

Geny i enzymy uczestniczące w przekształceniach struktury pierścieniowej steroidów

Anna Brzostek¹

Tomasz Poptawski¹

Yoshikatsu Murooka²

Jarostaw Dziadek¹

¹Pracownia Genetyki Drobnoustrojów

Centrum Mikrobiologii i Wirusologii

Polska Akademia Nauk

Łódź

²Department of Biotechnology Faculty of Engineering

Osaka University 2-1 Yamadaoka Suita

Osaka, Japan

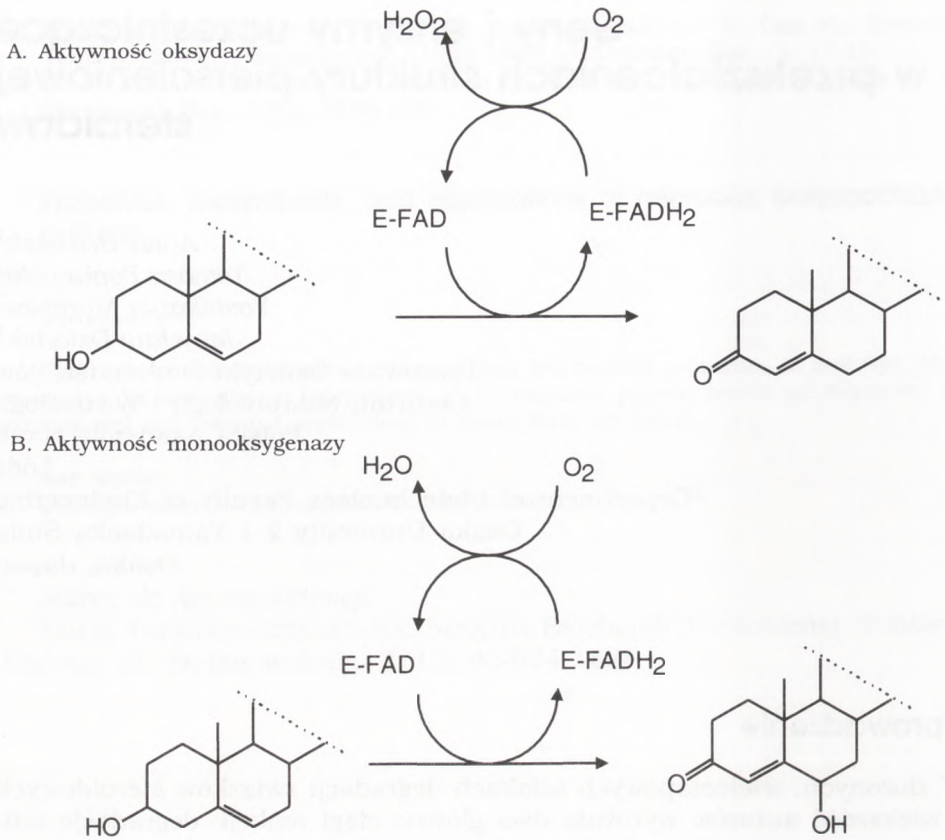
1. Wprowadzenie

W złożonych, wieloetapowych szlakach degradacji związków steroidowych większość autorów wyróżnia dwa główne ciągi reakcji: degradację łańcucha bocznego oraz degradację struktury pierścieniowej cyklopentanoperhydrofenantrenu (57,58,62,74). Pierwszy z nich jest jak dotychczas słabo poznany na poziomie genetycznym ponieważ nie udało się do tej pory zidentyfikować żadnego z genów kodujących enzymy zaangażowane w ten proces. Szansą na przełamanie tej bariery, jak się wydaje, jest ostatnio oczyszczony i scharakteryzowany enzym 21-monooksygenazy steroidowej ze szczepu *Rhodococcus rhodochrous* katalizujący przekształcenia progesteronu do acetylowej pochodnej testosteronu (40). Poznanie N-końcowej sekwencji aminokwasowej białka umożliwiłoby sklonowanie genu kodującego ten enzym.

Wykryto natomiast, oczyszczono i scharakteryzowano dotychczas szereg enzymów uczestniczących w złożonym, wieloetapowym procesie degradacji struktury pierścieniowej steroli. Dla niektórych z nich, poznano także determinanty genetyczne, w tym lokalizację, organizację wewnętrzną i sekwencję nukleotydową genów.

2. Oksydaza cholesterolowa

Najlepiej poznany enzymem uczestniczącym w przekształceniach struktury pierścieniowej steroli jest oksydaza cholesterolowa CHO [EC 1.1.3.6].



Rys. 1. Aktywność katalityczna oksydazy cholesterolowej izolowanej ze szczepu *Streptomyces* sp. SA.-COO.

Katalizuje ona oksydację cholesterolu do cholestenonu połączoną z izomerizacją podwójnego wiązania z pozycji 5,6 do 4,5 pierścienia A cyklopentanoperhydrofenantrenu (rys. 1). Ostatnio wykazano, że oksydaza cholesterolowa posiada ponadto aktywność monoooksygenazy katalizującej reakcję hydroksylacji cholesterolu lub 4-cholesten-3-onu do 4-cholesten-6-ol-3-onu. Stwierdzono także, że aktywność 6-hydroksylazy jest znacznie hamowana w obecności wysokich stężeń substratu (42) (rys. 1). CHO izolowana jest z takich drobnoustrojów jak: *Nocardia*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Schizophyllum*, *Arthrobacter*, *Streptomyces* i *Pseudomonas*. Wykazano także, że zdolnością syntezy oksydazy cholesterolowej odznaczają się różne szybko-rosnące szczepy *Mycobacterium*: *M. fortuitum*, *M. vaccae*, *M. phlei*, *M. smegmatis* oraz szczep *Rhodococcus* sp. IM58 (63,71).

Stwierdzono, że w przeciwieństwie do oksydazy cholesterolowej ze *Streptomyces* sp. czy *Arthrobacter*, która jest enzymem zewnątrzkomórkowym, białko oksydazy cholesterolowej *Mycobacterium* jest enzymem wewnątrz-

komórkowym (70). W przeprowadzonej analizie *Western blot* z użyciem swoistych przeciwciał wykazano wysoki poziom podobieństwa antygenowego oksydazy *Mycobacterium* i oksydazy izolowanej ze *Schizophyllum commune*. Interesujące jest także, że takiego podobieństwa nie wykazało białko oksydazy *Streptomyces* sp. Analizowane białka z badanych drobnoustrojów różnią się nie tylko determinantami antygenowymi, ale także wykazują znaczne różnice na poziomie genetycznym (71). Charakterystyczną cechą oksydazy cholesterolowej izolowanej ze *Streptomyces* sp., *Schizophyllum commune*, *Brevibacterium sterolicum* jest obecność kowalencyjnie związanego składnika flawinowego jako grupy prostetycznej enzymu.

Dzięki zastosowaniu miejscowo-specyficznej mutagenезy udało się określić udział pojedynczych aminokwasów w reakcji oksydacji i/lub izomeryzacji przeprowadzanej przez oksydazę cholesterolową. Wykazano, że mutacja E (kwas glutaminowy) do D (kwas asparaginowy) w pozycji 356 powoduje zniesienie aktywności izomerazy, a mutacja N (asparagina) do A (alanina) lub N do Q (glutamina) w pozycji 480 powoduje zniesienie aktywności oksydazy. Wprowadzenie mutacji polegającej na zamianie H (histydyna) w N lub H w A w pozycji 442 powoduje utratę obu aktywności enzymu. Można zatem przypuszczać, że aminokwasy te biorą udział w katalitycznej aktywności oksydazy cholesterolowej (72).

Oksydaza cholesterolowa jest pierwszym poznany na poziomie genetycznym enzymem uczestniczącym w przekształceniach steroli. Gen oksydazy cholesterolowej (choA) ze *Streptomyces* sp. SA-COO został po raz pierwszy sklonowany w wektorze pIJ702 i wprowadzony do komórek *Streptomyces lividans* (41,44). Transgeniczny szczep *Streptomyces lividans*, zawierający rekombinowany wektor pIJ702, odznaczał się zdolnością kilkakrotnie wydajniejszej syntezy zewnątrzkomórkowej oksydazy w porównaniu do szczepu wyjściowego *Streptomyces* sp. SA-COO. Białko oksydazy cholesterolowej izolowane z różnych szczepów *Streptomyces* okazało się monomerem o masie od 34 kDa do 61 kDa. Ustalono także sekwencję nukleotydową genu (choA) oksydazy cholesterolowej *Streptomyces* sp. SA-COO (26). Pojedyncza otwarta ramka odczytu (ORF) koduje syntezę 504 aminokwasów, a masę białka na tej podstawie oceniono na 54,9 kDa. Określono także sekwencję nukleotydową regionu promotorowego badanego genu choA oraz odkryto nową otwartą ramkę odczytu (choP) zlokalizowaną między sekwencją promotorową a genem strukturalnym choA oksydazy cholesterolowej. Na podstawie analizy delecyjnej dowiedziano, że region promotorowy genu choP pełni istotną rolę w ekspresji strukturalnego genu choA. Okazało się, że gen choP koduje białko zbudowane z 381 aminokwasów o masie 41,7 kDa, a jego produkt zidentyfikowano jako cytochrom P-450 (23).

