, sklopitvene konstante (*J*) pa v hertzih (Hz). NMR spektre smo analizirali z računalniškim programom MestReNova 8.1 podjetja Mestrelab Research S.L.

Masna spektroskopija

Masni spektri so bili posneti na masnem spektrometru Varian-MAT 311 A s tehnikama FAB in EI v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan.

Infrardeča (IR) spektroskopija

IR spektre smo posneli na IR spektrofotometru Perkin Elmer 1600 FTIR, s transmisijsko tehniko, na Fakulteti za farmacijo. Pri tem smo spojino **4** stisnili v tableto s KBr. Valovna števila so navedena v cm⁻¹.

Določanje temperature tališča

Temperaturo tališč sintetizirane spojine smo izmerili na mikroskopu z ogrevano mizico, proizvajalca Leica in so nekorrigirana.

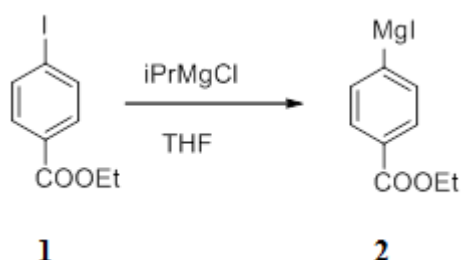
Risanje struktur

Za risanje struktur in mehanizmov reakcij smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 13.0 proizvajalca CambridgeSoft.

Sinteza spojine

Brezvodne pogoje v bučkah, v katerih so potekale naše reakcije, smo zagotovili tako, da smo bučke najprej prežarili v vakuumu pri 300 °C, da smo odstranili morebitno vodo. Ohlajene bučke smo zamašili s septumom in napolnili z argonom. Argonovo atmosfero smo vzdrževali s pomočjo balona tekom celotne reakcije.

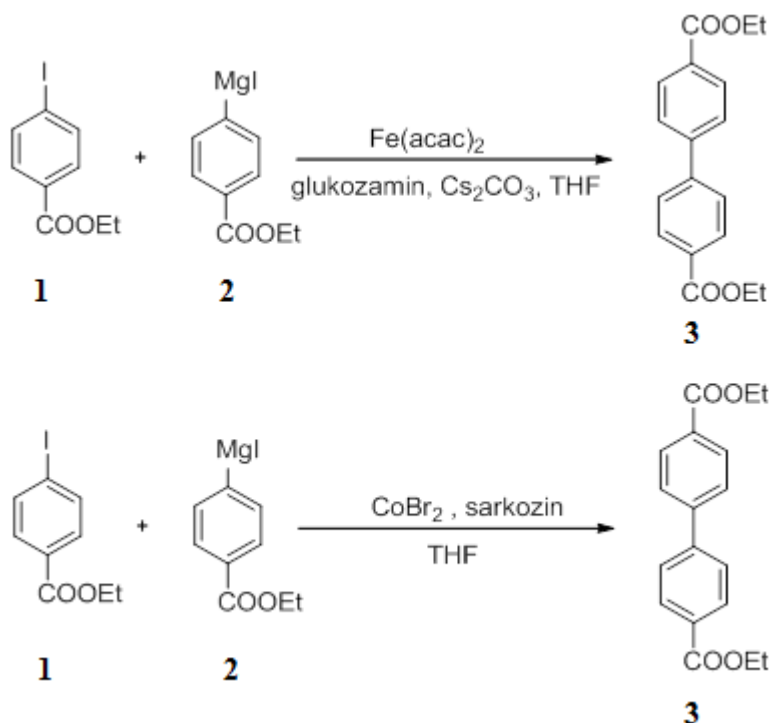
1. stopnja: sinteza spojine **2**



Slika 10: Reakcijska shema sinteze Grignardovega reagenta (spojine **2).**

V suho bučko (prežarjeno v vakuumu pri 300 °C in prepihano z argonom) smo dodali *sveže predestiliran, brezvodni THF* (6,28 ml) in *etil 4-jodobenzoat* (4,52 ml; 27,0 mmol) ter ohladili na -20 °C. 2 M raztopino *iPrMgCl* v THF (16,2 ml; 32,4 mmol) smo dodajali v reakcijsko zmes po kapljicah s stalnim pretokom 0,3 ml/min (slika 10). Po dodatku vsega *iPrMgCl* smo vsebino bučke mešali na magnetnem mešalu 1 uro pri temperaturi -10 °C, nato pa dobljeno suspenzijo ohladili nazaj na -20 °C ter jo takoj uporabili v naslednji reakciji.

2. stopnja: sinteza spojine 3



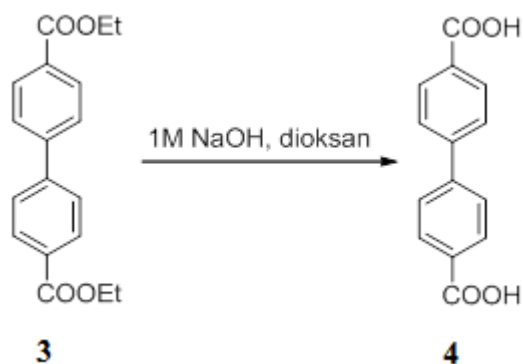
Slika 11: Reakcijski shemi sinteze spojine 3.

Za sintezo spojine **3** smo uporabili dva postopka z dvema različnima katalizatorjema (slika 11). V prvo suho bučko smo zatehtali *kobaltov (II) bromid* (27 mg; 0,15 mmol) in *sarkozin* (33 mg; 0,3 mmol), v drugo pa $\text{Fe}(\text{acac})_2$ (76 mg; 0,3 mmol), *D-glukozaminijev klorid* (65 mg; 0,3 mmol) in *cezijev (I) karbonat* (98 mg; 0,3 mmol). Bučki smo prepihali z argonom, ohladili na $-20\text{ }^\circ\text{C}$ in vanju dodali *sveže predestilirano THF* (40 ml) ter *etil 4-jodobenzoat* (1,0 ml; 6,0 mmol). Nato smo v vsako bučko s pretokom 0,067 ml/min dodajali raztopino produkta 1. stopnje v THF (spojina **2**; 9,0 ml; 9,0 mmol). Po dodatku celotne raztopine spojine **2** smo reakcijski zmesi mešali še 1,5 ure pri temperaturi $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Reakcijskim zmesem smo nato dodali nasičeno raztopino amonijevega klorida in v liju ločniku ekstrahirali s 100 ml etilacetata. Po ločitvi faz smo vodno fazo ponovno spirali s 100 ml etilacetata. Organski fazi po ekstrakciji smo združili, spirali s 50 ml nasičene raztopine NaCl in sušili z natrijevim sulfatom. Po filtraciji smo organski fazi dodali silikagel in topilo odparili pod znižanim tlakom pri temperaturi $55\text{ }^\circ\text{C}$. Silikagel s produktom smo prenesli na kolono in izvedli kolonsko

kromatografijo. Najprej smo kolono spirali s petroletrom, kasneje z mešanico petroleter/dietileter = 10:1 (V/V), na koncu pa še z dietiletrom. Ločevanje smo spremljali s tankoplastno kromatografijo. Po izvedbi kolonske kromatografije smo frakcije, ki so vsebovale produkt, združili, jim odpareli topilo pod znižanim tlakom in tako izolirali 190 mg belih kristalov spojine **3**.

IUPAC ime	Dietil bifenildikarboksilat
Izgled	Beli kristali
Tališče	110-112 °C (v literaturi [33] 111 °C)
Izkoristek reakcije	13 % (postopek z železovim katalizatorjem)
MF	Petroleter/dietileter = 10:1 (V/V)
Rf	0,11
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃): δ (ppm)	1,42 (t, 6H; <i>J</i> = 7,2 Hz; 2 x CH ₃), 4,41 (q, 4H, <i>J</i> = 7,2 Hz, 2 x CH ₂), 7,67-7,70 (m, 4H, Ar-H), 8,12-8,15 (m, 4H, Ar-H)

3. stopnja: sinteza spojine **4**



Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine **4.**

Produkt reakcije 2. stopnje (spojina **3**, 190 mg; 0,6 mmol) smo raztopili v mešanici 10 ml 1 M raztopine NaOH in 5 ml dioksana ter mešali 48 ur pri sobni temperaturi (slika 12). Po končani reakciji smo odparili topilo, dodali 10 ml 1 M NaOH ter sprali z 20 ml diklorometana. Vodno

fazo smo potem nakisali z 1 M HCl do pH = 1 ter izpadle kristale odfiltrirali z odsesavanjem. Masa izpadlih kristalov po končani reakciji je znašala 103 mg.

IUPAC ime	[1,1'-bifenil]-4,4'-dikarboksilna kislina
Izgled	Beli kristali
Tališče	>335 °C (v literaturi [34] 309-310°C)
Izkoristek reakcije	70 %
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ (ppm)	7,85-7,88 (m, 4H, Ar-H), 8,03-8,06 (m, 4H, Ar-H), 13,05 (bs, 2H, 2 x COOH)
IR (KBr): ν _{max} (cm ⁻¹)	3478, 2979, 2668, 2545, 1940, 1682, 1606, 1427, 1295, 1179, 1128, 1006, 927, 880, 846, 802, 757
FAB-EI	Izračunano za C ₁₄ H ₉ O ₄ : 241,0501 [M-H] ⁻ Izmerjeno: 241,0504

3.2. PRIDOBIVANJE PROTEINOV CYP53A15 IN CPR1

Preglednica I: Gojišča, reagenti in topila, ki smo jih uporabili pri ekspresiji, čiščenju, izolaciji in določanju aktivnosti encimov CYP53A15 in CPR1.

tekoče LB (Luria-Bertani) gojišče	Kazeinski hidrolizat (Tryptone) (10 g/l), kvasni ekstrakt (Yeast extract) (5 g/l) (oboje Becton, Dickinson and company, ZDA), NaCl (10 g/l), dopolnimo z dH ₂ O, pH uravnamo na vrednost 7,0 z dodajanjem NaOH; ko so sestavine zmešane in pH uravnan, avtoklaviramo 20 minut pri 121 °C in 2 barih; shranjujemo pri 4 °C
Trdno LBamp gojišče	Pred avtoklaviranjem dodamo LB gojišču 15 g agarja (Becton, Dickinson and company, ZDA) na liter gojišča, avtoklaviramo 20 minut pri 121 °C in 2 barih, ohladimo na približno 50 °C, dodamo ampicilin (Sigma-Aldrich) do končne koncentracije 100 mg/ml, aseptično prenesemo v petrijevke in shranjujemo pri 4 °C

Tekoče TB (Terrific Broth) gojišče	Kazeinski hidrolizat (Tryptone) (12 g/l), kvasni ekstrakt (Yeast extract) (24 g/l) (oboje Becton, Dickinson and company, ZDA), 4 ml glicerola, dopolnimo z 900 ml dH ₂ O, avtoklaviramo 20 minut pri 121 °C in 2 barih, ohladimo na 60 °C nato dodamo 100 ml pod istimi pogoji avtoklavirane raztopine 2,31 g KH ₂ PO ₄ in 12,54 g K ₂ HPO ₄ (Sigma-Aldrich), shranjujemo pri 4 °C
Kpi pufer s soljo	50 mM K ₂ HPO ₄ , 20 % (V/V) glicerol, pH 7,4, 0,5 M NaCl
Kpi pufer brez soli	50 mM K ₂ HPO ₄ , 20 % (V/V) glicerol, pH 7,4
Kovine v sledovih (Sigma-Aldrich)	FeSO ₄ x 7H ₂ O (40 mg/l), CaCl ₂ x 2H ₂ O (40 mg/l), MnSO ₄ x nH ₂ O (10 mg/l), AlCl ₃ x 6H ₂ O (10 mg/l), CoCl ₂ x 6H ₂ O (4 mg/l), ZnSO ₄ x 7H ₂ O (2 mg/l), NaMoO ₄ x 2H ₂ O (2 mg/l), CuSO ₄ x 5H ₂ O (1 mg/l), H ₃ BO ₃ (0,5 mg/l)
Ampicilin (Sigma-Aldrich)	50 mg/ml raztopimo v Milli-Q vodi in sterilno filtriramo
1 M tiamin (Sigma-Aldrich)	3,373 g tiamina raztopimo 10 ml Milli-Q vode in sterilno filtriramo
1 mM δ - aminolevulinska kislina (Fluka)	1 M; 5 g ALA raztopimo v 30 ml Milli-Q vode in sterilno filtriramo
0,5 M izopropil-β-D-tiogalaktozid (Sigma-Aldrich)	0,6 g IPTG raztopimo v 10 ml Milli-Q vode in sterilno filtriramo
1 mM riboflavin	10 mg raztopimo v 1 ml 0,1 M raztopini NaOH
10 mM Tris pufer	10 mM Tris-baza, pH uravnemo s HCl na vrednost 8,0
TES pufer	100 mM tris/acetat, 500 mM saharoza, 0,1 M EDTA, pH uravnemo na 7,4
1 mM etilendiamin tetraacetna kislina	0,5 M; 1,461 g EDTA raztopimo v 10 ml Milli-Q vode, pH uravnemo na vrednost 8,0 z NaOH
KMDG pufer	100 mM K ₂ HPO ₄ , 6 mM Mg-acetat, uravnemo pH na vrednost 7,4
0,1 mM ditiotreitol (Sigma-	1 M; 1,542 g DTT raztopimo v 10 ml Milli-Q vode in

Aldrich)	sterilno filtriramo
0,1 mM fenilmetilsulfonil fluorid (Sigma-Aldrich)	100 mM; 0,171 g PMSF raztopimo v 10 ml Milli-Q vode in sterilno filtriramo
Benzoaza (Merck)	aktivnost 250 U/ μ l, 30 min, 37 °C
Protease inhibitor cocktail (Sigma)	Inhibitor proteaz
Lizocim (Sigma)	lizocim iz kokošnjega jajčnega beljaka
<i>E. coli</i> sev C43	genotip: F- ompT hsdSB(τ B- mB-) gal dcm (DE3) (Lucigen, ZDA)
Plazmidi z vključki genov <i>bph</i> in <i>cpr1</i>	pETB ⁺ - <i>bph</i> , pET17b- <i>cpr1</i> (oboje Novagen, Nemčija)
Pufer za raztapljanje	20 mM Na-fosfat, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazol, 20 % (V/V) glicerol, uravnamo pH na vrednost 7,4
Triton-X-100 (Sigma-Aldrich)	detergent
Benzojska kislina (Sigma-Aldrich)	0,3 mM raztopina v etanolu
Ni Sepharose High Performance (The QIAexpressionist, Qiagen, Nizozemska)	Matriks za Ni-NTA
Vezavni pufer	20 mM Na-fosfat, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazol, uravnamo pH na 7,4
Elucijski pufer	20 mM Na-fosfat, 0,5 M NaCl, 500 mM imidazol, 20 % (V/V) glicerol, pH uravnamo na 7,4

Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabili pri našem delu:

-vodna kopel LKB Bromma 2019 multiheat thermostatic circulator,

-stresalnik Kuhner ISF-1-W,

-merilnik celične gostote Amersham Biosciences Ultrospec 10,

-namizna centrifuga Eppendorf centrifuge 5415R,

- tehtnica Kern KB 2000-2N,
- centrifuga Beckman Coulter Avanti J-E,
- ultracentrifuga Beckman L7-55,
- sonikator Cole Parmer ultrasonic processor,
- termoblok Biosan CH-10,
- elektroforezna kadička Invitrogen Xcell Surelock mini-cell,
- vir napetosti pri elektroforezi Invitrogen Powerease 500,
- magnetno mešalo Tehnica Rotamix 550 MMH,
- pH meter Mettler Toledo Seveneasy,
- spektrofotometer Agilent 8453.