Sklonowany został gen oksydazy cholesterolowej (choB) z *Brevibacterium sterolicum* (18,50). Poznanie sekwencji nukleotydowej tego genu pozwoliło na wykrycie otwartej ramki odczytu kodującej produkt składający się z 552 aminokwasów. W przeprowadzonej analizie N-terminalnej sekwencji aminokwasowej zewnątrzkomórkowego enzymu *Brevibacterium sterolicum* wykazano, że dojrzały enzym składa się z 507 aminokwasów o masie 54,9 kDa,

a jego sekwencja sygnałna zbudowana jest z 45 reszt aminokwasowych. Porównując sekwencję nukleotydową genów *choA* i *choB* odpowiednio ze *Streptomyces* sp. SA-COO i *B. sterolicum* wykazano homologię na poziomie 64%. Różnice dotyczą szczególnie końców 5' i 3' genów porównywanych enzymów. Ustalono przynajmniej sześć wysoce konserwatywnych regionów w obu enzymach, które mogą być zaangażowane w wiązanie substratu bądź stanowią centrum katalityczne enzymu. Stwierdzono także, iż obecność reszt cysteiny determinuje aktywność enzymu (50).

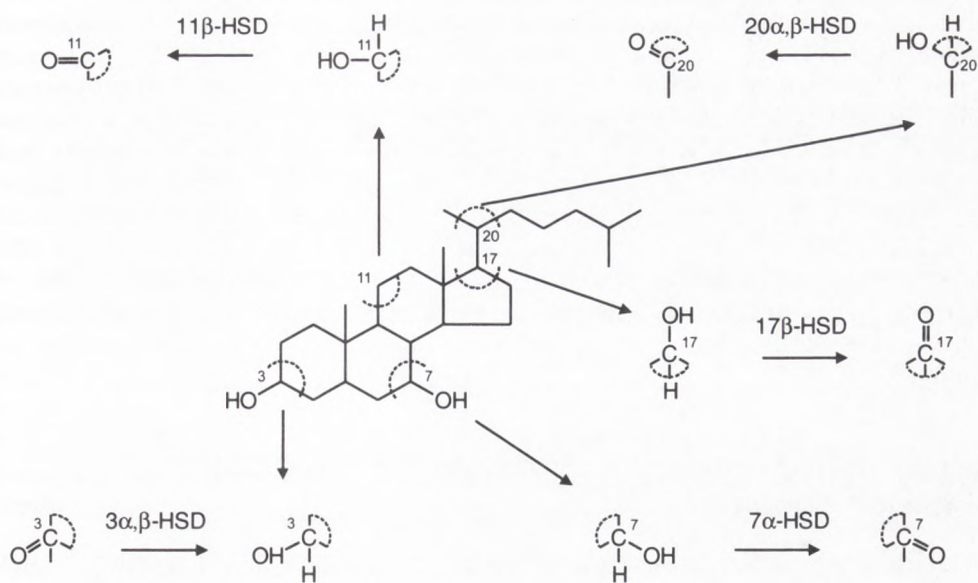
Sklonowany gen oksydazy cholesterolowej ze *Streptomyces* sp. SA-COO z powodzeniem poddano ekspresji w *Streptomyces lividans*, *Lactobacillus casei*, *Escherichia coli* oraz w *Nicotiana tabacum* (7,41,65). Szczególnie dobrym gospodarzem do heterologicznej ekspresji genów, ze względu na brak cech patogenności, jak się wydaje, jest *Lactobacillus casei*. Pewną niedogodnością wykorzystywania komórek *L. casei* jako gospodarza jest to, że białko oksydazy cholesterolowej nie jest wydzielane do podłoża, a w związku z tym musi być izolowane po sonikacji komórek (65). Uzyskanie ekspresji oksydazy cholesterolowej w tytoniu było ważnym krokiem w kierunku wykorzystania tego enzymu jako skutecznego insektycydu w stosunku do owadów opornych na toksyny *Bacillus thuringiensis* (45,54). Początkowo nie udawało się uzyskać ekspresji genu oksydazy cholesterolowej *Streptomyces* sp. w komórkach *E. coli*. Okazało się, że natywny gen oksydazy cholesterolowej *Streptomyces* sp. nie podlegał ekspresji w odległym filogenetycznie gospodarzu. Dopiero lokalizacja i modyfikacja w genie miejsca wiązania rybosomów i modyfikacja N-terminalnych kodonów genu pozwoliły na uzyskanie wydajnej produkcji enzymu. Zmodyfikowany gen poddano ekspresji w komórkach *E. coli* pod kontrolą promotorów *lac* i *tac* z wielokopijnego wektora będącego pochodną plazmidów pIJ702 i pUC19. Tak zrekombinowany system ekspresyjny pozwolił na uzyskanie dwukrotnie wyższej wydajności syntezy oksydazy cholesterolowej w czasie 18-godzinnej hodowli w porównaniu ze szczepem wyjściowym *Streptomyces* sp. SA-COO hodowanym 4 dni (45,48).

Oksydaza cholesterolowa dość powszechnie wykorzystywana jest w medycynie do enzymatycznej transformacji cholesterolu i w połączeniu z peroksydazą stanowi szybki i czuły test enzymatyczny do ilościowego oznaczania zawartości cholesterolu w próbach klinicznych.

Ponadto ekspresja oksydazy cholesterolowej w bakteriiach mlekowych mogłaby ułatwić degradację cholesterolu w przetworach mlecznych. Szczególnie interesującą ideą jest sklonowanie i ekspresja genów oksydazy cholesterolowej w różnych roślinach wykorzystywanych do produkcji żywności z obniżoną zawartością cholesterolu.

3. Dehydrogenaza cholesterolowa zależna od NAD(P) — 3 β -HSD

Ważną grupę enzymów stanowią dehydrogenazy 3 β -hydroksysteroidowe (3 β -HSD), które biorą udział w biosyntezie wszystkich grup hormonów steroidowych. Wśród tej grupy enzymów scharakteryzowano 5 typów, z których



Rys. 2. Uproszczony schemat aktywności enzymatycznej różnych dehydrogenaz hydroksysteroidowych.

I i III funkcjonują jako dehydrogenaza/izomeraza, zaś IV i V działają jako reduktazy 3-ketosteroidowe (51,55).

Reakcja enzymatyczna prowadzona przez 3β-HSD polega na przekształcaniu 5-en-3-hydroksysteroidów do odpowiednich 4-en-3-ketosteroidów, a kofaktorem reakcji jest zwykle $\text{NADH} + \text{H}^+$. Wyjątek stanowi 3β-HSD typ II wątroby szczura i 3β-HSD typ IV izolowana z nerek myszy, które w reakcji tej wykorzystują $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (60). Dobrze poznanym i scharakteryzowanym białkiem enzymatycznym tej grupy enzymów jest dehydrogenaza cholesterolowa zależna od NAD(P) , prowadząca taką samą reakcję enzymatyczną jak oksydaza cholesterolowa (rys. 2). Po raz pierwszy enzym ten oczyszczono i sklonowano kodujący go gen ze szczepu *Pseudomonas testosteroni*. Dehydrogenaza cholesterolowa zależna od NAD(P) jest enzymem indukcyjnym. Może występować w formie monomeru lub dimeru, a przyjęcie jednej bądź drugiej formy jest uzależnione od stężenia substratu steroidowego. Obie formy enzymu wykazują różną aktywność katalityczną w zależności od rodzaju substratu steroidowego.

Dehydrogenaza cholesterolowa zależna od NAD(P) ma zastosowanie w laboratoriach klinicznych, bowiem jej użycie pozwala na łatwy, ilościowy pomiar cholesterolu we krwi poprzez bezpośredni pomiar absorbancji zredukowanej formy $\text{NAD(P)} - \text{A}_{340} \text{NAD(P)H}$.

W ostatnich latach określono sekwencję nukleotydową i aminokwasową dehydrogenazy cholesterolowej, zależnej od NAD(P) *Nocardia* sp. i na tej podstawie dowiedziono, że enzym składa się z 364 reszt aminokwasowych i zawiera na N-terminalnym końcu konserwatywną sekwencję, do której przy-

łącza się koenzym NAD(P). Enzym dehydrogenaza cholesterolowa zależna od NAD(P) *Nocardia* sp. wykazuje dużą specyficzność substratową i jest enzymem indukowanym w obecności cholesterolu. Udało się uzyskać bardzo wydajną ekspresję genu dehydrogenazy cholesterolowej *Nocardia* sp. w szczepie *Streptomyces lividans*. W nowym gospodarzu zaobserwowano 40-krotnie wyższą aktywność enzymu w porównaniu ze szczepem wyjściowym. Interesujące jest także to, że enzym syntetyzowany w zrekombinowanym szczepie ma charakter enzymu konstytucyjnego. Sądzi się, że utrata indukcyjnego charakteru enzymu związana jest z brakiem w nowym gospodarzu białka represorowego regulującego jego ekspresję w wyjściowym szczepie *Streptomyces lividans* (24).

4. Inne dehydrogenazy hydroksysteroidowe (HSD) mikroorganizmów

Obok opisanej dehydrogenazy cholesterolowej zależnej od NAD(P) w wielu organizmach zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych zidentyfikowano szereg innych dehydrogenaz hydroksysteroidowych. Dehydrogenaza 20 β -hydroksysteroidowa (20 β -HSD) izolowana ze szczepu *Streptomyces hydrogenes* wykazuje pewną homologię z dehydrogenazą alkoholową *Drosophila* i dlatego została zaliczona do grupy krótkołańcuchowych dehydrogenaz alkoholowych. Enzym ten charakteryzuje się niską zawartością reszt cysteiny oraz posiada konserwatywne reszty tyrozynowe (38,46).

Wysoką aktywność dehydrogenazy 20 α -hydroksysteroidowej (20 α -HSD) stwierdzono w komórkach *Tetrahymena pyriformis*. Białko tego enzymu wyizolowano z frakcji cytosolowej, oczyszczono i oceniono jego masę na 68 kDa. Białko 20 α -HSD składa się z dwóch podjednostek o takiej samej wielkości. Prowadzi ono reakcję oksydacji grupy hydroksylowej w pozycji 20 α steroidów w obecności koenzymu NADPH + H⁺ z wyjątkiem androgenów i estrogenów. Aktywność 20 α -HSD jest wykrywana w wielu mikroorganizmach, jednak oczyszczoną formę białka udało się dotychczas otrzymać tylko z *Clostridium scindens*. Biologiczna funkcja tego enzymu w komórkach bakterii jest wciąż nie znana. Wiadomo jedynie, że jest to białko o masie 162 kDa, występujące w formie tetrameru i wykazujące wysoką specyficzność w stosunku do 17 α - i 21 α -dihydroksyadrenokortykoidów (25). W szczepie *Streptomyces hydrogenes* zidentyfikowano dwa enzymy, to jest: 3 α - i 20 α -HSD, których sekwencja aminokwasowa jest identyczna odpowiednio z 11 β - i 17 β -HSD izolowanymi z tkanek zwierzęcych (25,61). W przeprowadzonych badaniach dobrze oczyszczonych preparatów dehydrogenazy 3 α -hydroksysteroidowej dowiedziono, że enzym ten zbudowany jest przynajmniej z dwóch podjednostek, z których duża wykazuje optymalną aktywność w pH 6,2, zaś mała w pH 5,8 (62).

Innym enzymem tej grupy jest dehydrogenaza 7 α -hydroksysteroidowa (7 α -HSD) *E. coli* HB101, którego gen sklonowano i uzyskano jego ekspresję w komórkach *E. coli* DH1. Białko tego enzymu występuje w formie tetramerycznej

i wykazuje aktywność w stosunku do grupy hydroksylowej w pozycji 7 kwasów żółciowych, przekształcając je do kwasów deoksycholowego i lithocholowego. Okazało się, że występują dwa typy 7α -HSD: NADH- lub NADPH-zależne (5,74). Aktywność 7α -HSD NADP-zależnej wykryto także w komórkach *Eubacterium* sp. Zlokalizowano i sklonowano gen kodujący syntezę tego enzymu i uzyskano jego ekspresję w komórkach *E. coli*. Otrzymane białko odznaczało się aktywnością 30 razy większą w porównaniu do aktywności enzymu izolowanego ze szczepu wyjściowego (5).

Obecność dehydrogenaz hydroksysteroidowych w tkankach zwierzęcych, komórkach pierwotniaków i bakterii wskazuje na szerokie rozpowszechnienie tej grupy enzymów wśród organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Dobrym przykładem takiego szerokiego rozpowszechnienia może być dehydrogenaza 17β -hydroksysteroidowa (17β -HSD) zidentyfikowana zarówno w komórkach grzybów, tkankach zwierzęcych, jak i w komórkach bakterii, jednakże enzym ten izolowany z bakterii odznacza się aktywnością o 1-2 rzędy wyższą w porównaniu z enzymem izolowanym z tkanek zwierzęcych.

Do tej pory zidentyfikowano 4 typy dehydrogenaz 17β -hydroksysteroidowych, które wykazują zaledwie 25% homologii na poziomie sekwencji aminokwasowej (35,49). Dobrze scharakteryzowanym, wysoce specyficznym substratowo enzymem jest 17β -HSD z *Cylindrocarpon radlicola* ATCC 11011. Enzym ten wykazuje znaczną specyficzność w stosunku do testosteronu i wymaga NADH + H⁺ jako akceptora wodoru. *Cylindrocarpon radlicola* jest grzybem biorącym udział w katabolizmie progesteronu do 1-dehydrotestololaktanu i dalszych produktów (29).

5. Dehydrogenazy hydroksysteroidowe ssaków

Izoenzymy dehydrogenazy 17β -hydroksysteroidowej regulują równowagę biologiczną między wysoce aktywnymi 17β -hydroksysteroidami a nisko aktywnymi 17-ketosteroidami, co w konsekwencji reguluje aktywność niektórych hormonów steroidowych. Nie ma wątpliwości, że wiele innych enzymów działających na grupę C17 steroidów jest wykorzystywanych do precyzyjnej kontroli poziomu różnych hormonów w organizmie (35,49).

Dla przykładu, 17β -HSD typ I działa jako reduktaza i przekształca estron w estradiol, zaś 17β -HSD typ II posiada aktywność oksydacyjną i inaktywuje estradiol poprzez jego konwersję do estronu (39). 17β -HSD zidentyfikowana w tkankach człowieka składa się z trzech strukturalnych domen, które nie występują wśród pozostałych dehydrogenaz. Ponadto N-terminalna domena tej dehydrogenazy jest podobna do krótkołańcuchowych dehydrogenaz alkoholowych.

Stwierdzono, że 17β -HSD jest obecna w tkankach tworzących steroidy, takich jak np. błona śluzowa macicy. Udowodniono, że 17β -HSD izolowana z łożyska składa się z dwóch podjednostek o masie około 34 kDa, jednak nie wykazano znaczącej homologii pomiędzy 17β -HSD a innymi enzymami tej grupy (52).

Szczególnie ważnym odkryciem jest fakt, że dehydrogenaza 11β -hydroksysteroidowa (11β -HSD) człowieka jest enzymem biorącym udział w kontroli

ciśnienia krwi, a mutacje w kodonie 337 genu 11β -HSD polegające na podstawieniu Cys zamiast Arg prowadzą do zaburzeń ciśnienia krwi (16). Ponadto wykazano, że w organizmie człowieka dehydrogenaza 11β -hydroksysteroidowa bierze udział w przekształcaniu kortyzolu do kortyzonu. Brak aktywności tego enzymu prowadzi u dzieci do zaburzeń określanych jako super-napężenie wieku dziecięcego, które spowodowane jest podwyższeniem poziomu mineralokortykoidów. W szczegółowej analizie białka wykazano, że enzym ten jest glikoproteiną o masie 34 kDa i wymaga obecności utlenionej formy $\text{NADPH} + \text{H}^+$ jako akceptora elektronów (1,68).

Enzymy 11β -HSD podzielono na dwie grupy: w pierwszej wykorzystują $\text{NADH} + \text{H}^+$, w drugiej zaś $\text{NADPH} + \text{H}^+$ jako kofaktory reakcji enzymatycznych, co jest zależne od rodzaju tkanki, w której enzymy te są produkowane (2,3). W wykonanej analizie sekwencji aminokwasowej białka dehydrogenazy 11β -hydroksysteroidowej ujawniono 27% homologię z białkiem dehydrogenazy rybitolu *Klebsiella* oraz znaczną homologię z produktem genu *notG* bakterii nitryfikacyjnych, np. *Rhizobium meliloti* (1).