3.2.1. Priprava proteina CYP53A15

Transformacija celic: v epico s kompetentnimi celicami *E. coli* C43, smo dodali 1 μ l plazmida pETB⁺ in celice inkubirali na ledu 30 minut. Celice smo nato izpostavili temperaturi 42 °C v vodni kopeli za 90 sekund, potem pa jih 5 minut inkubirali na ledu. Po 5 minutah smo celicam dodali 800 μ l tekočega LB gojišča (preglednica I) ter jih 1 uro inkubirali na stresalniku pri 37 °C. Zmes smo nato 3 minute centrifugirali pri 3500 rpm, supernatant delno odstranili, preostanek pa resuspendirali, ga s pipeto prenesli na LBamp ploščo (preglednica I) in ga razmazali po plošči. Postopek smo izvajali ob prižganem plinskem gorilniku, ki je zagotavljal aseptično okolje. Ploščo smo inkubirali čez noč pri 37 °C.

Ekspresija proteina: V 1 l erlenmajerici smo pripravili tekoče gojišče za transformirane celice iz: 10 ml kovin v sledovih, 2 ml ampicilina, 1 ml tiamina ter dopolnili do 1 l s TB tekočim gojiščem (preglednica I), ki je bilo predhodno segreto na 37 °C. Nato smo v pripravljeno gojišče z ezo nacepili transformante iz LBamp plošče in pustili stati 1 uro, da se je suspenzija homogenizirala. Gojišče z nacepljenimi transformanti smo po 1 uri razdelili v pet 1 l

erlenmajeric, tako da je bilo v vsaki 200 ml suspenzije in erlenmajerice stresali s frekvenco 170/minuto na stresalniku pri 37 °C. Rast transformiranih bakterij smo preverjali z meritvami optične gostote celic (OD) s spektrofotometrom pri valovni dolžini 600 nm. Pri tem smo OD merili glede na OD gojišča brez vcepljenih transformantov. Želena OD je bila med 0,7 in 1,0. Z indukcijo smo začeli, ko je bila OD 1,05. Indukcijo smo izvedli z dodatkom 200 µl ALA v vsako erlenmajerico. Po indukciji smo transformirane celice gojili 48 ur na stresalniku pri 30 °C in 160/minuto.

Izolacija in čiščenje proteina: Inducirane vzorce smo prenesli v centrifugirke in jih centrifugirali 10 minut na 5500 rpm pri 4 °C. Nato smo supernatant zavrgli, usedlini pa dodali 60 ml TES pufra, 30 mg lizocima (končna koncentracija lizocima 0,5 mg/ml) in 12 µl 0,5 M EDTA (končna koncentracija EDTA 0,1 mM). Mešanico smo suspendirali s stresanjem na ledu 30 minut, nato pa smo mešanico centrifugirali 10 minut na 5500 rpm pri 4 °C. Po centrifugiranju smo zopet zavrgli supernatant, usedlino pa resuspendirali v mešanici 50 ml KMDG pufra, 5 µl 1 M DTT (končna koncentracija DTT 0,1 mM), 50 µl 100 mM PMSF (končna koncentracija PMSF 0,1 mM), 5 µl benzoaze in polovice tablete proteaznih inhibitorjev (1 tableta na 100 ml). Vse smo izvajali na ledu. Resuspendirane vzorce smo sonicirali 15 minut (pri moči 38 % ter frekvenci 2 sekundi pulz, 1 sekunda premora) na ledeni kopeli ob občasnem mešanju. Vzorce smo prelili v centrifugirke in centrifugirali najprej pol ure pri 12000 rpm nato pa supernatant prelili v druge centrifugirke in ga ultracentrifugirali 1 uro pri 30000 rpm. Obakrat smo imeli vzorce med centrifugiranjem na temperaturi 4 °C. Supernatant smo odlili. Sediment smo resuspendirali v TES pufri in protein čistili z afinitetno Ni-NTA kromatografijo. Pri afinitetni kromatografiji smo najprej opravili raztapljanje membran z naslednjimi reagenti: 100 ml pufra za raztapljanje, 20 µl 1 M DTT (končna koncentracija DTT 0,2 mM), 100 µl 100 mM PMSF (končna koncentracija PMSF 0,1 mM), 20 µl 0,5 M EDTA (končna koncentracija 0,1 mM), 2 ml triton-X-100 (končni delež detergenta je 2 % (V/V)), ena tableta proteaznih inhibitorjev, 300 µl 1 M BA (končna koncentracija BA 0,3 mM). Raztapljanje je potekalo 1 uro na stresalniku v hladni sobi (pri 4 °C). Suspenzijo smo ultracentrifugirali 45 minut na 30000 rpm pri 4 °C, medtem pa smo pripravili Ni-NTA kolone za afinitetno kromatografijo. Pripravili smo tri 20 ml plastične kolone, pri čemer je vsaka vsebovala približno 5 ml matriksa. Matriks je bilo potrebno najprej

spirati, ker se shranjuje v 20 % etanolu. Zato smo najprej pustili, da etanol steče iz kolone, nato smo v vsako kolono dodali 25 ml Milli-Q vode (5-kratni volumen matriksa) in pustili, da steče skozi kolono, potem smo dodali 10 ml vezavnega pufra (2-kratni volumen matriksa) in počakali, da tudi steče skozi kolono. Ko je bil matriks spran, smo ga v vsaki koloni resuspendirali v 5 ml vezavnega pufra (1-kratni volumen matriksa). Resuspendirane matrikse smo prelili v stekleno čašo in jim dodali supernatant ultracentrifugiranih vzorcev ter vse skupaj stresali v hladni sobi (4 °C) 1 uro, pri čemer smo matriks občasno premešali, da se ni posedal. Po vezavi proteina na matriks v stekleni čaši, smo vzorce prelili nazaj v tri kolone in počakali, da se matriks v kolonah posede. Vsako kolono smo nato sprali z 10 ml vezavnega pufra (2-kratni volumen matriksa), s čemer smo sprali nevezan del vzorca. Sledila je elucija z mešanico 5 ml elucijskega pufra (1-kratni volumen matriksa), proteaznih inhibitorjev in BA. Frakcije smo lovili v falkonke, pri čemer smo prvo frakcijo zbirali do pojava kapljic rdeče barve, ki so pritekale iz kolone; te smo zbirali kot drugo frakcijo. Ko je iz kolone ponovno začela teči bistra tekočina, smo jo zbirali kot tretjo frakcijo. Po poteku afinitetne kromatografije, smo frakcije shranili na -80 °C, kolone pa očistili tako, da smo jih najprej sprali s 25 ml 1,5 M NaCl (5-kratni volumen matriksa), nato s 25 ml Milli-Q vode (5-kratni volumen matriksa) in jih shranili v 20 % etanolu.

3.2.2. Priprava proteina CPR1

Transformacija celic: Postopek smo izvedli enako kot pri transformaciji celic za pripravo proteina CYP53A15, le da smo uporabili 1 µl plazmida pET17b.

Ekspresija proteina: Tudi tu je bil postopek enak, kot pri ekspresiji proteina CYP53A15. S to razliko, da je bila zelena OD pri ekspresiji CPR1 med 0,5 in 0,7 in da smo indukcijo izvedli, ko je bila OD 0,58. Indukcijo smo tokrat izvedli z dodatkom 200 µl riboflavina v vsako erlenmajerico. Po indukciji smo transformirane celice gojili 48 ur na stresalniku pri 25 °C in 160/minuto.

Izolacija in čiščenje proteina: Inducirane vzorce smo prenesli v velike centrifugirke in jih centrifugirali 10 minut na 5500 rpm pri 4 °C. Nato smo supernatant zavrgli, celice v oborini pa resuspendirali z dodatkom 60 ml Kpi pufra s soljo. Suspenziji smo dodali 18 mg lizocima

(končna koncentracija lizocima 0,3 mg/ml), 6 μ l 1 M DTT (končna koncentracija DTT 0,1 mM) in 60 μ l 100 mM PMSF (končna koncentracija PMSF 0,1 mM) ter jo stresali 45 minut v hladni sobi (4 °C). Mešanico smo nato centrifugirali 10 minut na 5500 rpm pri 4°C. Po centrifugiranju smo zavrgli supernatant, usedlino pa resuspendirali v mešanici 200 ml Kpi pufra brez soli, 20 μ l 1 M DTT (končna koncentracija DTT 0,1 mM), 200 μ l 100 mM PMSF (končna koncentracija 0,1 mM), 5 μ l benzoaze in polovice tablete proteaznih inhibitorjev. Vse smo izvajali na ledu. Resuspendirane vzorce smo sonicirali 15 minut (pri moči 38 % ter frekvenci 2 sekundi pulz, 1 sekunda premora) na ledeni kopeli ob občasnem mešanju. Vzorce smo prelili v centrifugirke in centrifugirali najprej pol ure pri 12000 rpm, nato pa nastali supernatant prelili v druge centrifugirke in ga ultracentrifugirali 1 uro pri 30000 rpm. Obakrat smo imeli vzorce med centrifugiranjem na temperaturi 4 °C. Supernatant smo odlili, sediment pa smo resuspendirali v Kpi puftru, kateremu smo predhodno dodali 0,1 mM (končna koncentracija) PMSF in 0,1 mM (končna koncentracija) DTT. Suspenzijo smo homogenizirali z ročnim homogenizatorjem, jo prelili v epice in vzorce zmrznili na -80 °C.

3.2.3. Poliakrilamidna elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE)

Za NaDS-PAGE elektroforezo smo pripravili vzorce po vsakem koraku izolacije in čiščenja proteinov. Prvi vzorec za NaDS-PAGE smo pripravili tako, da smo 1 ml bakterijske kulture prenesli v epico, centrifugirali 2 minuti na 13200 rpm, supernatant odlili, oborino pa stehali in jo raztopili v 10-kratni količini 10 mM Tris pufra, glede na maso oborine. 40 μ l tako pripravljene raztopine smo prenesli v drugo epico, v katero smo dodali še 40 μ l 10 % (m/V) raztopine NaDS in 26,7 μ l vzorčnega elektroforeznega pufra (NuPAGE LDS sample buffer). Vzorce smo denaturirali 10 minut na 95 °C, s čemer smo zagotovili razvitje polipeptidne verige. Nato smo jih ohladili na ledu, centrifugirali, da je hitrost centrifuge dosegla 10000 rpm in do nanosa na gelu shranili pri temperaturi 4 °C.

Ostale vzorce smo pripravili tako, da smo 30 μ l vzorca po določeni stopnji čiščenja, dodali 10 μ l vzorčnega elektroforeznega pufra, denaturirali 10 minut na 95 °C, ohladili na ledu, centrifugirali, da je hitrost centrifuge dosegla 10000 rpm in do nanosa na gelu shranili na 4 °C. Tako smo pripravili vzorce za elektroforezo za membransko obliko CYP53A15 in CPR1,

CYP53A15 po ultracentrifugiranju pri Ni-NTA kromatografiji, nevezan CYP53A15 pri Ni-NTA kromatografiji, CYP53A15 pri spiranju kolone pri Ni-NTA ter za vsako elucijsko frakcijo CYP53A15 pri Ni-NTA.

Elektroforezno ločbo smo opravljali na poliakrilamidnem gelu (NuPAGE Novex (4-12 %) Bis-Tris gel) v prisotnosti NaDS. Elektroforezo smo izvedli po navodilih proizvajalca, tako da smo v vsak žepek gela nanесли 20 μ l vzorca, v en žepek pa elektroforezni standard molekulskih mas Novex Sharp. Elektroforezo smo izvajali v elektroforeznem pufu, ki smo ga pripravili tako, da smo zmešali 1 volumski delež elektroforeznega pufru (NuPAGE MES running buffer) in 20 volumskih deležev Milli-Q vode. Elektroforezo smo izvajali 40 minut pri napetosti 200 V ter jakosti električnega toka 125 mA/gel. Po končani elektroforezni ločbi smo gel pobarvali z barvilom Simply blue safestain po navodilih proizvajalca. Gel smo po obarvanju pustili čez noč v Milli-Q vodi na stresalniku pri sobni temperaturi, da se razbarva del gela, ki ni vseboval proteinov in zato ni vezal barvila.

3.2.4. CO diferenčni spekter za CYP53A15

Ker CYP53A15 po Ni-NTA kromatografiji vsebuje imidazol, ki se veže v aktivno mesto encima, je le tega potrebno odstraniti pred merjenjem aktivnosti encima. To smo storili z dializo v HGE pufru (50 mM HEPES, 15 % (V/V) glicerol, 0,1 mM EDTA v Milli-Q vodi), ki smo ga pred uporabo filtrirali skoti filter z velikostjo por 0,22 μ m. Vzorec CYP53A15 smo s pomočjo injekcijske igle vbrizgali v dializno kaseto Slide-A-Lyzer (10000 MM, 0,5-3 ml; Pierce biotechnology, ZDA). Kaseto smo pred uporabo 1 minuto namakali v HGE pufru, kot svetuje proizvajalec. Dializa je potekala 2 uri ob mešanju na magnetnem mešalu v hladni sobi (4 °C). Po dializi smo z injekcijsko iglo vzorec odstranili iz dializne kasete in z njim izvedli CO diferenčni spekter za CYP.

Postopek izvedbe CO diferenčnega spektra:

Z izvedbo CO diferenčnega spektra izmerimo delež aktivnega encima v vzorcu z merjenjem absorpcijskega maksimuma pri 450 nm, ki je značilen za encime CYP.

Bazno linijo smo določili z merjenjem absorbanca HGE pufra. CYP53A15 po dializi smo 5-krat redčili s HGE pufrom in s tako pripravljenim vzorcem posneli absolutni spekter. Nato smo vzorec prepihali z ogljikovim monoksidom, da se je le ta vezal na hem v CYP53A15, pri čemer smo imeli vzorec ves čas na ledu. Po prepihovanju, smo vzorcu dodali nekaj zrnca reducenta Na-ditionita ter večkrat zaporedoma izmerili CO diferenčni absorpcijski spekter v območju 400-500 nm (dokler je absorbanca pri 450 nm naraščala). Pri meritvi spektra smo uporabili kiveto iz kvarčnega stekla ter absorbanco merili s spektrofotometrom Agilent 8453.

Koncentracijo proteina smo v vseh primerih računali po Beer-Lambertovem zakonu ($A = \epsilon \cdot c \cdot l$). Koncentracijo aktivnega proteina CYP53A15 smo izračunali iz razlike absorbanca 450 nm - 500 nm, pri čemer smo uporabili ekstinkcijski koeficient $\epsilon = 100 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\text{Fe}^{+2} \text{ CO}$, $\text{Fe}^{+3} \text{ CO}$ razlika, $A_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$). Koncentracijo CYP53A15 pa smo izračunali iz absorbanca pri 412 nm - 417 nm (Fe^{3+} absolutni spekter), pri čemer smo uporabili aktivnostni koeficient $\epsilon = 150 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Delež aktivne oblike CYP53A15 smo izračunali z deljenjem koncentracije aktivne oblike proteina ($c(450 \text{ nm})$) s koncentracijo proteina, ki vsebuje hem in je zato vezal ogljikov monoksid ($c(417 \text{ nm})$).

Ker je bil volumen vzorca CYP53A15 po dializi prevelik, da bi z njim lahko pripravili dober rekonstitucijski sistem (RS) skupaj s CPR1, smo se odločili za koncentriranje proteina CYP53A15. Začetni volumen CYP53A15 (po dializi) je bil 1,6 ml, njegova koncentracija pa je bila 1 mg/ml. Koncentriranje smo izvedli z Amicon Ultra (10K, 2 ml; Millipore Ireland Ltd.). Amicon smo pred koncentriranjem sprali z Milli-Q vodo, centrifugirali, da je voda stekla iz Amiconu, nato pa vanj dodali vzorec s proteinom in centrifugirali 15 minut pri 17000 rpm. Po koncentriranju je protein ostal v Amiconu, tekočina pa je stekla skozi. Na ta način smo dobili 1 ml proteina CYP53A15 s koncentracijo 1,3 mg/ml. Vendar pa se je ob koncentriranju delno zmanjšala aktivnost CYP53A15 in sicer na 97 %.