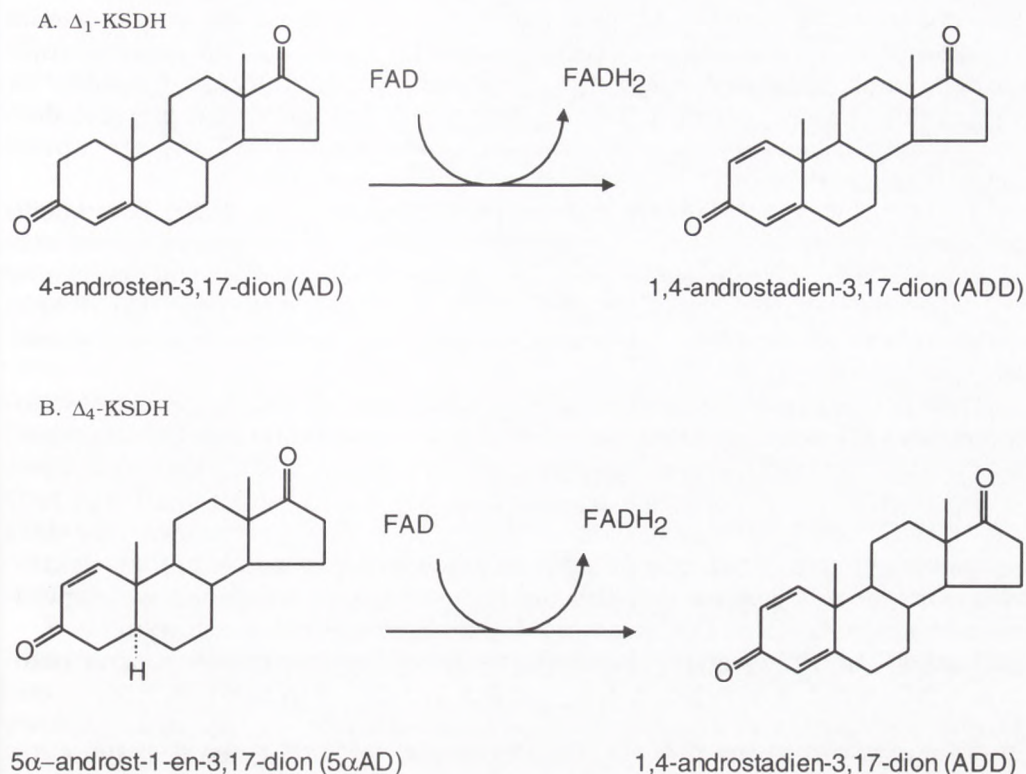
Ostatnio zidentyfikowano także dehydrogenazę 7α -hydroksysteroidową (7α -HSD), która jest NADH -zależną oksydoreduktazą zaliczaną do rodziny I krótkołańcuchowych dehydrogenaz/reduktaz. Omawiany enzym katalizuje utlenienie grupy hydroksylowej w pozycji C7 szkieletu steroidowego kwasów żółciowych. Reszty Tyr 159 i Ser 146 białka enzymu, jak się sądzi, pełni istotną rolę w katalizowaniu reakcji poprzez oddziaływanie z grupami hydroksylowymi substratu (67).

Ponadto stwierdzono, że dehydrogenaza 20α -hydroksysteroidowa (20α -HSD) odgrywa ważną rolę w czasie ciąży, prowadząc redukcję progesteronu z wytworzeniem mniej aktywnej formy 20α -hydroksyprogesteronu. 20α -HSD poddano ekspresji w komórkach bakteryjnych i owadów w celu otrzymania wysokiej jakości enzymu. Masę białka enzymatycznego oceniono na 37 kDa oraz wykazano wysoką specyficzność substratową enzymu w stosunku do progesteronu i 20α -hydroksyprogesteronu. 17α -hydroksyprogesteron podlega przekształceniom jedynie w 20%. Stwierdzono także, że 20α -HSD wymaga dla swej aktywności zredukowanej formy $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (37) (tab. 1, rys. 2).

TABELA 1

WYKORZYSTANIE SUBSTRATÓW I KOFAKTORÓW PRZEZ RÓŻNE DEHYDROGENAZY HYDROKSYSteroidOWE

Enzym	Substrat	Kofaktor
3β -HSD	cholesterol	NAD(P)
3α -HSD	cholesterol	NAD(P)
7α -HSD	kwas żółciowy	NADP , NAD
11β -HSD	kortyzol	NAD , NADP
17β -HSD	estron, estradiol	NAD
20β -HSD		NAD(P)
20α -HSD	17α - i 21α -hydroksykortykoidy, progesteron	NADP (H)



Rys. 3. Mechanizmy reakcji katalizowanych przez Δ^1 - i Δ^4 dehydrogenazy 3-ketosteroidowe.

6. Dehydrogenazy ketosteroidowe

Kolejną ważną grupą enzymów uczestniczących w przekształceniach steroidów są dehydrogenazy ketosteroidowe KSDH [EC 1.3.99.4]. Wśród bakterii zidentyfikowano do tej pory dwa enzymy należące do tej grupy. Są to Δ^1 - i Δ^4 -dehydrogenazy ketosteroidowe. Oba enzymy wprowadzają podwójne wiązanie w pierścieniu A szkieletu steroidowego odpowiednio w pozycję C1-C2 oraz C4-C5 (53) (rys. 3).

Cechą charakterystyczną wszystkich białek enzymatycznych KS1DH jest obecność reszty Glu oraz wysoce konserwatywnej sekwencji aminokwasowej D-V-L-V-V-G-S-G w domenie białka wiążącej kofaktor FAD (17).

Δ^1 - i Δ^4 -(5 α)-dehydrogenazy ketosteroidowe są enzymami związanymi z membranami komórek, zaś Δ^4 -(5 β)-dehydrogenaza ketosteroidowa stanowi frakcję białek rozpuszczalnych. Reakcja prowadzona przez Δ^1 -dehydrogenazę 3-ketosteroidową (KS1DH) polega na konwersji 4-en-3-ketosteroidów do 1,4

dienowych pochodnych przez eliminację wodoru z pozycji C1(α) i C2(β). Należy podkreślić, że wprowadzenie podwójnego wiązania C1-C2 do pierścienia A cyklopentanoperhydrofenantrenu jest zasadniczą reakcją zapoczątkowującą degradację układu steroidowego. Tego typu przekształcenia steroidów są wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym; produkty tego przekształcenia, steroidy 3-keto-1,4-dienowe mają silne właściwości antyalergiczne i przeciwreumatyczne.

Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowe podzielono na dwie grupy ze względu na różnicowaną specyficzność substratową. Jedną grupę tych enzymów stanowią KS1DH bakterii gramdodatnich, które mogą wprowadzać podwójne wiązanie do C-11 hydroksysteroidów bądź C-11 ketosteroidów. Do drugiej grupy zalicza się KS1DH *P. testosteroni*, która nie wykorzystuje wspomnianych substratów (17).

Dobrze poznanym białkiem enzymatycznym jest Δ^1 -dehydrogenaza 3-ketosteroidowa *Nocardia corallina*, która jest białkiem o charakterze indukcyjnym, a w postaci oczyszczonej jest monomerycznym o masie 60,5 kDa. Enzym ten jest flawoproteiną, w którym grupą prostetyczną jest FAD w stosunku 1 mol FAD na 1 mol białka. Enzym ten działa zatem jako flawoproteinowa oksydaza z wykorzystaniem tlenu cząsteczkowego jako ostatecznego akceptora elektronów. Grupa prostetyczna dehydrogenazy może zostać odłączona w temperaturze 100°C lub w wyniku działania 5% kwasem trójchlorooctowym.

Reakcję enzymatyczną 1-dehydrogenacji Δ^4 -3-ketosteroidów można przeprowadzić także w obecności metylosiarczanu fenazy jako akceptora elektronów. Wykazano, że 3-ketosteroidy, posiadające grupę hydroksylową w pozycji 11 α lub 11 β , podlegają przekształceniom jedynie w niewielkim stopniu. Oczyszczony enzym wydajnie katalizuje aromatyzację pierścienia A takich steroidów jak 19-nortestosteron i 19-norandrostendion, przekształcając je odpowiednio w estradiol i estron. Zdolność wprowadzania podwójnego wiązania do steroidowego pierścienia A związana z aktywnością omawianych enzymów zaobserwowano także wśród innych mikroorganizmów takich jak: *Cylindrocarpon radiclecola*, *Pseudomonas testosteroni*, *Arthrobacter simplex* czy *Nocardia* sp. (27).

Dobrze poznanym enzymem jest także Δ^1 -dehydrogenaza 3-ketosteroidowa *Nocardia opaca*. Białko tego enzymu oczyszczono i ustalono sekwencję aminokwasową jego N- terminalnej części, a masę białka oceniono na około 58 kDa. W sekwencji pierwszych 56 aminokwasów wykazano 58% homologii z białkiem wyizolowanym z *P. testosteroni*. Określono potencjalne miejsce wiązania rybosomu, to jest sekwencję TGGAGT położoną 10 pozycji powyżej przypuszczalnego kodonu startu (ATG), a także konserwatywną sekwencję bogatą w reszty glicyny, która stanowi domenę białka wiążącą FAD (12,13).

Gen Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowej (ksdD) *A. simplex* IFO12069 sklonowano w szczepie *S. lividans*. W nowym gospodarzu enzym podlegał nadprodukcji około 25 razy większej niż w szczepie wyjściowym. Prawdopodobnie zwiększona produkcja enzymu w szczepie *S. lividans* wynika z jego występowania zarówno w formie zewnętrznej jak i wewnętrznej. Enzym ten katalizuje wydajnie konwersję kilku 3-ketosteroidów, lecz steroidy posiadające

grupę hydroksylową w pozycji 11 α i 11 β ulegają przekształceniom ze znacznie niższą szybkością. Należy podkreślić, że w sekwencji aminokwasowej białka KS1DH *A. simplex* IFO12069 wykazano pewną homologię z KS1DH *P. testosteroni* oraz z reduktazą bursztynianu *Shewanella putrefaciens*. W wyniku reakcji przekształcania 3-ketosteroidów przez KS1DH powstają związki o wysokiej aktywności antyalergicznnej i przeciwreumatycznej (10).

W badaniach genetycznych lokalizacji genu Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowej *A. simplex* i analizie jego sekwencji nukleotydowej dowiedziono, że gen jest częścią operonu składającego się jeszcze z co najmniej dwóch innych genów, które przypuszczalnie związane są także z metabolizmem steroidów. Powyżej genu *ksdD* znaleziono gen *ksdR* kodujący prawdopodobnie białko regulatorowe. Gen *ksdR* wykazuje homologię z genem *kdgR* kodującym syntezę negatywnego regulatora biodegradacji pektyn w komórkach *Erwinia* oraz z genem *gylR* kodującym aktywator metabolizmu glicerolu u *Streptomyces*. Poniżej genu *ksdD* zlokalizowany jest gen *ksdI* kodujący białko o wysokim podobieństwie do Δ^5 -izomerazy 3-ketosteroidowej *P. putida*, a oba wymienione geny są połączone przez nałożenie na siebie 4 par zasad. Poniżej operonu *KSDI* wykryto 3 kolejne otwarte ramki odczytu, z których jedna posiada wysoką homologię z genem *ksdD*, a jej produkt może być również zaangażowany w przemiany steroidów (45).

W centrum aktywnym enzymu Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowej zidentyfikowano wysoce konserwatywne reszty Tyr i Asp (43). Zaobserwowano, że proces 1-dehydrogenacji musi być poprzedzony przez cięcie łańcucha bocznego C17-cholestenonu, a zablokowanie tego procesu prowadzi do inaktywacji również innych enzymów. Jedynie reakcja 4-dehydrogenacji może przebiegać niezależnie od cięcia łańcucha alkilowego (66).

Wykazano także, że Δ^1 -dehydrogenaza 3-ketosteroidowa *N. corallina* prowadzi reakcję transhydrogenacji steroidów 3-keto-4-enowych do steroidów 3-keto-1,4-dienowych. Optymalne pH dla reakcji transhydrogenacji jest około 8,4 i jest niższe w porównaniu z reakcją dehydrogenacji (pH 10). Enzym ten wprowadza dwa stałe wiązania C-H, co jest w znacznym stopniu podobne do reakcji prowadzonych przez dehydrogenazy acylo-CoA, dehydrogenazy glutarylo-CoA oraz oksydazy acylo-CoA izolowane z tkanek ssaków. Zauważono także wpływ grupy 11 β -hydroksylowej substratów steroidowych w procesie transhydrogenacji co sugeruje, że dawca i biorca wodoru są związane w tym samym miejscu enzymu. Enzym ten prowadzi reakcję transhydrogenacji jedynie wówczas gdy substrat steroidowy charakteryzuje się grupą ketonową przy węglu 3 (C-3) pierścienia steroidowego (28).

Kolejnym, dobrze scharakteryzowanym enzymem izolowanym ze szczepu *Nocardia corallina* jest Δ^4 -(5 α)-dehydrogenaza 3-ketosteroidowa. Enzym ten katalizuje reakcję dehydrogenacji 3-keto-(5 α)-steroidów w pozycji 4-5, przekształcając 5 α -AD do ADD w obecności metylosiarczanu fenazyny jako akceptora elektronów. Omawiane białko jest flawoproteiną zawierającą jedną cząsteczkę FAD jako grupę prostetyczną, która jest także akceptorem elektronów w reakcji utleniania steroidów w pozycji 4 β i 5 α . Białko tego enzymu jest monomerem o masie 60 kDa. Enzym ten katalizuje także reakcję trans-

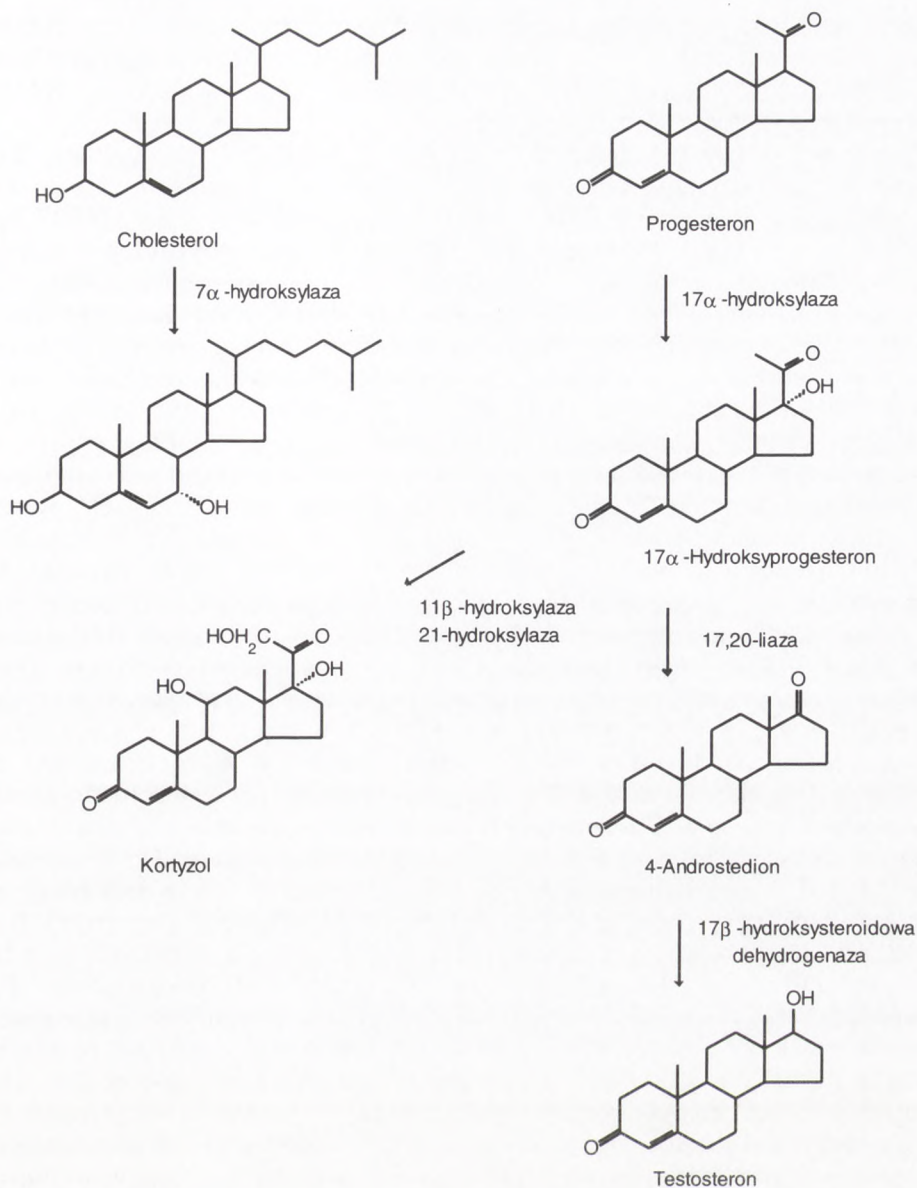
hydrogenacji pomiędzy 3-keto-(5 α)-steroidami a steroidami 3-keto-1,4-dienowymi. Aktywność Δ^4 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowej w komórkach *Nocardia corallina* jest znacznie niższa w porównaniu z aktywnością Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowej. Oba enzymy wykazują także inne różnice. Dla przykładu Δ^4 -dehydrogenaza 3-ketosteroidowa odznacza się niższą aktywnością oksydazy i jest flawodehydrogenazą, natomiast Δ^1 -dehydrogenaza 3-ketosteroidowa jest flawooksydazą i przekształca substraty steroidowe o konfiguracji 5 α (20). Aktywność Δ^4 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowej wykryto także w szczepie *P. testosteroni*. Okazało się, że szczep ten produkuje 3 rodzaje dehydrogenaz ketosteroidowych. Są to Δ^1 -dehydrogenaza 3-ketosteroidowa, oraz dwa typy Δ^4 -dehydrogenaz 3-ketosteroidowych: Δ^4 (5 α) i Δ^4 (5 β).