3.2.5. Merjenje aktivnost NADPH CPR1

Merili smo aktivnost membranskih frakcij CPR1, ker so pretekle ekspresije encima pokazale večjo aktivnost le tega v membranski obliki. Za merjenje aktivnosti smo uporabili komplet Cytochrome c reductase (NADPH) assay kit (Sigma Aldrich, ZDA). Gre za kolorimetrični

test, ki meri redukcijo citokroma c z NADPH - citokrom c reduktazo, s čimer se poveča absorbanca pri 550 nm. Komplet za izvajanje testa vsebuje: delovni pufer (300 mM K-fosfat pH 7,8 in 0,1 mM EDTA), encimski redčitveni pufer (300 mM K-fosfat pH 7,8, 0,1 mM EDTA in 0,5 mg/ml govejega serumskega albumina), citokrom c, NADPH, citokrom c reduktazo iz zajčjih jeter (pozitivna kontrola) in raztopino inhibitorja citokrom c oksidaze (50 mM KCN v vodni raztopini). Poskus smo izvedli tako kot priporoča proizvajalec. Pripravili smo raztopino NADPH v destilirani vodi (0,85 mg/ml) in delovno raztopino (citokrom c v delovnem pufru; 0,45 mg/ml). Poskus smo začeli s preverjanjem aktivnosti slepega vzorca. V kiveto smo dali 237,4 µl delovne raztopine in 12,5 µl encimskega pufra ter s spektrofotometrom pomerili absorbanco pri 550 nm. Nato smo pomerili še absorbanco našega vzorca. Tega smo pripravili tako, da smo CPR1 10-krat redčili z encimskim pufrom, ter 12,5 µl tako pripravljene raztopine dodali 237,4 µl delovne raztopine in pomerili njeno absorbanco pri 550 nm. Po približno 20 sekundah merjenja absorbance, smo vzorcu dodali 25 µl raztopine NADPH ter še tri minute merili absorbanco pri 550 nm.

Aktivnost CPR1 smo računali po naslednji enačbi (enačba 1):

$$\frac{\text{Enota}}{\text{mL}} = \frac{\Delta A_{550}/\text{min} * \text{FR} * 0,275}{21,1 * V(\text{enc})}$$

Enačba 1

Definicija enote: ena enota CPR1 reducira 1,0 µmol oksidirane citokroma c na minuto, v prisotnosti 100 µM NADPH pri pH 7,8 in 25 °C.

$\Delta A_{550}/\text{min} = \Delta A_{\text{vzorca}}/\text{min} - \Delta A_{\text{slepe}}/\text{min}$ (ΔA – sprememba absorbance vzorca oz. slepe glede na začetno referenčno vrednost (pufra), merjena pri 550 nm)

FR = redčitveni faktor vzorca CPR

V(enc) = volumen vzorca encima (mL)

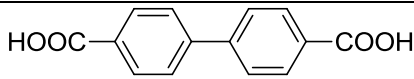
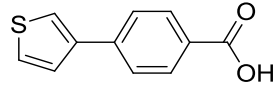
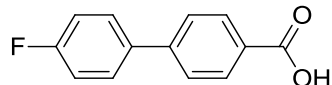
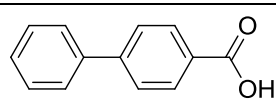
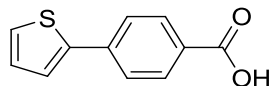
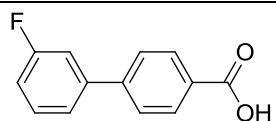
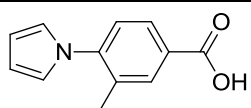
21,1 = ekstinkcijski koeficient (ϵ^{mM}) reducirane citokroma c

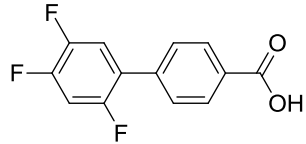
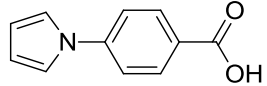
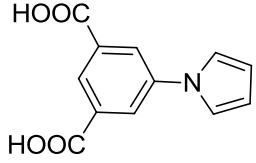
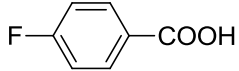
0,275 = volumen vzorca (mL)

3.3. BIOKEMIJSKO PREIZKUŠANJE ZAVIRALCEV CYP53A15

V magistrski nalogi smo z biokemijskim preizkušanjem preverjali inhibitorno delovanje 11 spojin (preglednica II) na encim CYP53A15 in na glivno rast. Spojine smo izbrali na podlagi encimskega modela (PMDB ID: PM0075149) ter molekulskega sidranja. Pri tem smo upoštevali naše predhodne ugotovitve o povezavi med strukturami spojin in njihovim inhibitornim delovanjem na tarčni encim CYP53A15. Te lastnosti so bile: fenilni obroč, ki ima na mestu 4 vezano karboksilno skupino, ki poskrbi za pravilno orientacijo v vezavno mesto, in substitucije na določenih mestih aromatskega obroča. Večina testiranih spojin je bila kupljenih, 2 spojini (SMB-28 in SMB-31) sta bili sintetizirani na Fakulteti za farmacijo, 1 spojino (SZK-3) pa smo sintetizirali v okviru magistrskega dela.

Preglednica II: Strukture spojin, ki smo jih uporabili pri našem delu.

Oznaka spojine	Struktura	Oznaka spojine pri testih
4		SZK-3
5		A4
6		A7
7		D2
8		D3
9		D4
10		I26

11		SMB-28
12		SMB-31
13		STK
14		4-FBA

Preglednica III: Gojišča, reagenti in topila, ki smo jih uporabili pri *in vitro* in bioloških testih spojin.

HGE pufer	50 mM HEPES, 15 % (V/V) glicerol, 0,1 mM EDTA v Milli-Q vodi, pH 7,4
Acetonitril (J.T. Baker, ZDA)	
Dimetilsulfoksid	
Dializni pufer za rekonstitucijski sistem	50 mM HEPES, 15 % (V/V) glicerol, 0,1 mM EDTA v Milli-Q vodi
Mobilna faza A	5 % (V/V) acetonitril in 0,1 % (V/V) H ₂ SO ₄ v Milli-Q vodi; pred dodatkom H ₂ SO ₄ , smo mobilno fazo sonicirali z ultrazvočno kadičko 5 minut, da ni bilo prisotnih mehurčkov zraka, ki bi lahko zamašili RP-HPLC kolono
Mobilna faza B	90 % (V/V) acetonitril in 0,1 % (V/V) H ₂ SO ₄ v Milli-Q vodi; pred dodatkom H ₂ SO ₄ , smo mobilno fazo sonicirali
BA (Sigma-Aldrich, ZDA)	10 mM raztopina v etanolu
4-HBA	10 mM raztopina v etanolu
NADPH (Sigma-Aldrich, ZDA)	0,1 M raztopina v HGE pufru

disperzija lipidnih veziklov	20 % (m/V) dilauril fosfatidilholin - DLPC (Sigma-Aldrich), 20 % (m/V) ergosterol (Sigma-Aldrich), 20 % (m/V) sfingomielin (Sigma-Aldrich) v HGE pufri
Trdno gojišče MBFA (malt extract agar-Blakeslee's Formula)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sestavine brez glukoze: malt extract (20 g), pepton (1 g), agar (20 g), destilirana voda (900 ml) 2. Posebej smo sterilizirali: glukoza (20 g), destilirana voda (100 ml) 3. Pred uporabo smo zmešali raztopini 1 (900 ml) in 2 (100 ml).

Pri biokemijskem preizkušanju smo uporabili laboratorijsko opremo:

- spektrofotometer z dvožarkovnim sistemom Perkin Elmer Lambda 950,
- vorteks Neolab D-6012,
- dializna kasetna Pierce biotechnology Slide-A-Lyzer (10000 MM, 0,5-3 ml),
- magnetno mešalo Tehnica rotamix 550MMH,
- stresalnik Kuhner ISF-1-W,
- namizna centrifuga Eppendorf centrifuge 5415R,
- analitska tehtnica Mettler Toledo xs205 dualrange,
- HPLC Waters 2695 separations module, 2487 dual λ absorbance detector,
- inkubator za glivno rast WTB Binder
- komora z laminarnim pretokom zraka Iskra pio MC 12-2.

3.3.1. Priprava rekonstitucijskega sistema (RS) in RP-HPLC analiza inhibitorjev

Priprava RS: Da bi posnemali encimsko funkcijo CYP53A15, ki je membranski encim, smo morali rekonstituirati sistem, del katerega je CYP53A15 v celicah. Zato smo pripravili RS, ki so ga sestavljali: očiščena frakcija CYP53A15 (po Ni-NTA), membranska frakcija CPR1, ter lipidni vezikli (preglednica III), v katere se je vključil CYP53A15 in so posnemali vlogo celičnih membran. Ker CPR1 ne predstavlja 100 % deleža frakcije, ampak del predstavlja tudi pripadajoči del membrane, smo koncentracijo CPR1 izračunali iz meritev aktivnosti le te. Množinsko razmerje med proteinoma v RS mora biti 20:1 v korist CPR1. Sistem smo tako pripravili iz 500 μ l CYP53A15, 1980 μ l CPR1, 375 μ l disperzije lipidnih veziklov in 145 μ l HGE pufra. Koncentracija CYP53A15 je bila 1,3 mg/ml, njegova aktivnost pa je bila 97 %. Aktivnost CPR1 je bila 13,8 EU/ml, kar pomeni, da je koncentracija CPR1 6,9 mg/ml. Množino CYP53A15 smo izračunali po formuli $n=cV$, pri čemer smo za pretvorbo masne koncentracije CYP53A15 v množinsko uporabili molsko maso CYP53A15, ki znaša 56798 g/mol. Končni rezultat je bila množina CYP53A15 v RS, ki je znašala 0,00868 μ mol. Torej je bila potrebna množina CPR1 20-krat večja in je znašala 0,194 μ mol. Potreben volumen membranske frakcije smo izračunali po zgoraj napisani formuli, pri čemer smo upoštevali molsko maso CPR1, ki znaša 77284 g/mol. Potreben volumen membranske frakcije CPR1 bi bil 2,19 ml, vendar smo mi v RS dodali 1,98 ml. Pripravljen RS smo nato 2 uri dializirali v dializnem pufru ob stalnem mešanju na magnetnem mešalu pri temperaturi 4 °C.

Ugotavljanje aktivnosti RS: Reakcije preverjanja aktivnosti RS so potekale v 12 ml steklenih vialah ob stresanju na stresalniku (170/minuto) pri temperaturi 28 °C. V vialo smo dali 100 μ l RS po dializi, 96,8 μ l HGE pufra, 1 μ l 10 mM BA in 2,2 μ l 0,1 M NADPH. Iz vialo, v kateri je potekala reakcija, smo odvzeli 40 μ l vzorca 10, 45 in 90 minut po dodatku NADPH v vialo. V epico, v katero smo, ob zgoraj naštetih časovnih točkah, odvzeli vzorec, smo takoj dodali 60 μ l acetonitrila, s katerim smo zagotovili takojšnjo inaktivacijo našega RS v vzorcu. Po dodatku acetonitrila smo epico vorteksirali nekaj sekund. Ko smo imeli vse vzorce zbrane, smo jih centrifugirali 10 minut pri 13200 rpm, nato pa 80 μ l supernatanta prenesli v vialo za RP-HPLC analizo, s katero smo preverjali pretvorbo BA v 4-HBA v določeni časovni točki.

Testiranje inhibitorjev (RP-HPLC): Za ugotavljanje inhibitornega delovanja izbranih inhibitorjev na naš RS, smo pripravili reakcijske mešanice v 12 ml steklenih vialah. Vsaka

reakcijska mešanica je vsebovala 150 μl RS, 1,5 μl 10 mM BA (končna koncentracija 50 mM), 142,2 μl HGE pufra, 3 μl 10 mM inhibitorja (raztopljenega v DMSO, končna koncentracija 100 μM) in 3,3 μl 0,1 M NADPH. Pri pripravi vzorcev z inhibitorji smo v vialo najprej dodali 100 μM raztopine inhibitorjev v DMSO in RS ter 10 minut inkubirali v stresalniku na 28 °C, da smo zagotovili dostop inhibitorja do aktivnega mesta encima. Nato smo dodali v vialo še preostale komponente. Pripravili smo tudi pozitivno kontrolo, ki ni vsebovala inhibitorja in s katero smo preverjali aktivnost RS. Pozitivna kontrola je bila pripravljena iz 150 μl RS, 1,5 μl 10 mM BA (končna koncentracija 50 μM), 145,2 μl HGE pufra in 3,3 μl 0,1 M NADPH. Končni volumen vzorcev je bil v obeh primerih 300 μl . Tudi tokrat smo vzorce v vialah inkubirali v stresalniku ob stalnem stresanju s frekvenco (160/minuto) in pri temperaturi 28 °C. Potek reakcije smo spremljali z odvzemom 40 μl vzorca iz viale ob časovnih točkah: 5, 10, 25, 45, 90, 180 in 300 minut. Tudi tokrat smo ob odvzemu vzorca v epice, le temu takoj dodali 60 μl acetonitrila in nekaj sekund vorteksirali. Zopet smo vzorce zbrane v vseh časovnih točkah in z vsemi inhibitorji centrifugirali pri 13200 rpm 10 minut. Nato smo 80 μl supernatanta prenesli v vialo za RP-HPLC analizo. Test smo izvajali z inhibitorji: D3, D4, A4, A7, SZK-3, SMB-28 in STK. Pripravili smo tudi standardne raztopine substrata (BA), produkta (4-HBA) in inhibitorjev. Standarde BA in 4-HBA smo pripravili tako, da smo 0,5 μl 10 mM raztopine BA, oziroma 4-HBA, dodali 99,5 μl acetonitrila. Standarde inhibitorjev smo pripravili tako, da smo 1 μl 10 mM raztopine standarda dodali 99 μl acetonitrila.

RP-HPLC (Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography) je oblika kolonske kromatografije, pri kateri se za ločevanje molekul uporablja hidrofobna stacionarna faza in polarna mobilna faza. Na ta način lahko ločimo tudi proteine in lipide na osnovi njihovega hidrofobnega značaja. Inhibitorje, 4-HBA in BA smo identificirali na podlagi njihovih kromatografskih (retencijski čas) in spektralnih lastnosti glede na standardne raztopine, ki so bile injicirane v isti sekvenci. Ločbo smo opravljali s kolono RP-YMC C18, pri čemer smo uporabili dve mobilni fazi (mobilna faza A in B) (preglednica III). Pretok med analizo je bil 1 ml/min, volumen injiciranja je bil 10 μl , vzorci so bili med analizo shranjeni pri 4 °C, kolona pa je bila termostatorirana na 30 °C. Detekcija je potekala pri 230 in 250 nm. Ločevanje in analiza je potekala po gradientnem programu (preglednica IV).

Preglednica IV: Program, s katerim smo izvedli RP-HPLC analizo testiranih spojin z RS. Prikazan je časovni potek programa in uporabljene mobilne faze med izvedbo programa.

Čas (minute)	Mobilna faza A (%)	Mobilna faza B (%)
0-3	100	0
3-6	100-70	0-30
6-12	70-40	30-60
12-18	40-0	60-100
18-20	0	100
20-23	100	0

3.3.2. Vezavni testi

Vezavne spektre smo izvajali s sledečimi spojinami: BA kot kontrolo ter inhibitorji A7, I26, SMB-28, STK in SZK-3. Pripravili smo 10 mM raztopine inhibitorjev v DMSO ter slepo raztopino brez inhibitorja. Pripravili smo tudi 12 ml 1,1 μ M raztopine očiščenega CYP53A15 v HGE pufri.

Vezavne spektre smo posneli z merjenjem absorbance pri valovni dolžini med 300 in 500 nm na spektrofotometru z dvožarkovnim sistemom z integracijsko sfero 150 nm in spektralnim območjem 200 - 2500 nm.

Za meritve smo uporabili dve kiveti, ki sta bili razdeljeni na dva, med seboj ločena razdelka. V en razdelek vsake kivete smo dali 1 ml HGE pufra, v drugega pa enako količino 1,1 μ M raztopine CYP53A15. Za določitev bazne linije smo pomerili absorbance tako napolnjenih kivet. Nato smo merili absorbance po dodatku inhibitorjev tako, da smo inhibitor dodali k pufri v eni kiveti (služi kot referenca), v drugo kiveto pa smo inhibitor dodali k raztopini CYP53A15. Dodajali smo po 2 μ l oziroma 10 μ l 10 mM raztopine inhibitorja. V druga razdelka kivet pa smo dodali ekvivalentni volumen DMSO-ja, da smo preprečili učinek redčenja na rezultate. Po vsakem dodatku smo pomerili absorbance. Kiveta je bila vstavljena v spektrofotometer tako, da je žarek najprej prehajal vzorec nato pufer in najprej vzorčno in nato referenčno kiveto.

3.3.3. Biološki testi

Za izvedbo bioloških testov smo uporabili glivne seve:

a) *Cochliobolus lunatus* m118 (MUCL 38696) (Friedrich Schiller University, Jena, Germany) Rozman, D., Hennebert, G.L., Kunej, T., Decock, C., Komel R.. Steroid biotransforming strains designated *Cochliobolus lunatus* m118 and *Curvularia lunata* AT46 are both *Curvularia lunata* var. *lunata*. Mycotaxon, 59:489-498 (1996)

b) *Cochliobolus lunatus* m118 Δbph (Podobnik B., Stojan J., Kraševc N., Seliškar M., Lanišnik Rižner T., Rozman D., Lah L., Radovan Komel R. Benzoate para hydroxylase of *Cochliobolus lunatus* var. *Curvularia lunata* CYP53 – a novel antifungal drug target. J. Med. Chem. 51:3480-3486 (2008)

c) *Aspergillus niger* N402 (*cspA1*) (Bos C.J., Debets A.J.M, Swart K., Huybers A., Kobus G., Slakhorst S.M.. Genetic analysis and the construction of master strains for assignment of genes to six linkage groups in *Aspergillus niger*. Curr Genet 14:437–443 (1988)).

d) *Pleurotus ostreatus* Plo5 (zbirka ZIM, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija).

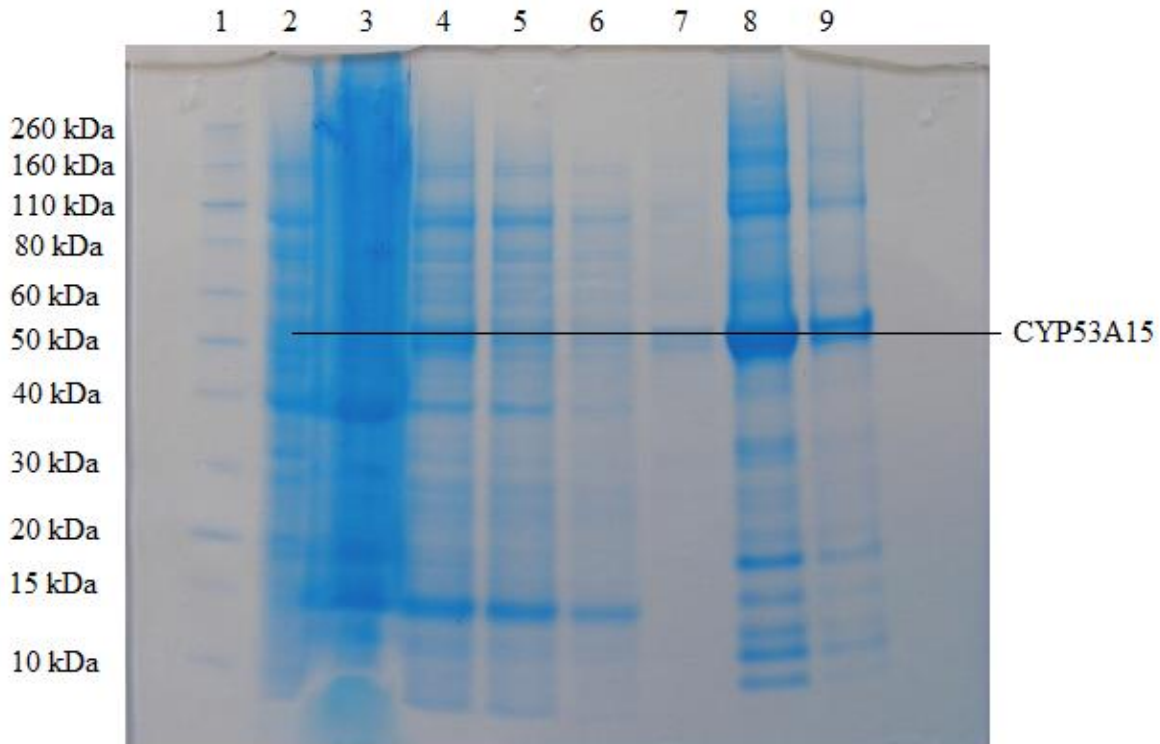
Za ugotavljanje inhibicije rasti gliv ob prisotnosti inhibitorjev smo opravili glivne teste na štirih zgoraj naštetih sevih gliv. Za biološki test smo pripravili raztopine izbranih inhibitorjev v DMSO-ju ter raztopino BA v 96 % (V/V) etanolu. Tako pripravljene raztopine so bile 100 mM, ob dodatku raztopine inhibitorja v gojišče pa je bila končna koncentracija inhibitorjev, pri kateri smo izvajali teste 0,1 mM. Za vsak inhibitor smo pripravili 15 petrijevok. V 12 petrijevok smo vlili mešanico agarja, glukoze (4 ml mešanice na petrijevko) in inhibitorja (4 μ l inhibitorja na petrijevko). V preostale 3 petrijevke pa smo pripravili agar (4 ml na petrijevko), BA in inhibitor (4 μ l BA in 4 μ l inhibitorja na petrijevko). Pripravili smo tudi kontrolne plošče, torej za vsak sev tri paralelke plošč z DMSO, etanolom ter mešanico etanola in DMSO. Ko je bil agar v petrijevkah strjen, smo vcepek pripravili tako, da smo iz središča petrijevke (premer 35 mm) najprej odstranili kolobar (premer 5 mm) gojišča, nato pa na to mesto vstavili 5 mm plošček micelija 5-dnevne glivne kulture. Izjema je bila gliva *A. niger*, za

katero smo vcepek pripravili tako, da smo spore 5-dnevne glivne kulture suspendirali v fiziološki raztopini in potem 10 μ l tako pripravljene suspenzije ($\sim 10^7$ spor) kapnili na sredino plošče. Delo smo izvajali v aseptičnem okolju (LAF komora). Plošče smo inkubirali pri 28 °C. Rast gliv smo spremljali z merjenjem premerov glivne kulture. Premere smo merili v časovnem intervalu 24 ur, dokler večina gliv ni prerastla gojišča, za kar so v našem primeru glive potrebovale približno 4 dni. Načrtali smo diagrame rasti v odvisnosti od časa inkubacije. Radialno hitrost rasti (RGR) smo določili iz naklona regresijskih premic v linearni fazi rasti. Začetno inhibicijo rasti (IGI) smo določili tako, da smo regresijske premice ekstrapolirali na rast nič (5 mm) in odčitali presek na časovni osi. Biološke teste smo izvajali s spojinami: I26, STK, SZK-3, 4-FBA, D2, D3, D4, SMB-28, SMB-31.

4. REZULTATI

4.1. EKSPRESIJA, ČIŠČENJE IN MERJENJE AKTIVNOSTI CYP53A15

Ekspresijo in čiščenje proteina CYP53A15 smo opravljali po že uveljavljenem postopku. Uspešnost ekspresije in čiščenja smo preverjali z vzporednim izvajanjem analize z NaDS-PAGE. Najboljše razmerje proteinov CYP53A15 smo dobili, če smo za ekspresijo uporabili sistem kompetentnih celic *E. coli* C43 z vstavljenim plazmidom pET-17b in jih gojili 44 ur pri 30 °C v stresalniku pri frekvenci 160/min. Ugotovljeno je bilo, da se protein nahaja v membranski frakciji, zato smo opravili postopek raztapljanja membran z detergentom Triton-X-100. Tako pridobljeni protein CYP53A15 smo nato čistili z Ni-NTA kromatografsko tehniko, katere optimizacija je bila prav tako predhodno opravljena. Uspešnost postopka čiščenja je vidna na spodnji sliki 13. Izmed treh elucijskih frakcij, pridobljenih po Ni-NTA, je bila največja koncentracija proteina v frakciji 2, v kateri je bila ta vrednost 16,2 µM. Ker smo želeli njegovo koncentracijo nekoliko povežati, smo izvedli koncentriranje z Amicon Ultra (2 ml, 10 K; Millipore Ireland Ltd.). Pred koncentriranjem je bil volumen raztopine CYP53A15 1,6 ml po koncentriranju pa smo dobili 1 ml CYP53A15 s koncentracijo 1,29 mg/ml. Pri tem je aktivnost CYP53A15, ki smo jo računali z diferencialnim CO spektrom nekoliko padla in sicer iz 100 % pred koncentriranjem na 97 % po koncentriranju.

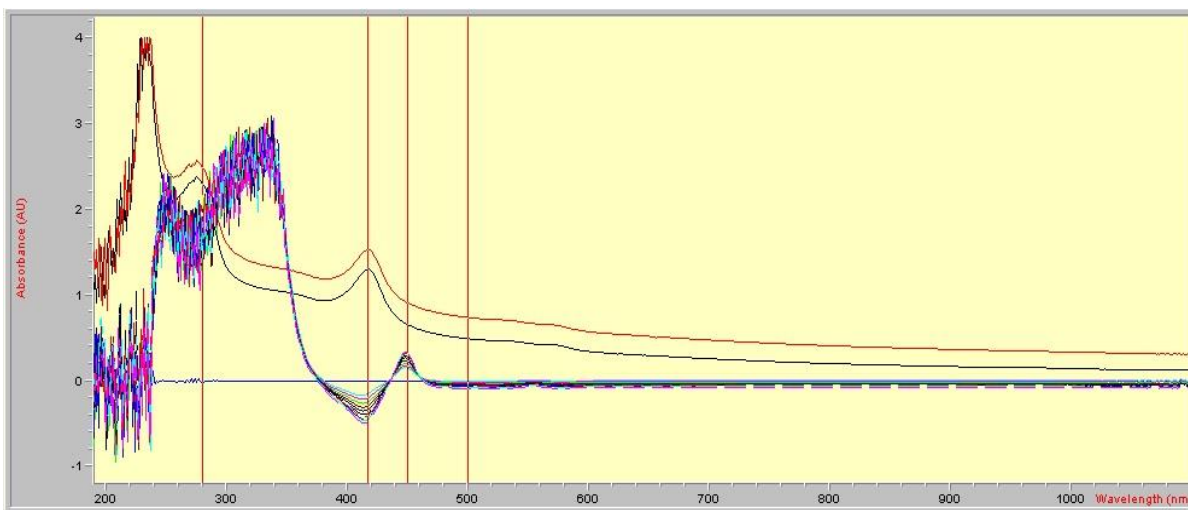


Slika 13: NaDS-PAGE analiza proteina CYP53A15 pri vsaki stopnji izolacije in čiščenja.
Standardna lestvica molskih mas: Novex® Sharp Pre-stained Standard.

Legenda:

1. Standard Novex Sharp
2. CYP53A15 biomasa
3. izolirana membranska frakcija CYP53A15
4. membranska frakcija CYP53A15 po ultracentrifugiranju
5. nevezan CYP53A15 pri Ni-NTA
6. CYP53A15 po spiranju kolone Ni-NTA
7. prva elucijska frakcija pri Ni-NTA
8. druga elucijska frakcija pri Ni-NTA
9. tretja elucijska frakcija pri Ni-NTA

Aktivnost dializiranega in skoncentriranega proteina CYP53A15 smo določili s CO diferenčnim spektrom CYP.



Slika 14: CO diferenčni spekter CYP53A15 po Ni-NTA, dializi s HGE pufrom ter koncentriranju. Črna in rdeča krivulja predstavljata absolutni spekter 5x redčenega CYP53A15 v HGE pufu, pred prepihavanjem z ogljikovim monoksidom. Barvne krivulje predstavljajo isti vzorec CYP53A15, po prepihavanju z ogljikovim monoksidom in dodatku Na-ditionita, merjen vsakih 10 sekund, dokler je maksimum pri 450 nm naraščal.

Iz spektra smo izračunali aktivnost encima tako, da smo uporabili podatke krivulje, ki je imela največjo vrednost absorbance pri 450 nm ter črne krivulje, s katero smo definirali bazno linijo.

Izračun aktivnosti:

$$\epsilon (\text{CO diff. } 450 \text{ nm}) = 100 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon (\text{Fe}^{3+} \text{ absol. } (417 \text{ nm})) = 125\text{-}162 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{ (za izračun smo vzeli vrednost } 150 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}\text{)}$$

$$l = 1 \text{ cm}$$

$$A (\text{CO diff. } 450 \text{ nm} - 500 \text{ nm}) = 0,414984$$

$$A (417 \text{ nm} - 450 \text{ nm}) = 0,64588$$

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

$C1 (417 \text{ nm}) = A / \epsilon l = 0,004306 \text{ mM} * 60 \text{ g/mol} * 5 \text{ (redčitev)} = 1,29 \text{ mg/ml}$

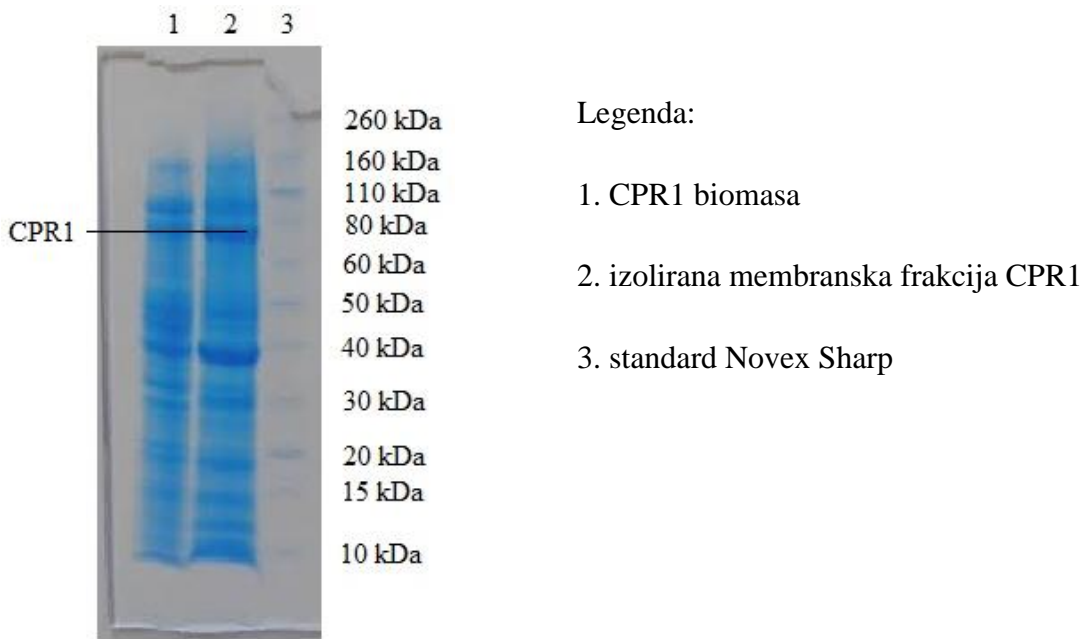
$C2 (\text{CO diff. } 450 \text{ nm}) = 0,00415 \text{ mM} * 60 \text{ g/mol} * 5 \text{ (redčitev)} = 1,245 \text{ mg/ml}$

Aktivnost ($c_{450 \text{ nm}} / c_{417 \text{ nm}}$) = $C2/C1 = 97 \%$

Iz izračuna je razvidno, da je bila koncentracija CYP53A15 1,29 mg/ml, od tega je bilo aktivnega 1,245 mg/ml oziroma 97 % vseh proteinov.