Gen $\Delta^4(5\alpha)$ ksdD *P. testosteroni* sklonowano w komórkach *E. coli* JM 101, w których uzyskano 18 razy większą ekspresję białka w porównaniu ze szczepem wyjściowym. $\Delta^4(5\alpha)$ -dehydrogenaza 3-ketosteroidowa wykazuje wyższą aktywność i specyficzność substratową w stosunku do Δ^1 androsten-3,17-dionu niż do 5 α -androstan-3,17-dionu. Określono optymalne warunki dla aktywności enzymu (pH 8, 40°C) oraz zidentyfikowano otwartą ramkę odczytu o długości 1593 par zasad kodującą białko tego enzymu. W analizie sekwencji aminokwasowej ujawniono miejsce wiązania FAD co potwierdza, że $\Delta^4(5\alpha)$ -KSDH jest flawoproteiną (17).

7. Hydroksylazy steroidowe

Reakcja hydroksylacji jest najczęściej występującą transformacją związków steroidowych. Hydroksylacji mogą podlegać wszystkie pozycje struktury pierścieniowej steroidów, a także niektóre pozycje w ich łańcuchu bocznym, co świadczy o wysokiej różnorodności enzymów tej klasy. Stosunkowo słabo poznana jest genetyczna determinacja enzymów należących do grupy hydroksylaz (rys. 4).

Wydajność procesu hydroksylacji u grzybów oraz jego specyfika są najczęściej cechami charakterystycznymi dla gatunku, a nawet szczepu. Grzybowe hydroksylazy działają jako miejscowo selektywne monoooksygenazy angażujące system cytochromu P450 oraz NADPH + H⁺ jako kofaktor (4). Najczęściej wykorzystywanym substratem w reakcji hydroksylacji prowadzonej przez grzyby jest progesteron. Dla przykładu *Mucor hiemalis* prowadzi reakcję hydroksylacji progesteronu w pozycji 14 α , natomiast w przypadku *Rhizopus nigricans*, *Rhizopus arrhizus*, *Aspergillus ochraceus* hydroksylacji podlega progesteron w pozycji 11 α . 11 α -hydroksylaza *A. ochraceus* jest złożonym kompleksem, w którym zidentyfikowano: cytochrom P450, reduktazę NADPH-cytochrom P450 oraz fosfatydylocholinę. Hydroksylaza ta wykazuje podobieństwo do monoooksygenazy produkowanej w mikrosomach wątroby ssaków. W reakcji hydroksylacji związków steroidowych w hodowlach *A. ochraceus* wymagana jest obecność glukozy-6-fosforanu i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu niezbędnych dla regeneracji puli NADPH. Podobnie jak w przypadku hydroksylaz bakteryjnych, również dla hydroksylazy produkowanej



Rys. 4. Schemat przekształceń substratów steroidowych przez wybrane hydroksylazy steroidowe.

wanej przez *A. ochraceus* najlepszym induktorem systemu enzymatycznego, jak się okazało, był progesteron (31).

Aktywną formę 11 β -hydroksylazy, która jest istotnym enzymem w szlaku biosyntezy hydrokortyzonu, otrzymano w rekombinantach drożdżowych (11).

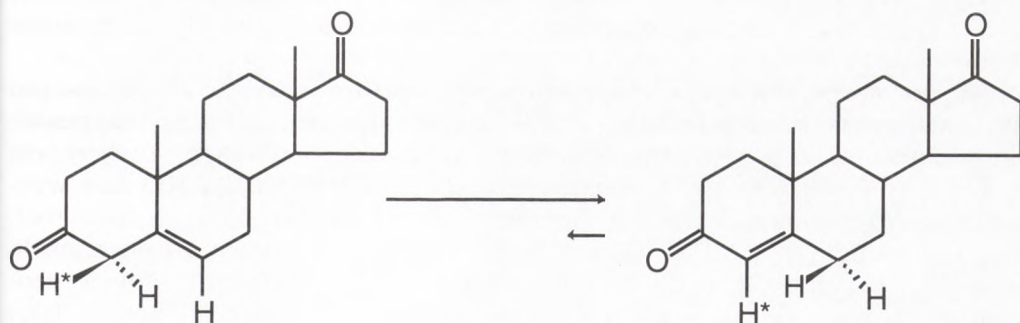
W skład aktywnego układu 11β -hydroksylazy wchodzi reduktaza NADPH-adrenodoksynowa, która jest zaangażowana w proces przenoszenia elektronów. Jednakże fizjologiczna funkcja drożdżowej oksydoreduktazy NADPH-adrenodoksynowej nie jest znana (11).

Inną zidentyfikowaną hydroksylazą jest ludzka 7α -hydroksylaza, która jest pierwszym enzymem uczestniczącym w konwersji cholesterolu do kwasów żółciowych w wątrobie. Enzym ten jest produktem genu CYP27 cytochromu P450, a jego aktywność jest regulowana przez hydrofobowe kwasy żółciowe. Zmodyfikowany gen 7α -hydroksylazy cholesterolowej sklonowano w wektorze ekspresyjnym pJL, którym transformowano komórki *E. coli* MV1304. Otrzymano pięciokrotnie wyższą ekspresję tego enzymu w komórkach *E. coli* oraz wykazano 85% identyczność sekwencji aminokwasowej pomiędzy ludzką i szczurzą 7α -hydroksylazą (32). Ponadto aktywność 7α -hydroksylazy wykryto w pomitochondrialnym supernatancie *Phycomyces blakesleeanus*. Enzym ten dla swej aktywności wymaga zredukowanego NADP jako kofaktora, który niekiedy może być zamieniony na NADH + H⁺. Reakcja prowadzona przez 7α -hydroksylazę jest w pewnym stopniu hamowana przez azole, ketokonazole i dikonazole, co świadczy o katalizowaniu hydroksylacji przez cytochrom P450. Ponadto nie zaobserwowano różnic aktywności enzymu w hodowlach indukowanych lub nie indukowanych progesteronem, co może sugerować, że 7α -hydroksylaza jest enzymem konstytucyjnym (64).

Ostatnio w opublikowanych pracach opisuje się, że endotoksyny i cytokiny powodują wzrost syntezy cholesterolu i wydzielanie lipoprotein przez wątrobę gryzoni, prowadząc do hipercholesterolemii. Natomiast 7α -hydroksylaza cholesterolowa jest enzymem umożliwiającym konwersję cholesterolu do kwasów żółciowych w wątrobie, a zmniejszenie się ilości enzymu mogłoby doprowadzić do wzrostu cholesterolu dostępnego do produkcji lipoprotein. Dowiedziono, że LPS, TNF i IL-1 są czynnikami zmniejszającymi poziom 7α -hydroksylazy cholesterolowej w wątrobie bądź wpływającymi na spadek aktywności enzymu (15,47).

Interesujące było także uzyskanie fuzyjnych białek składających się z bydłych cytochromów P450 i drożdżowej reduktazy NADPH-cytochrom P450 w komórkach *Saccharomyces cerevisiae*. Otrzymane zrekombinowane szczepy drożdżowe wykazywały aktywność 17α -hydroksylazy zależnej od monooksygenazy P450c17 w stosunku do progesteronu. Stwierdzono, że tak skonstruowane białka fuzyjne reduktazy wykazują wzmocnioną aktywność 17α -hydroksylazy, zaś długość i sekwencja aminokwasowa regionu „zawiasowego” między P450c17 a drożdżową reduktazą odgrywają ważną rolę w wydajnych wewnątrzcząsteczkowych reakcjach utleniania i redukcji.

Należy dodać, że mikrosomalna monooksygenaza P450c17 jest podstawowym enzymem w biosyntezie hormonów steroidowych u ssaków bowiem bierze udział w produkcji mineralokortykoidów, glukokortykoidów i hormonów płciowych. Wiadomo także, że mikrosomalne P450 monooksygenazy zawierające cytochrom P450 i NADPH-P450-reduktazę odgrywają zasadniczą rolę w oksydacyjnym metabolizmie różnych lipofilnych związków, a w tym także substratów endogennych takich jak: steroidy, kwasy tłuszczowe czy prostaglandyny (19,56,59,69).