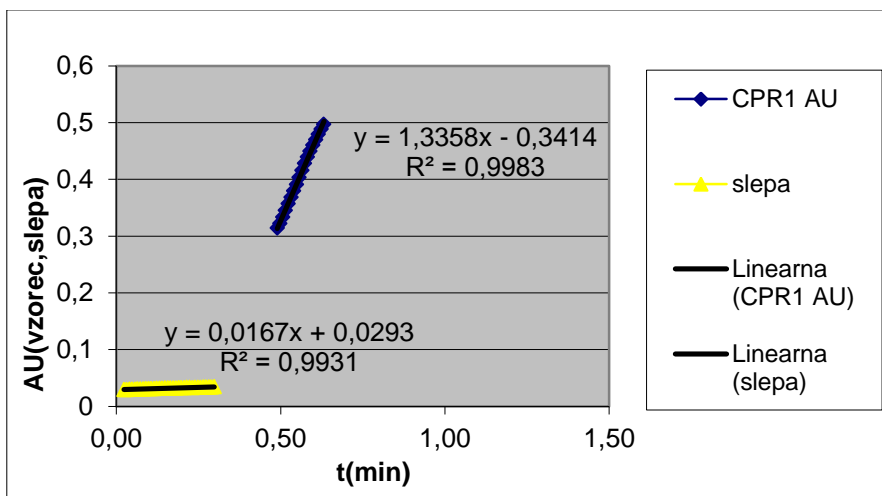
4.2. EKSPRESIJA, ČIŠČENJE IN MERJENJE AKTIVNOSTI CPR1

Tako kot pri CYP53A15 smo tudi pri CPR1 opravljali ekspresijo proteina in njegovo izolacijo ter čiščenje po že ustaljenem postopku. Prav tako smo tudi tu uspešnost ekspresije in izolacije preverjali z analizo NaDS-PAGE (slika 15). Največji delež proteina CPR1 smo dobili, če smo za ekspresijo uporabili kompetentne celice *E. coli* C43 z vstavljenim plazmidom pET17b ter gojenje izvajali na stresalniku 48 ur pri temperaturi 25 °C in frekvenci stresanja 160/min. Tako kot CYP53A15 se tudi CPR1 nahaja v membranah. Vendar pa proteina CPR1 nismo izolirali iz membranskih frakcij, saj je bila ugotovljena večja aktivnost encima, če se ta nahaja v obliki membranske frakcije. Aktivnost CPR1 smo preverili s testom s citokromom c, pri čemer je aktivnost našega proteina znašala 13,8 EU/ml.



Slika 15: NaDS-PAGE analiza CPR1, ki smo jo opravili pri dveh stopnjah izolacije encima. Standardna lestvica molskih mas Novex® Sharp Pre-stained Standard.

Meritev aktivnosti CPR1 smo opravili s testom s citokromom c. Pri tem smo aktivnost izračunali iz naklona krivulje in naklona bazne linije (slika 16).



Slika 16: Merjenje aktivnosti membranske frakcije CPR1. Meritve absorbance smo izvajali 3 minute, vzorec pa je bil za izvedbo meritve 5-krat redčen. Vzorec, kateremu smo pomerili absorbanco pred dodatkom NADPH je označen rumeno (slepa), medtem ko je vzorec po dodatku NADPH označen modro. Na grafu so zajeti le deli krivulj, ki so bili osnova za linearizacijo, s čimer smo dobili premici, katerih enačba in ujemanje s krivuljo sta zapisani poleg.

Izračun aktivnosti z enačbo 1:

$$\frac{\text{Enota}}{\text{mL}} = \frac{\Delta A_{550}/\text{min} * \text{FR} * 0,275}{21,1 * V(\text{enc})}$$

Definicija enote: ena enota CPR reducira 1,0 μmol oksidirane citokroma c na minuto, v prisotnosti 100 μM NADPH pri pH 7,8 in 25 °C.

$$\Delta A_{550}/\text{min} = \Delta A(\text{vzorec})/\text{min} - \Delta A(\text{slepa})/\text{min}$$

$$\Delta A(\text{vzorec})/\text{min} = 1,3358$$

$$\Delta A(\text{slepa})/\text{min} = 0,0167$$

$$V = 275 \mu\text{l}$$

$$\epsilon (\text{ekstincijski koeficient za reduciran citokrom c}) = 21,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$V(\text{enc}) = 1,25 \mu\text{l}$$

$$\text{FR} = 5x$$

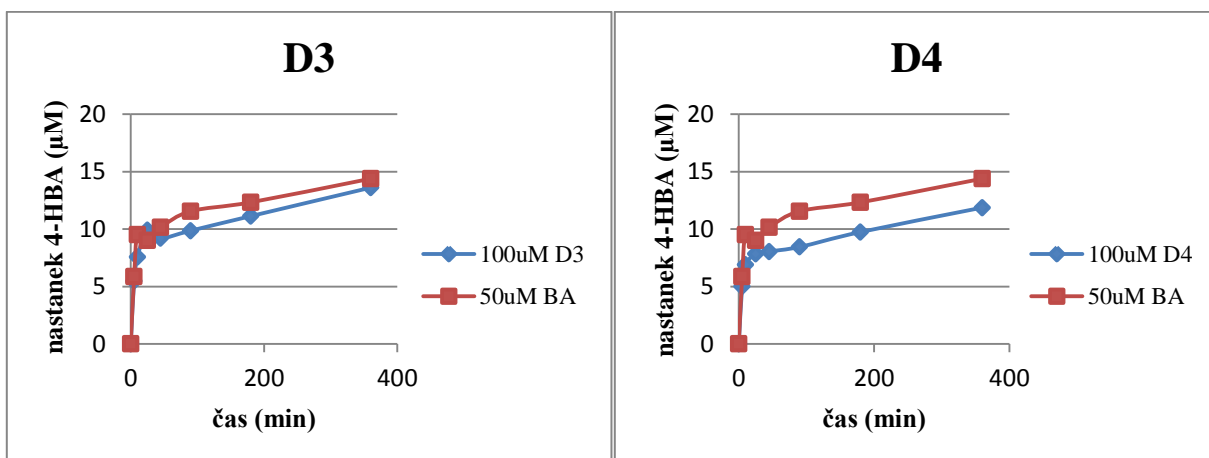
Izračun po zgoraj omenjeni enačbi nam pove, da je aktivnost membranske frakcije CPR1 znašala 13,8 EU/ml.

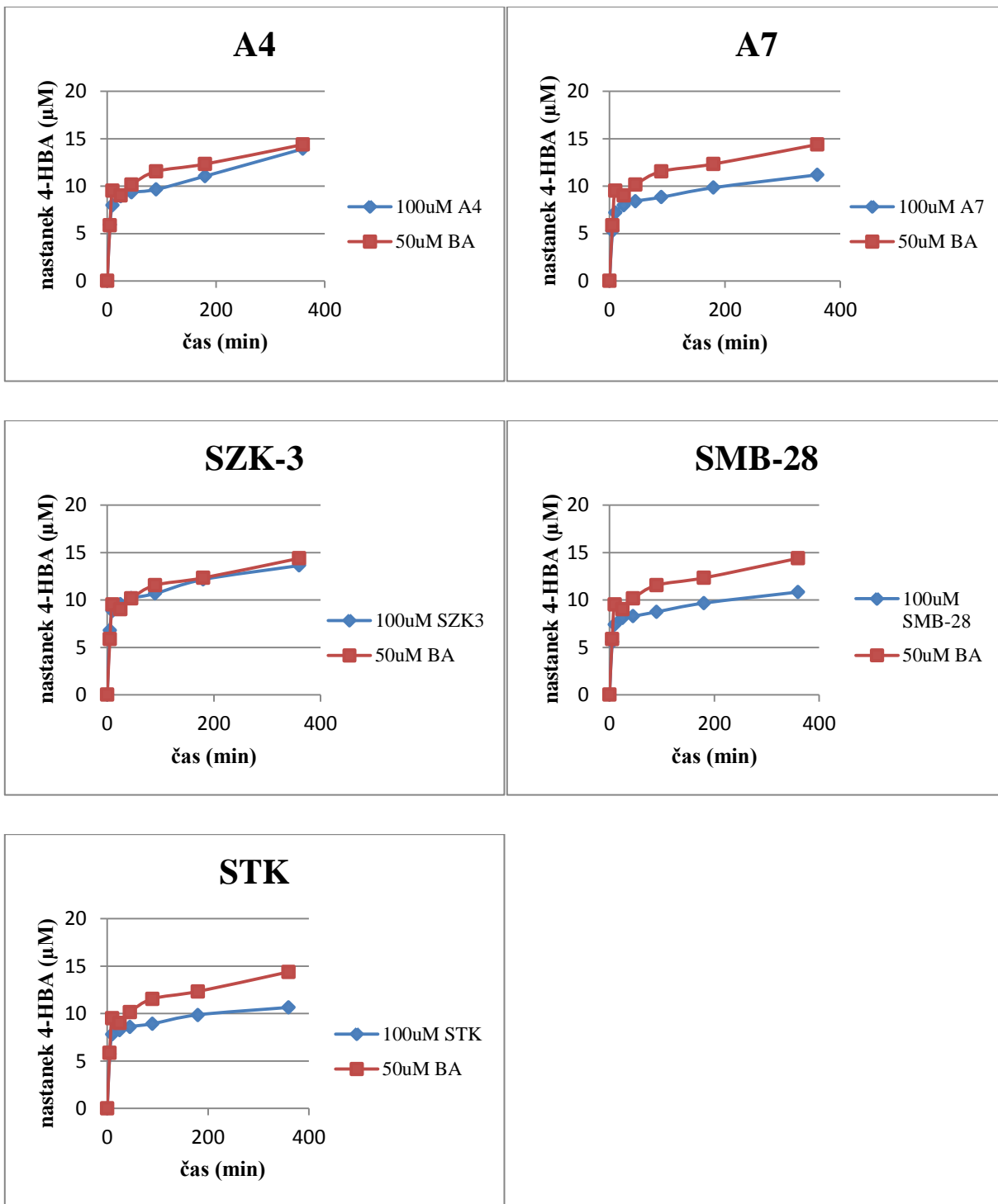
4.3. REKONSTITUCIJSKI SISTEM (RS) IN MERJENJE INHIBITORNEGA DELOVANJA POTENCIALNIH INHIBITORJEV Z RP-HPLC

Encimsko aktivnost proteina CYP53A15 smo preučevali v RS z redoks partnerjem CPR1, v prisotnosti BA kot substrata (preglednica V). Pretvorbo BA v 4-HBA v prisotnosti testiranih spojin smo spremljali z RP-HPLC analizo z merjenjem absorbanc pri 230 nm in 250 nm (slika 17). Koncentracija CYP53A15 v RS je bila 3,52 μM , koncentracija CPR1 pa 35,36 μM . Koncentracija BA v sistemu je bila 50 μM .

Preglednica V: Preverjanje aktivnosti RS s RP-HPLC pri 250 nm. Prikazane so integrirane vrednosti kromatografskih vrhov BA in 4-HBA ter izračun pretvorbe BA v 4-HBA.

Čas reakcije (min)	AUC (50 μ M BA)	Koncentracija 4-HBA (μ M)	AUC (50 μ M 4-HBA)
10	20310	28,6	84124
45	18160	29,1	85622
90	18020	33,5	98588
AUC (100 μ M BA (standard))	77958	79638	Povprečje: 78798
AUC (100 μ M 4-HBA (standard))	720147	750978	Povprečje: 735563
Pretvorba (%)	64,4		

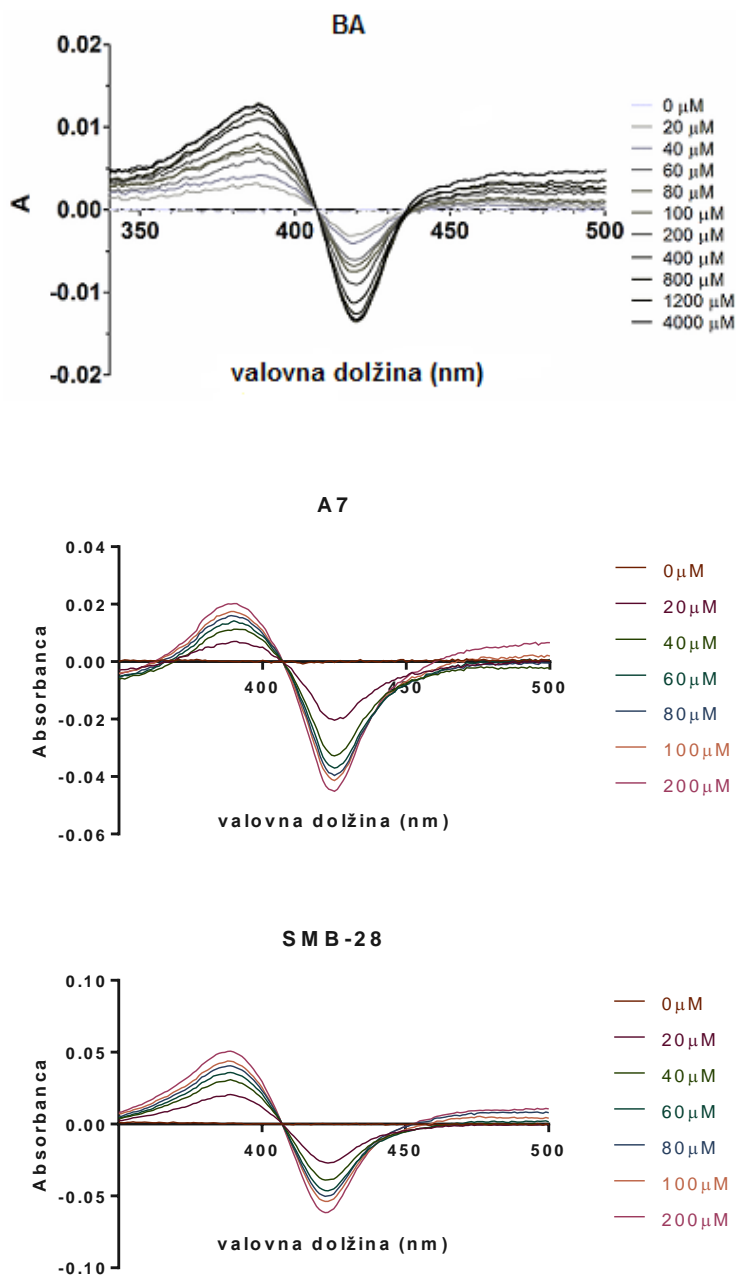




Slika 17: Pretvorba BA v 4-HBA v prisotnosti 100 μ M potencialnih inhibitorjev v odvisnosti od časa. Pretvorbo smo spremljali pri 5., 10., 25., 45., 90., 180. in 360. minuti. Na vsakem grafu je kot kontrola prikazana tudi pretvorba le ob prisotnosti 50 μ M BA.

4.4. VEZAVNI TESTI

Na spektrofotometru z dvožarkovnim sistemom, smo preverjali sposobnost testiranih spojin, da inducirajo vezavno-substratni spekter CYP53A15 (slika 18).



Slika 18: Vezavni spektri CYP53A15 ob dodatku različnih koncentracij BA oziroma testnih spojin (A7 oz. SMB-28). Izobestična točka je pri 407 nm. Minimum je pri 420 nm, maksimum je pri 390 nm, kar pomeni da spojine povzročijo nastanek vezavnih spektrov tipa 1.

Preglednica VI: Vrednosti dAmax za testirane spojine pri določeni koncentraciji dodane testirane spojine oziroma BA in vrednosti spektralne vezavne konstante (Ks) v μM za testirane spojine in BA.

Konc. inhibitorja v μM	0	20	40	60	80	100	200
A7							
Amax (390 nm)	2,00002E-05	0,007038	0,011314	0,01422	0,015846	0,01744	0,020246
Amin (425 nm)	-0,000318	-0,02038	-0,032758	-0,037068	-0,039626	-0,041352	-0,045136
dAmax	0,000338	0,027418	0,044072	0,051288	0,055472	0,058792	0,065382
Ks	42,24						
SMB28							
Amax (389 nm)	0,000634	0,020632	0,030952	0,035878	0,040662	0,043822	0,050756
Amin (423 nm)	0,000138	-0,027098	-0,038814	-0,046454	-0,049948	-0,053784	-0,061336
dAmax	0,000496	0,04773	0,069766	0,082332	0,09061	0,097606	0,112092
Ks	35,04						
STK							
Amax (379 nm)	0,000486	0,003078	0,004088	0,00908	0,009326	0,01149	-0,000942
Amin (418 nm)	0,000374	-0,000888	-0,00145	-0,003138	-0,003056	-0,004064	0,005129999
dAmax	0,000112	0,003966	0,005538	0,012218	0,012382	0,015554	0,004187999
Ks	34,53						
SZK-3							
A max (383 nm)	0,001026	0,00098	0,00233	0,003041999	0,003332	0,004802	0,00601
A min (419 nm)	3,80001E-05	-4,99999E-05	-0,001008	0,001444001	-0,001904	-0,002269998	-0,003562
dAmax	0,000988	0,00103	0,003338	0,004486	0,005236	0,007071998	0,009572
Ks	113,7						
BA							
A max (388 nm)	-1,3E-05	0,003221	0,00422	0,006245	0,007167	0,008008	0,009332
A min (420 nm)	5,5E-05	-0,002925	-0,00391	-0,006039	-0,006694	-0,007482	-0,009035
dAmax	-6,8E-05	0,006146	0,00813	0,012284	0,013861	0,01549	0,018367
Ks	78,72						
Konc. inhibitorja v μM	300	400	800	1200	4000		
STK							
Amax (379 nm)		0,007246003					
Amin (418 nm)		0,003065996					
dAmax		0,010311999					
Ks							
SZK-3							

A max (383 nm)	0,006527998	0,007955998	0,011698		
A min (419 nm)	-0,003896005	0,004682004	0,006976001		
dAmax	0,010424003	0,012638002	0,018674001		
Ks					
BA					
A max (388 nm)		0,011002	0,012159	0,012883	0,012733
A min (420 nm)		-0,011148	-0,012588	-0,013501	-0,013276
dAmax		0,02215	0,024747	0,026384	0,026009
Ks					

Vrednosti dAmax smo izračunali po enačbi 2:

$$dA_{max} = A_{max} - A_{min}$$

Enačba 2

Pri čemer je dAmax razlika med maksimalno vrednostjo spektra pri določeni koncentraciji dodane spojine in minimalno vrednostjo spektra pri isti koncentraciji dodane spojine.

Vrednosti Ks (preglednica VI) smo izračunali s pomočjo programa GraphPad Prism, tako da smo krivuljo dAmax v odvisnosti od koncentracije inhibitorja preoblikovali z metodo nelinearne regresije.

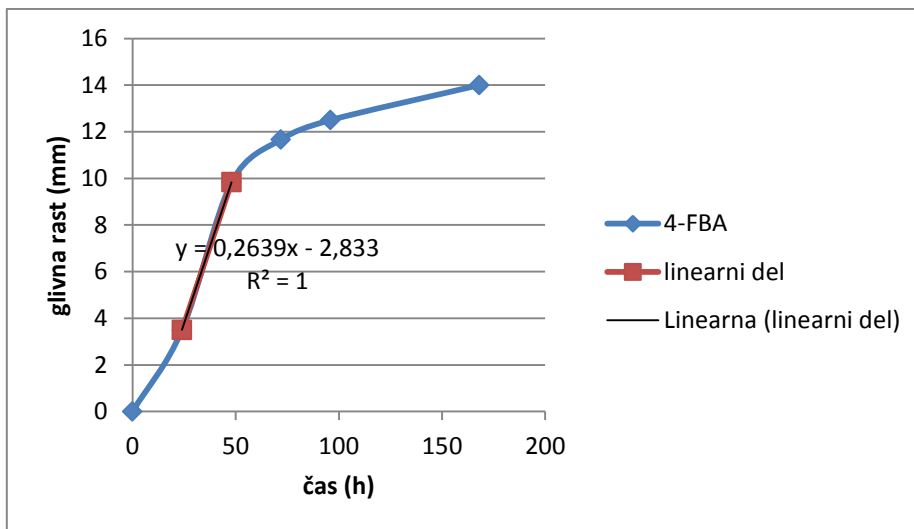
$$Y = B_{max} * X / (K_s + X)$$

Pri čemer je Bmax maksimum specifične vezave (v enakih enotah kot Y) in Ks ravnotežna vezavna konstanta (v enakih enotah kot X).

4.5. BIOLOŠKI TESTI

Biološke teste smo opravljali z namenom, da ugotovimo dejansko zaviralno delovanje testiranih spojin na rast gliv. Pri tem smo uporabili tri glivne vrste: *Cochliobolus lunatus*, *Aspergillus niger* in *Pleurotus ostreatus* (slike 21-24). Meritve glivne rasti smo opravljali vsakih 24 ur. Po tem smo za vsak inhibitor in za kontrolne raztopine izračunali RGR v mm/h in IGI v urah (slika 19, preglednica VII). Teste na glivi *Cochliobolus lunatus* smo izvajali v

dveh paralelkah, v prisotnosti potencialnega inhibitorja in v prisotnosti potencialnega inhibitorja in BA, da bi ugotovili sinergistično delovanje inhibitorja z BA, v kolikor bi sinergizem obstajal. Poleg običajnega seva *Cochliobolus lunatus*, smo uporabili še sev *Cochliobolusa*, ki je imel izbito gensko zaporedje *bph*, da bi v primeru inhibicije rasti z inhibitorjem ugotavljali ali le ta deluje inhibitorno samo na CYP53A15 ali na kakšen drug encim, oziroma po drugačnem mehanizmu.



Slika 19: Grafični prikaz primera izračuna RGR in IGI za glivo *A. niger* z dodano testirano spojino 4-fluorobenzojsko kislino (4-FBA). Na modro označeni rastni krivulji smo izbrali linearni del (rdeče obarvan) in naredili linearno regresijo tega dela (črna črta), iz katere smo izračunali RGR in IGI.

RGR je predstavljal naklon regresijske premice, ki je v tem primeru znašal 0,20 mm/h. IGI pa smo določili z ekstrapolacijo te iste premice na abscisno os, pri čemer je IGI predstavljal vrednost na presečišču osi z regresijsko premico (pri vrednosti $Y=0$) in je bil v tem primeru 2,3 h.

Izračun: $Y = 0,2049X - 0,4722$; $k = RGR = 0,20$ mm/h

IGI: $Y=0$; $0 = 0,2049X - 0,4722$; $X = IGI = 2,3$ h

Preglednica VII: Vrednosti RGR in IGI za vse testirane spojine za vse vrste gliv, ki smo jih uporabili pri bioloških testih. Glivne teste smo izvajali dvakrat in preverjali vpliv različnih spojin na rast. V obeh krogih smo preverjali tudi rast gliv v odsotnosti spojin ter vpliv topil (DMSO, EtOH in njuna kombinacija), v katerih so bile raztopljene spojine na rast gliv. Končna koncentracija spojin v gojišču je bila v vseh primerih 0,1 mM.

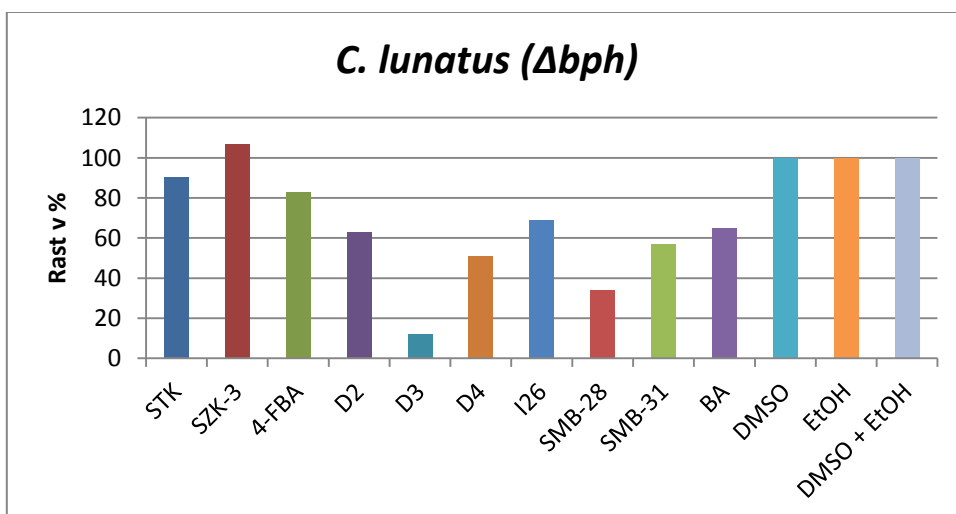
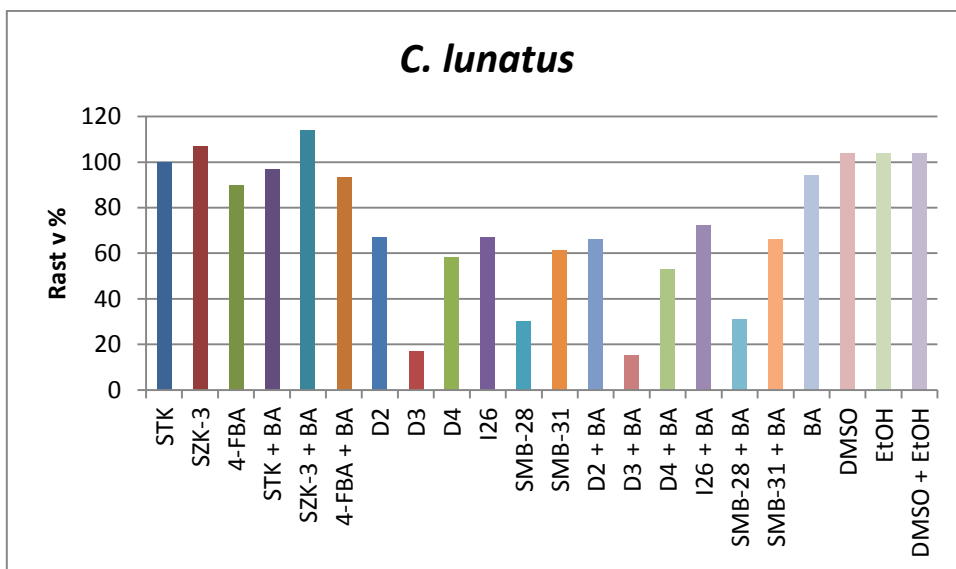
	<i>C. lunatus</i>		<i>C. lunatus</i> (Δbph)		<i>A. niger</i>		<i>P. ostreatus</i>	
Dodana spojina	RGR (mm/h)	IGI (h)	RGR (mm/h)	IGI (h)	RGR (mm/h)	IGI (h)	RGR (mm/h)	IGI (h)
1. KROG TESTIRANJ								
kontrola (brez)	0,28	/	0,29	/	0,21	/	0,13	23,22
STK	0,29	/	0,26	/	0,17	0,98	0,1	28,96
SZK-3	0,31	2,18	0,31	3,27	0,16	0,69	0,1	24,03
4-FBA	0,26	0	0,24	5,48	0,26	10,74	0,1	30,8
STK + BA	0,28	0,59						
SZK-3 + BA	0,33	6,64						
4-FBA + BA	0,27	6,15						
DMSO	0,29	/	0,29	0,38	0,22	2,97	0,10	25,62
DMSO+EtOH	0,29	/	0,29	0,38	0,20	4,98	0,10	27,72
EtOH	0,29	/	0,29	/	0,20	0	0,10	23,15
2. KROG TESTIRANJ								
kontrola (brez)	0,33	5,11	0,27	3,34	0,3	10,05	0,16	31,31
D2	0,22	15,22	0,22	14,45	0,19	10	0,11	29,39
D3	0,056	35,82	0,043	27,07	0,17	7,84	0	/
D4	0,19	19,72	0,18	14,43	0,13	1,68	0,11	47
I26	0,22	8,75	0,24	10,97	0,17	/	0,1	28,79
SMB-28	0,1	11,67	0,12	15,52	0,14	11,2	0,041	22,62
SMB-31	0,2	11,86	0,2	11,31	0,23	6,54	0,12	29,72
D2 + BA	0,21	14,95						
D3 + BA	0,049	44,29						
D4 + BA	0,17	15,37						
I26 + BA	0,23	11,23						
SMB-28 + BA	0,1	10,61						
SMB-31 + BA	0,21	14,67						
BA	0,31	6,54	0,22	0,75	0,22	5,25	0,12	11,43
DMSO	0,33	6	0,35	8,47	0,23	6,54	0,16	36,25
EtOH	0,33	5,11	0,34	6,86	0,24	6,35	0,12	15,78
DMSO+EtOH	0,32	4,17	0,28	3	0,22	6,75	0,15	19,63

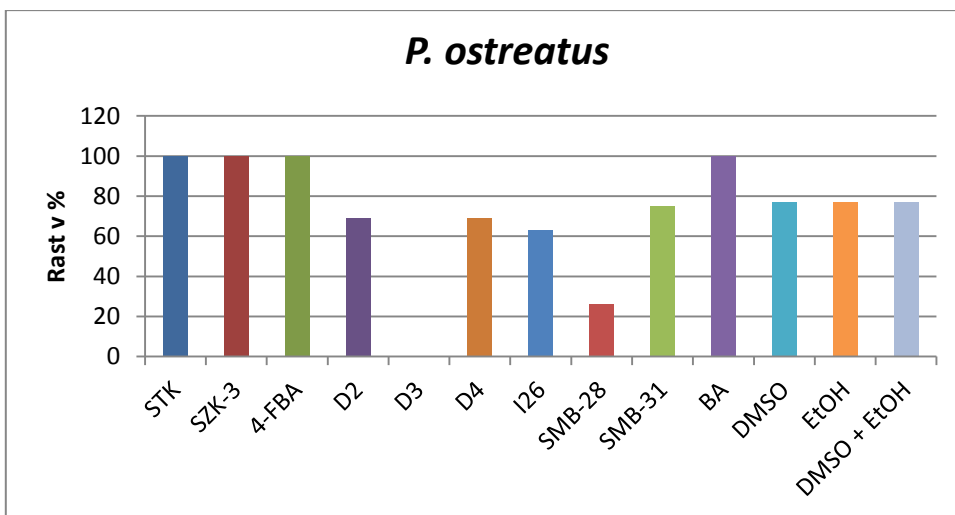
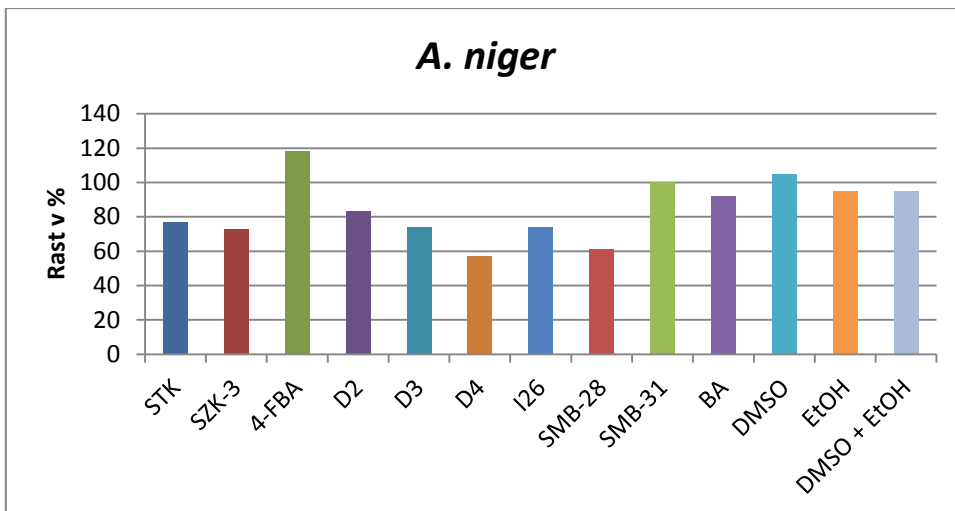
Rast gliv smo izrazili kot relativno rast glede na kontrolo (slika 20). Pri tem smo rast glive pri kontroli opredelili kot 100 % in rast ob dodatku posameznih spojin izračunali po enačbi 3:

$$\text{rast (\%)} = (\text{RGR (spojina)} / \text{RGR (kontrola)}) \times 100 \%$$

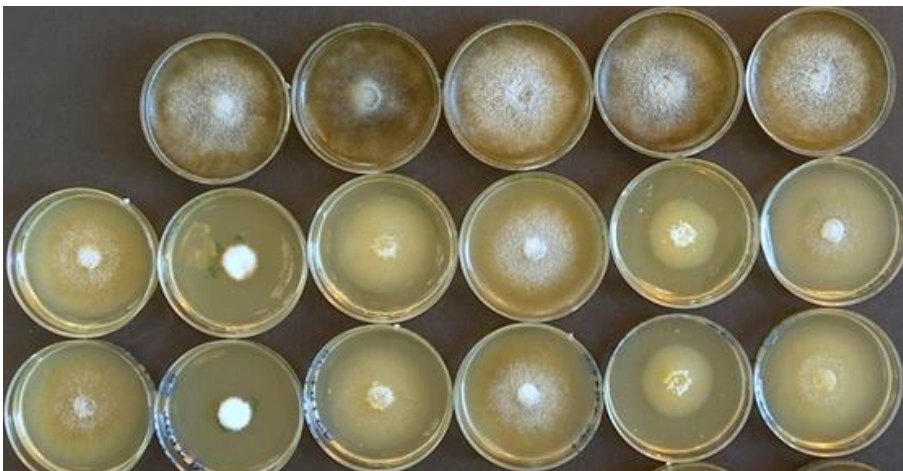
Enačba 3

Kontrolo za gojišča z dodanimi inhibitorji je predstavljalo gojišče z dodanim topilom, v katerem je bil raztopljen inhibitor.