Rys. 5. Mechanizm reakcji katalizowanej przez izomerazę ketosteroidową.

Generalnie, enzymy współdziałające z systemem P450 są szeroko rozpowszechnione wśród zwierząt, grzybów, roślin i *Eubacterii*, a w ostatnich publikacjach opisuje się sposób identyfikacji potencjalnej sekwencji nukleotydowej P450 u *Sulfolobus solfataricus*. Enzymy zawierające cytochrom P450 pełnią rolę końcowych oksydaz w wieloskładnikowym łańcuchu przenoszenia elektronów i są określane jako systemy monoooksygenaz zawierających cytochrom P450 (14,73).

8. Izomeraza ketosteroidowa

Stosunkowo dobrze poznanym enzymem pośredniczącym w modyfikacjach steroli jest izomeraza ketosteroidowa — KSI [EC 5.3.3.1], której odkrycie datuje się na 1955 r. Enzym ten jest zaangażowany w biodegradację (u bakterii) i biosyntezę (u ssaków) związków steroidowych. Enzym ten przeprowadza reakcję izomeryzacji 3-keto $\Delta^{5,6}$ - i 3-keto $\Delta^{5,10}$ -steroidów do izomerów Δ^4 poprzez przenoszenie protonów z pozycji 4β substratu w pozycję 6β lub 10β . Izomeryzacja substratów steroidowych $\Delta^{5,10}$ przebiega około 1000 razy wolniej niż $\Delta^{5,6}$ (22,30) (rys. 5).

Izomerazę ketosteroidową izolowaną ze szczepów *Pseudomonas testosteronei* i *Pseudomonas putida* oczyszczono i scharakteryzowano, a jej masę oceniono na około 14 kDa. Stwierdzono, że czynniki chelatujące, takie jak: hydroksychinolina, dipirydył, etylenodiamina nie mają wpływu na aktywność enzymu. Ponadto zauważono istotne znaczenie reszt histydyny w aktywności enzymu (8,9,30,34).

Gen *ksdI* *P. testosteronei* kodujący syntezę tego enzymu sklonowano w wektorze pUC19, wprowadzając go pod kontrolę promotora *Plac*, a następnie tak zrekombinowanym plazmidem transformowano komórki *E. coli* JM101 i uzyskano nadprodukcję enzymu w hodowli indukowanej IPTG (34).

Sklonowano także gen *ksdI* *P. testosteronei* w fagu λ gt11, którym zainfe-

kowane komórki *E. coli* produkowały polipeptyd rozpoznawany przez surowicę skierowaną przeciwko oczyszczonej izomerazie ketosteroidowej *P. testosteroni* (8).

Na podstawie sekwencji aminokwasowych stwierdzono, że reszta kwasu asparaginowego występująca w pozycji 38 jest odpowiedzialna za przenoszenie elektronów z pozycji 4 β do pozycji 6 β . Zauważono także, że komórki *E. coli* transformowane zrekombinowanym plazmidem wykazują 100 razy wyższą ekspresję izomerazy ketosteroidowej w porównaniu do *P. testosteroni*. Prawdopodobnie taka silna nadprodukcja enzymu jest związana z obecnością sekwencji bogatej w puryny 10 par zasad powyżej sekwencji kodującej izomerazę ketosteroidową. Sekwencja ta w komórkach *E. coli* funkcjonuje jako miejsce wiązania rybosomu (9).

Funkcję kwasu asparaginowego (Asp 38) jako aminokwasu zaangażowanego w deprotonizację substratu poprzez szereg pośredników dienolowych potwierdzono, konstruując mutanty posiadające izomerazę ketosteroidową ze zmienionymi zasadami azotowymi w pozycji 38 (21).

Gen izomerazy ketosteroidowej ze szczepu *P. putida* biotyp B sklonowano, a następnie poddano ekspresji w komórkach *E. coli* BL21(DE3), uzyskując wysoki poziom ekspresji białka KSI po indukcji hodowli IPTG. Wykazano także, że poza resztą kwasu asparaginowego w pozycji 38 również tyrozyna występująca w pozycji 14 białka bierze udział w protonizacji 3-ketosteroidów do formy dienolowej lub działa jako elektrofilny katalizator lub też bierze udział w utrzymywaniu stabilnego wiązania wodór-tlen przy węglu C3 steroidów, co ma wpływ na wytwarzanie pośrednika dienolowego. Zaobserwowano, że zdolność katalityczna KSI maleje wraz ze wzrostem pH powyżej 9, zaś wprowadzenie innego aminokwasu w pozycję 38 może prowadzić do uzyskania formy o podwyższonej aktywności. Sądzi się, że hydrofobowość środowiska i potencjał elektryczny są czynnikami wpływającymi na reszty aminokwasowe w centrum aktywnym enzymu (22).

Hydrofobowe reszty aminokwasowe mogą odgrywać zasadniczą rolę w reakcji katalitycznej, co dowiedziono poprzez konstrukcję mutantów, które syntetyzują białko posiadające w centrum aktywnym enzymu zamiast Phe inne aminokwasy, np. Leu czy Ala (6,75). Stwierdzono, że polipeptyd izomerazy ketosteroidowej *P. putida* jest o sześć reszt aminokwasowych dłuższy od izomerazy ketosteroidowej *P. testosteroni*, a przeprowadzając analizę jego sekwencji aminokwasowej wykazano obecność trzech dodatkowych reszt cysteinowych oraz dwóch reszt tryptofanu, które nie są obecne w białku syntetyzowanym przez *P. testosteroni*. Gen izomerazy ketosteroidowej *P. putida* składa się z 393 p.z. stanowiących ORF z kodonem startu ATG i kodonem stopu TAG. Sekwencje nukleotydowe obu omawianych genów *ksdI* wykazują około 50% identyczności (33,36).

Z zestawienia enzymów uczestniczących w przekształceniach związków steroidowych można zauważyć, że takie same lub podobne enzymy występują zarówno w komórkach bakterii, grzybów strzępkowych jak i w tkankach kręgowców. Ponadto enzymy te w organizmach wyższych są często zaangażowane w szereg istotnych procesów metabolicznych, a mutacje w genach

kodujących te enzymy mogą być przyczyną niektórych opisanych chorób człowieka.

Należy stwierdzić, że badania bakteryjnych i grzybowych genów i enzymów odpowiedzialnych za biotransformację związków steroidowych mają istotne znaczenie nie tylko dla biotechnologii, produkcji leków steroidowych, ale także są istotnym elementem ważnych badań podstawowych.

Literatura

1. Agarwal A. K., Monder C., Eckstein B., White P. C., (1989), *J. Biol. Chem.*, 264, 18939-18943.
2. Agarwal A. K., Rogerson F. M., Mune T., White P. C., (1995), *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 55, 473-479.
3. Agarwal A. K., Mune T., Monder C., White P. C., (1995), *Endocr. Res.*, 21, 389-397.
4. Antoniu T. N. H., Curran B. P. G., Smith K. E., (1994), *Microbiology*, 140, 1633-1640.
5. Baron S. F., Franklund C. V., Hylemon P. B., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 4558-4569.
6. Brothers P. L., Blotny G., Qi L., Pollack R. M., (1995), *Biochemistry*, 34, 15453-15458.
7. Cho H. J., Choi K. P., Yamashita M., Morikawa H., Murooka Y., (1996), *Appl. Mol. Bacteriol.*, 44, 133-138.
8. Choi K. Y., Benisek W. F., (1987), *Gene*, 58, 257-264.
9. Choi K. Y., Benisek W. F., (1988), *Gene*, 69, 121-129.
10. Choi K. P., Molnar I., Yamashita M., Murooka Y., (1995), *J. Biochem.*, 117, 1043-1049.
11. Dumas B., Cauet G., Lacour T., Degryse E., Laruelle L., Ledoux C., Spagnoli R., Achstetter T., (1996), *Eur. J. Biochem.*, 238, 495-504.
12. Dutta R. K., Roy M. K., Singh H. D., (1992), *J. Basic Microbiol.*, 32, 167-176.
13. Drobnic K., Križaj I., Gubensek F., Komel R., (1993), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 190, 509-515.
14. Fabian P., Degtyarenko K. N., (1996), *Nucl. Acid Res.*, 25, 274-277.
15. Feingold K. R., Spady D. K., Pollock A. S., Moser A. H., Grunfeld C., (1996), *J. Lipid Res.*, 37, 223-228.
16. Ferrari P., Obeyesekere V. R., Li K., Rews R. K., Krozowski, Z. S., (1996), *Steroids*, 61, 197-200.
17. Florin C., Kohler T., Grandguillot M., Plesiat P., (1996), *J. Bacteriol.*, 178, 3322-3330.
18. Fujishiro K., Otha T., Hasegawa M., Yamaguchi K., Mizukami T., Uwajima T., (1990), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2, 721-727.
19. Guzov V. M., Zelko I. N., Chudaev M. V., Guzova J. A., Chung B. C., Usanov S. A., (1996), *Biochemistry*, 61, 1242-1252.
20. Hatta T., Wakabayashi T., Itagaki E., (1991), *J. Biochem.*, 109, 581-586.
21. Holman Ch. M., Benisek W. F., (1994), *Biochemistry*, 33, 2672-2681.
22. Holman Ch. M., Benisek W. F., (1995), *Biochemistry*, 34, 14245-14253.
23. Horii M., Ishizaki T., Paik S. Y., Manome T., Murooka Y., (1990), *J. Bacteriol.*, 172, 3644-3653.
24. Horinouchi S., Ishizuka H., Beppu T., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1386-1393.
25. Inazu A., Sato K., Nakayama T., Deyashiki Y., Hara A., Nozawa Y., (1994), *J. Biochem.*, 297, 195-200.
26. Ishizaki T., Hirayama N., Shinkawa H., Nimi O., Murooka Y., (1989), *J. Bacteriol.*, 171, 596-601.
27. Itagaki E., Wakabayashi T., Hatta T., (1990), *Biochim. Biophys. Acta*, 1038, 60-67.
28. Itagaki E., Matushita H., Hatta T., (1990), *J. Biochem.*, 108, 122-127.
29. Itagi E., Iwaya T., (1988), *J. Biochem.*, 103, 1039-1044.
30. Jarabek R., Colvin M., Moolgavkar S. H., Talalay P., (1969), *Methods Enzymol.*, 15, 642-651.