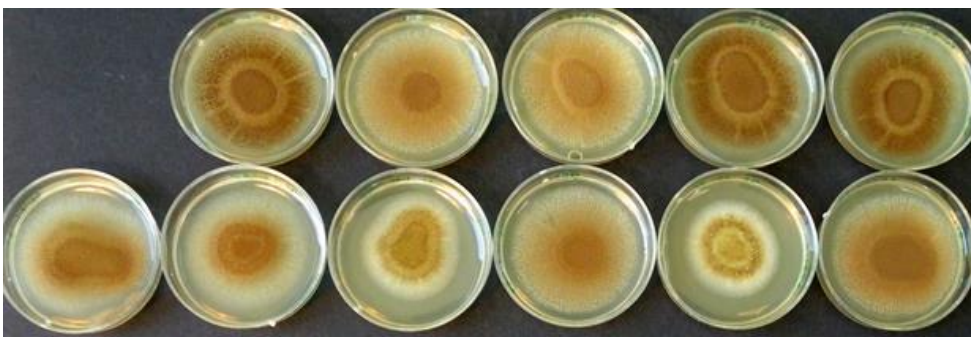
Slika 20: Relativna rast posamezne glive (v %) glede na kontrolo.



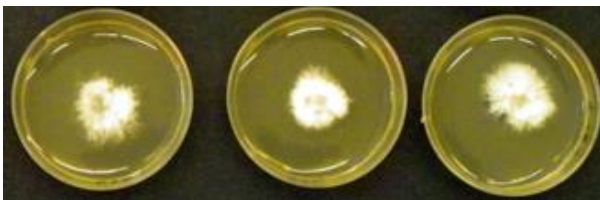
Slika 21: Rast kulture *C. lunatus* 72 ur po nacepiti na gojišče. Biološke teste smo izvajali v petrijevkah s premerom 35 mm. Spojine dodane v gojišče od zgoraj navzdol in od leve proti desni so: 1. vrsta: 4-FBA, STK, SZK-3; 2. vrsta: 4-FBA+BA, STK+BA, SZK-3+BA; 3. vrsta: \emptyset (brez dodatka), DMSO, DMSO+EtOH, EtOH, BA; 4. vrsta: D2, D3, D4, I26, SMB-28, SMB-31; 5. vrsta: D2+BA, D3+BA, D4+BA, I26+BA, SMB-28+BA, SMB-31+BA. Koncentracija dodanih spojin v gojišču je bila 0,1 mM. Na sliki je dobro vidna manjša rast gliv ob dodatku spojin D3 (druga od leve proti desni v 4. vrsti) in SMB-28 (5 od leve proti desni v 4. vrsti), ki je bilo podobno intenzivno ob dodatku spojine in BA (druga in peta petrijevka v spodnji vrsti). Vcepek 5 mm.



Slika 22: Rast kulture *C. lunatus*(*Abph*) 72 ur po nacepiti na gojišče. Biološke teste smo izvajali v petrijevkah s premerom 35 mm. Spojine dodane v gojišče od zgoraj navzdol in od leve proti desni so: 1. vrsta: 4-FBA, STK, SZK-3; 2. vrsta: \emptyset (brez dodatka), DMSO, DMSO+EtOH, EtOH, BA; 3. vrsta: D2, D3, D4, I26, SMB-28, SMB-31. Koncentracija dodanih spojin v gojišču je bila 0,1 mM. Na sliki je dobro vidna manjša rast gliv ob dodatku spojin D3 (druga od leve proti desni v spodnji vrsti) in SMB-28 (5 od leve proti desni v spodnji vrsti). Vcepek 5 mm.



Slika 23: Rast kulture *A. niger* 72 ur po nacepiti na gojišče. Biološke teste smo izvajali v petrijevkah s premerom 35 mm. Spojine dodane v gojišče od zgoraj navzdol in od leve proti desni so: 1. vrsta: 4-FBA, STK, SZK-3; 2. vrsta: \emptyset (brez dodatka), DMSO, DMSO+EtOH, EtOH, BA; 3. vrsta: D2, D3, D4, I26, SMB-28, SMB-31. Koncentracija dodanih spojin v gojišču je bila 0,1 mM. 10 μ l suspenzije spor v fiziološki raztopini ($\sim 10^7$ spor).



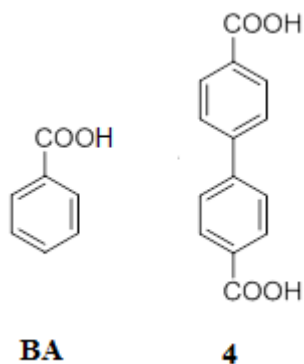
Slika 24: Rast kulture *P. ostreatus* 72 ur po nacepiti na gojišče. Biološke teste smo izvajali v petrijevkah s premerom 35 mm. Spojine dodane v gojišče od zgoraj navzdol in od leve proti desni so: 1. vrsta: 4-FBA, STK, SZK-3; 2. vrsta: \emptyset (brez dodatka), DMSO, DMSO+EtOH, EtOH, BA; 3. vrsta: D2, D3, D4, I26, SMB-28, SMB-31. Koncentracija dodanih spojin v gojišču je bila 0,1 mM. Na sliki je dobro vidna manjša rast gliv ob dodatku spojin D3 (druga od leve proti desni v spodnji vrsti) in SMB-28 (5 od leve proti desni v spodnji vrsti), ki sta se tudi na koncu izkazale z najboljšim zaviralnim delovanjem na *P. ostreatus*. Vcepek 5 mm.

5. RAZPRAVA

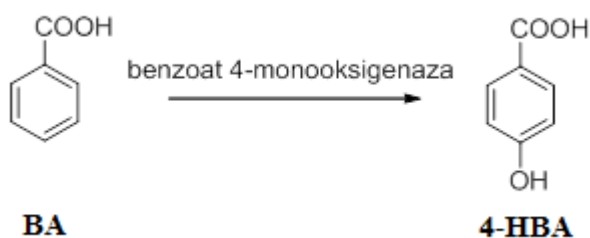
V diplomski nalogi smo nadaljevali že začeto pot pri odkrivanju novih protiglivičnih spojin, ki bi delovale na nov tarčni encim CYP53A15. Na podlagi zbranih rezultatov predhodnih *in vitro* in bioloških študij, je bil naš cilj ovrednotiti nove spojine, ki bi boljše zavirale glivno rast preko inhibicije CYP53A15. Večina testiranih spojin je bila kupljenih, spojino **4** pa smo sintetizirali v okviru magistrske naloge. Izbor spojin je temeljil na encimskem modelu CYP53A15 in na lastnostih, ki jih spojine potrebujejo za inhibicijo encima ter so bile predhodno dokazane. Pri našem delu smo testirali 11 spojin, pri čemer vse spojine nismo vključili v celoten nabor testov, ampak smo se za posamezno testiranje spojine odločali na podlagi pridobljenih rezultatov. V okviru našega dela smo tako preverili določeno skupino kemijskih spojin in pripomogli k nadaljnjemu razvoju protiglivičnih spojin, ki ciljajo CYP53A15 kot tarčno molekulo.

5.1. SINTEZA SPOJINE 4

Spojina SZK-3 (spojina **4**), ki smo jo sintetizirali kot potencialni inhibitor encima CYP53A15, je substituiran derivat bifenila oziroma derivat 4-fenilbenzojske kisline (slika 25). Za sintezo te spojine smo se odločili, ker v svoji strukturi vsebuje BA, ki je naravni substrat encima CYP53A15. Karboksilna skupina BA je namreč potrebna za interakcijo z vezavnim mestom encima CYP53A15. S *para* substitucijo fenilnega obroča smo želeli inhibirati delovanje CYP53A15, ki katalizira reakcijo hidrosilacije BA in ostalih aromatskih substratov na mestu 4 (slika 26).

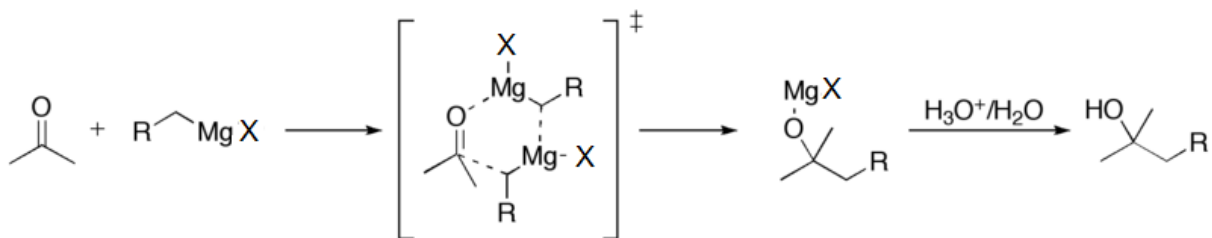


Slika 25: Struktura BA in sinteznega produkta SZK-3 (spojina 4), potencialnega inhibitorja encima CYP53A15.



Slika 26: Reakcija hidroksilacije BA do 4-HBA z encimom CYP53A15.

Z reakcijo direktnega tvorjenja ogljik-ogljik vezi med dvema aromatskima obročema smo sintetizirali 4-substituiran derivat BA, ki smo ga s pomočjo molekulskega modeliranja prepoznali kot potencialni inhibitor encima CYP53A15. Sintezo smo izvajali z uporabo Grignardovih reagentov, ki smo jih predhodno pripravili iz ustreznih aril halidov. Grignardovi reagenti so najbolj znane organo-kovinske spojine, ki se množično uporabljajo pri tvorbi vezi ogljik-ogljik (slika 27). V organskih reakcijah nastopajo kot nukleofili, ki napadejo elektrofilen ogljikov atom v polarnih organskih skupinah. Reakcije z Grignardovimi reagenti so zelo občutljive na prisotnost protičnih topil, kot so voda, alkoholi in amini [35].



Slika 27: Splošna shema kemijske reakcije z Grignardovimi reagenti. R-Mg-X; v kemijski formuli Grignardovega reagenta »X« predstavlja atom halogena. Grignardovi reagenti kot nukleofili reagirajo z elektrofilnim ogljikovim atomom, pri čemer se tvori nova vez ogljik-ogljik [35].

Reakcijo lahko moti že prisotnost vlage iz zraka, zato se morajo zagotoviti brezvodni pogoji, reakcije pa se navadno izvajajo v brezvodnih, sveže predistiliranih topilih, kot sta THF ali dietileter, saj kisik v njuni strukturi stabilizira Grignardove reagente. Reakcijo lahko moti tudi kisik iz zraka, saj z Grignardovimi reagenti reagira tako, da se vrine med ogljik in magnezij-halogenidno skupino. Zaradi tega se reakcije izvajajo v inertni dušikovi ali argonovi atmosferi [35]. V našem primeru smo uporabili sveže predestiliran THF in prežarjene bučke ter reakcijo izvajali v argonovi atmosferi. Pri reakcijah se kot katalizatorji uporabljajo nekatere kovinske spojine (Pd-, Ni-, Fe- in Co-soli), ki katalizirajo reakcije pripajanja reagentov [36]. Pri našem delu smo uporabili katalizatorja $\text{Fe}(\text{acac})_2$ in CoBr_2 . Reakcija je potekla le z $\text{Fe}(\text{acac})_2$, kljub temu da literatura opisuje dober potek reakcij in visoke izkoristke tako z kobaltovimi kot tudi železovimi katalizatorji [37]. Glede na dejstvo, da smo reakcije z obema katalizatorjema izvajali pod istimi pogoji, je najverjetnejši razlog za slab potek reakcije v kobaltovem katalizatorju za katerega je znano, da je higroskopen, prisotnost sledov vode pa vodi v slabše izkoristke reakcij. Zaradi tega smo v nadaljevanju čiščenje in izolacijo s kolonsko kromatografijo izvajali le pri reakcijski zmesi, ki je vsebovala $\text{Fe}(\text{acac})_2$.

Narava aril halogenida za reakcijo tvorjenja vezi med dvema ogljikoma ni tako bistvena, saj poteče tako s klorovimi, jodovimi, kot bromovimi arili. V našem primeru smo izbrali aril jodid. Grignardov reagent smo tako v prvi kot tudi v drugi stopnji sinteze dodajali postopoma, reakcijo pa izvajali pri nižani temperaturi, saj je reakcija zelo eksotermna. V primeru, da bi prišlo do prevelikega segrevanja reakcijske zmesi, bi lahko odneslo septum, ki je zapiral

bučko in bi vanjo vdrl zrak, s tem pa tudi vlaga. Na koncu smo po reakciji in čiščenju izolirali čist produkt (spojina **4**) s 70 % izkoristkom, vendar pa bi se dalo postopek še dodatno optimizirati, da bi dobili večji izkoristek.

5.2. EKSPRESIJA, ČIŠČENJE IN MERJENJE AKTIVNOSTI ENCIMOV CYP53A15 IN CPR1

Prvi korak pri biološkem delu magistrske naloge je bila ekspresija tarčnega encima CYP53A15 in njegovega redoks partnerja CPR1. Ekspresijo obeh proteinov smo izvedli v kompetentnih celicah bakterije *E. coli* C43 po postopku, ki je bil že optimiziran [38] in je predvideval 48 urno gojenje pri 30 °C (CYP53A15) oz. 25 °C (CPR1). Oba proteina se nahajata v membranski frakciji, zato je po ekspresiji sledila izolacija in čiščenje proteinov. Protein CYP53A15 je imel v svojo strukturo vključen histidinski rep, ki je bil ključen za čiščenje proteina z Ni-NTA afinitetno kromatografijo po raztapljanju membran. Histidinski rep je bil po izolaciji proteina iz membran odstranjen. Za razliko od CYP53A15 so kolegi pred nami dokazali, da je protein CPR1 bolj aktiven v membranski frakciji, zaradi česar pri njem nismo opravljali Ni-NTA kromatografije. Ker je zlasti protein CYP53A15 zelo občutljiv na temperaturne spremembe in nizke temperature pri katerih se proteini navadno shranjujejo, smo celoten postopek čiščenja in izolacije proteina opravili v enem koraku, brez vmesnega zamrzovanja in odmrzovanja, ki bi lahko zmanjšala encimsko aktivnost proteina.

Aktivnost CYP53A15 smo merili s CO diferenčnim spektrom encima, ki se uporablja za merjenje aktivnosti vseh CYP, kamor spada tudi CYP53A15 [4]. Pri testu z ogljikovim monoksidom se le-ta veže v kisik vezavno mesto encima, od koder izpodrine kisik, saj ima ogljikov monoksid do encima večjo afiniteto kot kisik. Po vezavi ogljikovega monoksida na hem encima smo posneli spekter, pri katerem se je pojavil Soretov absorpcijski maksimum pri 417 nm, ki je značilen za Fe³⁺ v nizkem spinskem stanju in iz katerega smo pridobili informacijo, kolikšna je celokupna koncentracija citokroma, v našem primeru CYP53A15, v vzorcu. Nadaljnja redukcija Fe³⁺ v encimu, z dodatkom Na-ditionita (Na₂S₂O₄), v Fe²⁺ pa povzroči premik absorpcijskega maksimuma k 450 nm. Absorbanco pri 450 nm smo merili nekaj minut, dokler je maksimum naraščal. Ko je absorbanca pri 450 nm dosegla najvišjo

vrednost, smo izračunali delež aktivnega CYP53A15, ki absorbira pri 450 nm. V našem primeru je bila aktivnost 97 %. V primeru, da bi prišlo med postopkom do denaturacije proteina, bi se pojavil maksimum absorpcije pri 420 nm.

Aktivnost CPR1, ki je bila prisotna v membranski frakciji, smo merili s testom s citokromom c. Citokrom c ima pri testu vlogo prejemnika elektronov, ki mu jih posreduje CPR1 kot redoks partner. Iz naklona krivulje pred dodatkom NADPH, ki je donor elektronov, in naklona krivulje po dodatku NADPH, smo izračunali aktivnost CPR1, ki je v našem primeru znašala 13,8 EU/ml.

5.3. UGOTAVLJANJE INHIBITORNEGA DELOVANJA SPOJIN NA REKONSTITUCIJSKI SISTEM Z RP-HPLC ANALIZO

Delovanje spojin smo preverjali preko njihove inhibicije RS. Pri rekonstituciji sistema CYP smo uporabili izolirana encima CYP53A15 in CPR1 ter lipidne vezikle in HGE pufer. Lipidni vezikli so ključna komponenta, v kateri pride do stika med encimoma, s čimer je zagotovljeno delovanje sistema CYP53A15-CPR1.

Inhibitorno delovanje spojin smo preverjali z RP-HPLC analizo, pri kateri smo spremljali porabo substrata oziroma nastanek produkta encimske reakcije ob prisotnosti spojin. CYP53A15 katalizira reakcijo *para* hidroksilacije BA v 4-HBA [1]. Kot je razvidno iz slike 17, smo spremljali, ali se ob dodatku spojine zmanjša količina pretvorjene BA. Meritve smo izvajali pri 230 nm in 250 nm, a smo zaradi lepše ločbe kromatografskih vrhov uporabili rezultate, dobljene pri 250 nm. Vsakemu sistemu smo dodali 50 μ M BA. Spojine smo sistemu dodali v koncentraciji 100 μ M in merili nastanek 4-HBA v odvisnosti od časa. Za pozitivno kontrolo smo sistemu dodali le 50 μ M BA, s čemer smo preverjali aktivnost našega RS. Le-ta je znašala 64 % (preglednica V). Dodatek spojin k RS je v zelo majhni meri oziroma ni imel vpliva na količino nastale 4-HBA. Iz tega lahko sklepamo, da so testirane spojine ali substrat za encim CYP53A15 ali pa ne dostopajo do aktivnega mesta encima in zato ne povzročijo njegove inhibicije. Še najboljše rezultate smo dobili pri spojini **13** (STK). Ob tem je potrebno upoštevati še dejstvo, da na rezultat vpliva dejanski volumen raztopine BA, ki ga s pipeto

dodamo v sistem in je med vzorci dokaj močno variiral in slabša topnost BA v hladni vodni raztopini, saj bi se del raztopljene BA lahko oboril in bi kljub pravilno pipetiranemu volumnu v sistem dodali manjšo množino BA.

5.4. VEZAVNI TESTI

Metodo substrat vezavnih spektrov smo uporabili za *in vitro* določanje vezave testnih spojin na protein CYP53A15. Vezavne spektre smo izvedli s spektrofotometrom z dvožarkovnim sistemom. Vezavne spektre smo izvedli s 5 testnimi spojinami in BA, ki smo jo uporabili kot kontrolo. Spojina **10** (I26), ki smo ji tudi posneli vezavni spekter, je predhodno že imela določen vezavni spekter. Zaradi njenega posebnega vezavnega spektra reverznega tipa 1 z maksimumom pri 420 nm in minimumom pri 390 nm, smo jo ponovno testirali, da bi ugotovili, ali ima katera izmed na novo preizkušenih spojin enak tip spektra. Vendar nobena izmed ostalih spojin ni kazala tega tipa spektra. Spojini **6** (A7) in **11** (SMB-28) sta tvorili spekter tipa 1 (slika 18). Za ta spekter je značilen maksimum pri 390 nm, minimum pri 420 nm in izobestična točka pri 407 nm [19]. Spojini **4** in **13** bi verjetno prav tako izkazovali spekter tipa 1, vendar je bila zlasti pri spojnini **4**, kljub višji dodani koncentraciji spojine, vezava na encim CYP53A15 zelo slaba, spekter pa posledično slabo razločen. Vzrok za slabšo vezavo bi lahko bila pretvorba spojine **4** pod vplivom encima; pri spojnini **13** pa bi vzrok lahko našli v njeni strukturi, ki očitno ne omogoča dostopa spojine do vezavnega mesta encima.

5.5. BIOLOŠKI TESTI

Biološko testiranje spojin smo opravili na treh vrstah gliv, bazidiomiceti *Pleurotus ostreatus* ter askomicetah *Aspergillus niger* in *Cochliobolus lunatus*. Za vsako spojino smo opravili meritve hitrosti rasti posamezne glive ob njeni prisotnosti. Meritve smo opravljali vsakih 24 ur in v treh paralelkah, pri čemer smo merili premer glivnega micelija.

Iz zbranih podatkov meritev smo določili RGR v mm/h in IGI v urah (preglednica VII). Prav tako smo izvedli glivne teste z topili: DMSO, etanolom in njuno kombinacijo. S tem ko smo rast gliv ob dodatku inhibitorjev primerjali z rastjo gliv ob dodatku topila, v katerem je bil

raztopljen inhibitor, smo izničili vpliv topil in ugotavljali le vpliv spojin samih na glivno rast. Iz rezultatov je viden nezanemarljiv vpliv topil DMSO, etanola oziroma njune kombinacije na rast gliv, saj so glive ob dodatku topil v gojišče rastle počasneje kot glive, katerim nismo v gojišče dodali ničesar. Zlasti sta ti dve topili vplivali na rast glive *P. ostreatus*. Omeniti velja tudi dejstvo, da je bilo tudi gojišče najmanj primerno za izvajanje testov z glivo *P. ostreatus*, kar je vplivalo na dobljene rezultate.

Na slikah 21 - 24 so prikazane plošče z glivami po 48 urnem gojenju. Na slikah je lepo vidna različna hitrost rasti posameznih glivnih vrst, kot tudi različne hitrosti rasti ob dodatku različnih spojin. Najbolje sta glivno rast inhibirali spojini **8** (D3) in **11**. Njuna inhibicija, razen pri glivi *A. niger*, namreč močno odstopa od inhibicije ostalih spojin, pri čemer je spojina **8** dosegla še nekoliko boljše rezultate kot spojina **11**. Hkraten dodatek BA in testne spojine h gojišču, ni imel bistvenega vpliva na glivno rast *C. lunatus*. Tudi rast *C. lunatus* (Δbph) in *C. lunatus* se pri nobeni testni spojini ne razlikuje bistveno, kar da slutiti, da CYP53A15 ni glavna tarča, preko katere testne spojine inhibirajo glivno rast. V nadaljevanju bi bilo zato potrebno identificirati spojine, ki inhibirajo CYP53A15 in hkrati povzročajo dobro inhibicijo glivne rasti. Po drugi strani pa identificirati tarčne encime, preko katerih testirane spojine, zlasti spojini **8** in **11**, inhibirajo glivno rast.

6. SKLEPI

V okviru magistrske naloge smo:

- 1) z reakcijo tvorbe vezi ogljik-ogljik med Grignardovim reagentom in aril jodidom sintetizirali [1,1'-bifenil]-4,4'-dikarboksilno kislino (spojina **4**), ki je bila izbrana na podlagi encimskega modela in molekulskega sidranja;
- 2) izvedli ekspresijo encimov CYP53A15 in CPR1 v kompetentnih celicah *E. coli* C43, ju očistili in izolirali ter uspešnost korakov sproti preverjali z NaDS-PAGE;
- 3) s CO diferenčnim spektrom izmerili aktivnost izoliranega encima CYP53A15, ki je bila 97 %, in z metodo s citokromom c izmerili aktivnost CPR1, ki je znašala 13,8 EU/ml;
- 4) pripravili RS iz izoliranega encima CYP53A15, membranske frakcije CPR1, lipidnih veziklov in HGE pufru ter preverili njegovo sposobnost pretvorbe BA v 4-HBA. Aktivnost RS je znašala 64 %;
- 5) z metodo RP-HPLC preverili *in vitro* delovanje sedmih spojin na RS; pri čemer smo ugotovili, da spojine, ki smo jih testirali, v zelo majhni meri vplivajo na pretvorbo BA v 4-HBA s CYP53A15;
- 6) opravili teste vezave petih spojin in BA na encimu CYP53A15 s spektrofotometrično metodo vezavnih spektrov. Štiri spojine so izkazovale vezavni spekter tipa I, spojini **10** pa smo potrdili spekter reverznega tipa 1;
- 7) izvedli biološke teste na treh glivnih vrstah *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus niger* in *Cochliobolus lunatus*. Z njimi smo ugotavljali inhibicijo glivne rasti ob dodatku spojin h gojišču, sinergistično delovanje spojin in BA na glivno rast in inhibicijo glivne rasti preko zaviranja delovanja encima CYP53A15. Pri inhibiciji glivne rasti sta se najbolj izkazali spojini **8** in **11**, sinergističnega delovanja med BA in spojinami nismo ugotovili, spojine pa glivne rasti glede na naše rezultate ne inhibirajo preko zaviranja CYP53A15.

LITERATURA

1. Berne S, et al: Virtual screening yields inhibitors of novel antifungal drug target, benzoate 4-monooxygenase. *Journal of chemical information and modeling* 2012; 52(11): 3053-63
2. Srinivas Reddy A, et al: Virtual screening in drug discovery – a computational perspective. *Current protein and peptide science* 2007; 8(4): 329-51
3. Bernhardt R: Cytochrome P450 as versatile biocatalysts. *Journal of biotechnology* 2006; 124(1): 128-45
4. Omura T: Recollection of the early years of the research on cytochrome P450. *Proceedings of the Japan academy - Series B: Physical and biological sciences* 2011; 87(10): 617-40
5. Nelson D R: A world of cytochrome P450s. *Philosophical transactions of the royal society of London - Series B: Biological sciences* 2013; 368(1612): 20120430
6. Lah L, et al: The versatility of the fungal cytochrome P450 monooxygenase system is instrumental in xenobiotic detoxification. *Molecular microbiology* 2011; 81(5): 1374-89
7. http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_10/Page1.htm, html (27.10.2013)
8. Munro A W, et al: Cytochrome P450-redox partner fusion enzymes. *Biochimica et biophysica acta* 2007; 1770(3): 345-59
9. McLean K J, et al: Biodiversity of cytochrome P450 redox systems. *Biochemical society transactions* 2005; 33(Pt 4) 796-801
10. Berg J M, Tymoczko J L, Stryer L: *Biochemistry*, 5th edition, W H Freeman, New York, 2002: 1088-9, 1093
11. McKinnon R A, et al: Cytochrome P450 part 1: Multiplicity and function. *Journal of pharmacy practice and research* 2008; 38: 55-7

12. Moktali V, et al: Systematic and searchable classification of cytochrome P450 proteins encoded by fungal and oomycete genomes. *BMC Genomics* 2012; 13: 525
13. Gotoh O, et al: Structural characteristics of cytochrome P-450. Possible location of the heme-binding cysteine in determined amino-acid sequences. *Journal of biochemistry* 1983; 93(3): 807-17
14. Hasemann C, et al: Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* 1995; 3(1): 41-62
15. Werck-Reichhart D: Cytochromes P450: a success story. *Genome biology* 2000; 1(6): reviews 3003.1-3003.9
16. Poulos T L, et al: The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *Journal of biological chemistry* 1985; 260(30): 16122-30
17. Schenkman J B, et al: Spectral analyses of cytochromes P450. *Methods in molecular biology* 2006; 320: 11-8
18. Hill H A O, et al: The chemical nature and reactivity of cytochrome P-450. *Structure and bonding* 1970; 8: 123-51
19. Locuson C W, et al: Visible spectra of type II cytochrome P450-drug complexes: evidence that »incomplete« heme coordination is common. *Drug metabolism and disposition* 2007; 35(4): 614-22
20. Ost T W, et al: Oxygen activation and electron transfer in flavocytochrome P450 BM3. *Journal of the American chemical society* 2003; 125(49): 15010-20
21. Kumaki K, et al: Correlation of type I, type II and reverse type I difference spectra with absolute changes in spin state of hepatic microsomal cytochrome P-450 iron from five mammalian species. *Journal of biological chemistry* 1978; 253(4): 1048-58
22. Parker J E, et al: Prothioconazole and prothioconazole-desthio activities against *Candida albicans* sterol 14- α -demethylase. *Applied and environmental microbiology* 2013; 79(5): 1639-45

23. Li D, et al: Genome-wide investigation and functional characterization of the β -ketoacid pathway in the nitrogen-fixing and root-associated bacterium *Pseudomonas stutzeri* A1501. *BMC Microbiology* 2010; 10: 36
24. Harwood C S, et al: The β -ketoacid pathway and the biology of self-identity. *Annual review of microbiology* 1996; 50: 553-90
25. Wright J D: Fungal degradation of benzoic-acid and related-compounds. *World journal of microbiology and biotechnology* 1993; 9: 9-16
26. http://bio.ijs.si/~upetrovic/seminarji/Abstract_NKrasevec_May2012.pdf, html (20.12.2013)
27. http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra006.htm, html (16.1.2014)
28. Turgeon B G, et al: Genetic and genomic dissection of the *Cochliobolus heterostrophus* Tox1 locus controlling biosynthesis of the polyketide virulence factor T-toxin. *Advances in genetics* 2007; 57: 219-61
29. da Cunha K C et al: Diversity of *Bipolaris* species in clinical samples in the United states and their antifungal susceptibility profiles. *Journal of clinical microbiology* 2012; 50(12): 4061-6
30. Perrone G, et al: Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in mycology* 2007; 59: 53-66
31. Astoreca A L, et al: Ecophysiology of *Aspergillus* section *Nigri* species potential ochratoxin A producers. *Toxins (Basel)* 2010; 2(11): 2593-605
32. Larraya L M, et al: Molecular karyotype of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and environmental microbiology* 1999; 65(8): 3413-7
33. Nising C F: *Journal of organic chemistry* 2004, 69(20), P6830-3
34. DeVasher R B: *Journal of organic chemistry* 2004, 69(23), P7919-27

35. Carey F A, et al: Advanced organic chemistry, Part A: Structure and mechanisms, 5th edition, Springer US, Virginia, 2007: 609-10
36. Ranjan J, et al: Advances in transition metal (Pd, Ni, Fe)-catalyzed cross-coupling reactions using alkyl-organometallics as reaction partners. Chemical reviews 2011; 111: 1417-92
37. Cahiez G, et al: Cobalt-catalyzed cross-coupling reactions. Chemical reviews 2010; 110: 1435-62
38. Podobnik B, et al: CYP53A15 of *Cochliobolus lunatus*, a target for natural antifungal compounds. Journal of medicinal chemistry 2008; 51(12): 3480-6