31. Jayaanthi C. R., Madyastha P., Madyastha M., (1982), *Res. Commun.*, 106, 1262-1268.
32. Karam W. G., Chiang J. Y. L., (1994), *J. Lipid Res.*, 35, 1222-1231.
33. Kim S. W., Kim Ch. Y., Benisek W. F., Choi K. Y., (1994), *J. Bacteriol.*, 21, 6672-6676.
34. Kuliopolus A., Shortle D., Talalay P., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 8893-8897.
35. Leenders F., Tesdorpf J. G., Markus M., Engel T., Seedorf U., Adamski J., (1996), *J. Biol. Chem.*, 271, 5438-5442.
36. Linden K. G., Benisek W. F., (1986), *J. Biol. Chem.*, 14, 6454-6460.
37. Mao J. F., Duan R. W., Zhong L., Gibori G., Azhar S., (1997), *Endocrinology*, 138, 182-190.
38. Marekov L., Krook M., Jornvall H., (1990), *FEBS Letters*, 266, 51-54.
39. Miettinen M. M., Mustonen M. V., Poutanen M. H., Isomaa V. V., Vihko R. K., (1996), *J. Biochem.*, 314, 839-845.
40. Miyamoto M., Matsumoto J., Iwaya T., Itagaki E., (1995), *Biochim. Biophys. Acta*, 1251, 115-124.
41. Molnar I., Choi K. P., Nobuyuki H., Murooka Y., (1991), *J. Ferment. Bioeng.*, 72, 368-372.
42. Molnar I., Hayashi K. P., Yamamoto H., Yamashida M., Murooka Y., (1993), *Mol. Microbiol.*, 7, 419-428.
43. Molnar I., Choi K. P., Yamashita M., Murooka Y., (1995), *Mol. Microbiol.*, 15, 895-905.
44. Murooka Y., Ishizaki T., Nimi O., Maekawa N., (1986), *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 1382-1385.
45. Murooka Y., Choi K. P., Molnar I., Dziadek J., Cho, H. J., Nomura N., Yamashita M., (1996), *Actinomycetol.*, 10, 1-11.
46. Nakajin S., Nakajima T., Uchida M., Ohno S., Shinoda M., (1995), *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 54, 257-264.
47. Nikoshkov A., Lajic S., Holst M., Wedell A., Luthman H., (1997), *J. Clin. Endocrin. Metabol.*, 82, 194-199.
48. Nomura N., Choi K. P., Yamashita M., Yamamoto H., Murooka Y., (1995), *J. Ferment. Bioeng.*, 79, 410-418.
49. Norm T., Husen B., Leenders F., Pelczar H., Beart J. L., Begue A., Flourens A. C., Adamski J., de Launoit Y., (1995), *Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 55, 541-548.
50. Ohta T., Fujishiro K., Yamaguchi K., Tamura Y., Aisaka K., Uwajima T., Hasegawa M., (1991), *Gene*, 103, 93-96.
51. Park C. H., Abbaszade I. G., Payne A. H., (1996), *Mol. Cell. Endocrinol.*, 116, 157-164.
52. Peltoketo H., Isomaa V., Maentausta O., Vihko R., (1988), *FEBS Letters*, 239, 73-77.
53. Plesiat P., Grandguillot M., Harayama S., Vragar S., Bri Y. M., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 7219-7227.
54. Purcell J. P., Greenplate J. T., Jennings M. G., Ryerse J. S., Pershing J. C., Sims S. R., Prinsen M. J., Corbin D. R., Tran M., Samms D., Stonard R. J., (1993), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 196, 1406-1412.
55. Rogerson F. M., LeHoux J. G., Mason J. I., (1995), *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 55, 481-487.
56. Sawetawan C., Carr B. R., McGee E., Bird I. M., Hong T. L., Rainey W. E., (1996), *J. Endocrinol.*, 148, 213-221.
57. Sedlaczek L., (1988), *Crit. Revs. Biotechnol.*, 7, 187-236.
58. Sih C. J., Wang K. C., Tai H. H., (1967), *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 1957-1958.
59. Shibata M., Sakaki T., Yabusaki Y., Murakami H., Ohkawa H., (1990), *DNA Cell Biology*, 9, 27-36.
60. Simard J., Sanchez R., Durocher F., Rheaume E., Turgeon C., Labrie Y., Luu-The V., Mebarki F., Morel Y., de Launoit Y., (1995), *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 55, 489-505.
61. Skalhegg B. A., (1974), *Eur. J. Biochem.*, 46, 117-125.
62. Smith L. L., (1984), *Biotechnology*, 6a, 33-75.
63. Smith M., Zahnley J., Pfeifer D., Goff D., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1425-1429.
64. Smith K. E., Latif S. A., Kirk D. N., (1996), *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 38, 249-256.

65. Somkuti G. A., Solaiman D. K. Y., Steinberg D. H., (1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 330-334.
66. Srivastawa A., Patil S., (1995), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11, 284-286.
67. Tanaka N., Nonaka T., Tanabe T., Yoshimoto T., Tsuru D., Mitsui Y., (1996), *Biochemistry*, 35, 7715-7730.
68. Viice M. W., Seckl J. R., Chapman K. E., (1996), *Gene*, 181, 233-235.
69. Waterman M. R., (1994), *J. Biol. Chem.*, 45, 27783-27786.
70. Wilmańska D., Sedlaczek L., (1988), *Acta Microbiol. Polon.*, 37, 45-51.
71. Wilmańska D., Dziadek J., Sajduda A., Milczarek K., Jaworski A., Murooka Y., (1995), *J. Ferment. Bioeng.*, 2, 119-124.
72. Yamashita M., Toyama M., Fujii I., Hirayama N., Murooka Y., (1997), *J. Biol. Chem.*, (in press).
73. Yoshida Y., Loper J., (1993), *ASM News*, 59, 546-547.
74. Yoshimoto T., Higashi H., Kanatani A., Lin X. S., Nagai H., Oyama H., Kurazono K., Tsuru D., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 2173-2179.
75. Zawrotny M. E., Hawkinson D. C., Blotny G., Pollack R. M., (1996), *Biochemistry*, 35, 6438-6442.

Autorzy artykułu serdecznie dziękują Panu prof. dr. hab. Leonowi Sedlaczkowi, Dyrektorowi Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN w Łodzi za życzliwą pomoc i cenne merytoryczne uwagi i sugestie w trakcie przygotowywania materiałów i redagowania ostatecznej wersji artykułu.

Genes and enzymes taking part in biotransformation of steroid ring structure

Summary

Biotransformation of steroid compounds involves two major steps: side chain degradation, which is poorly understood at the genetic level, and the degradation of steroid ring structure, which is better known.

This article describes well known molecular mechanisms of ring structure multistep biodegradation. Particular stress is put on the role of cholesterol oxidase, ketosteroid dehydrogenase, ketosteroid isomerase as the best analysed enzymes involved in steroid biotransformation.

Key words:

steroids, ring structure, enzymes, genes, biotransformation.

Adres do korespondencji:

Anna Brzostek, Pracownia Genetyki Drobnoustrojów, Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN, ul. Lodowa 106, 93-232 Łódź.