HUNPROTEXC

MIO-ENZIMEK SZERKEZETVIZSGÁLATA

POPPE LÁSZLÓ, BÓTA ATTILA, VÉRTESSY BEÁTA, MOLNÁR ZSÓFIA

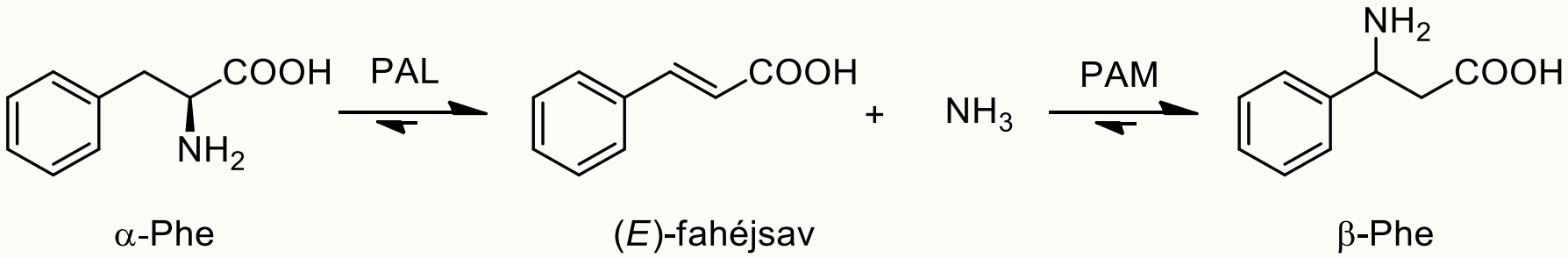
NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE

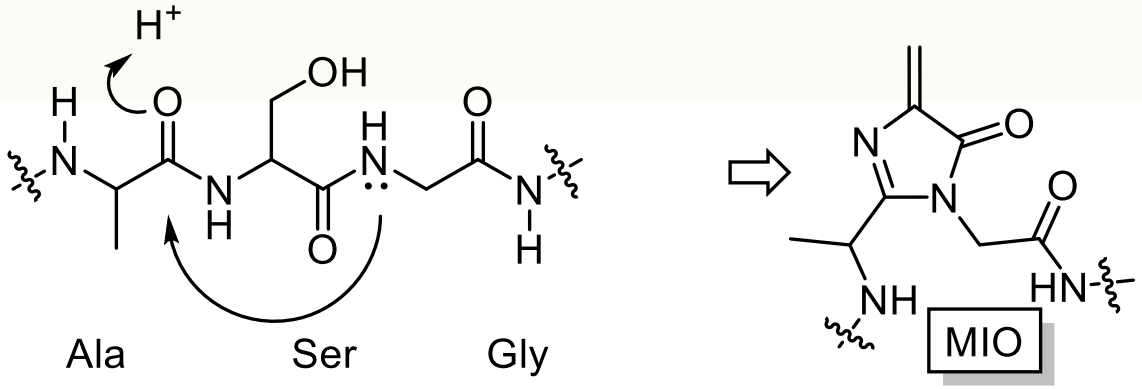
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

MIO-enzimek

- Ammónia-liáz (**AL**) illetve 2,3-aminomutáz (**AM**) aktivitással rendelkeznek
- Aromás aminosavak (Phe, Tyr és His) metabolizmusában vesznek részt



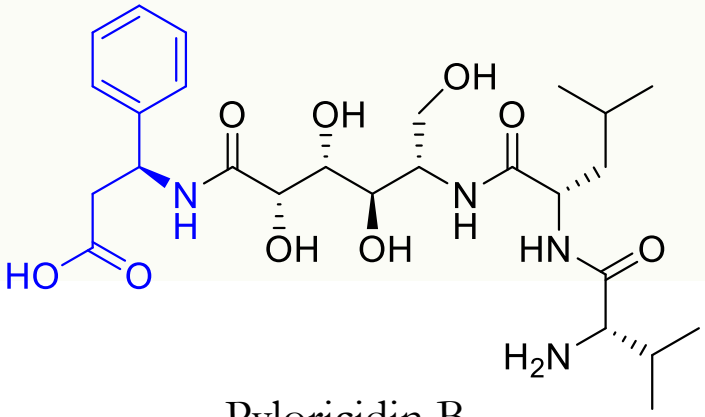
- Egyedi, három aminosavból autokatalitikusan képződő katalitikus csoport (3,5-dihidro-5-metilidén-4*H*-imidazol-4-on – **MIO**)



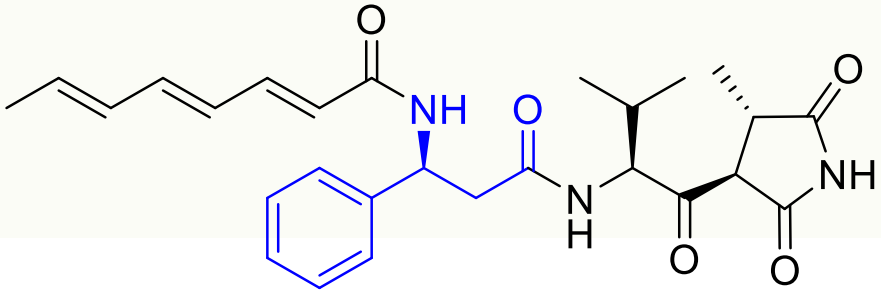
Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

MIO-enzimek jelentősége

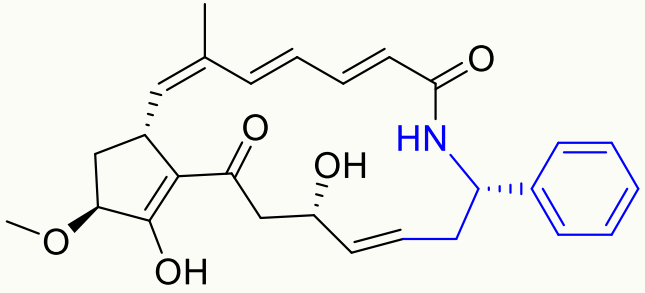
- Növények metabolizmusában és szekunder metabolitok előállításában fontos szerepet játszanak
- Fenilketonúriás páciensek kezelése PAL enzimszubsztitúció terápiával
- Biokatalizátorként felhasználhatóak értékes gyógyszermolekulák szintézisében



Pyloricidin B



Andrimid

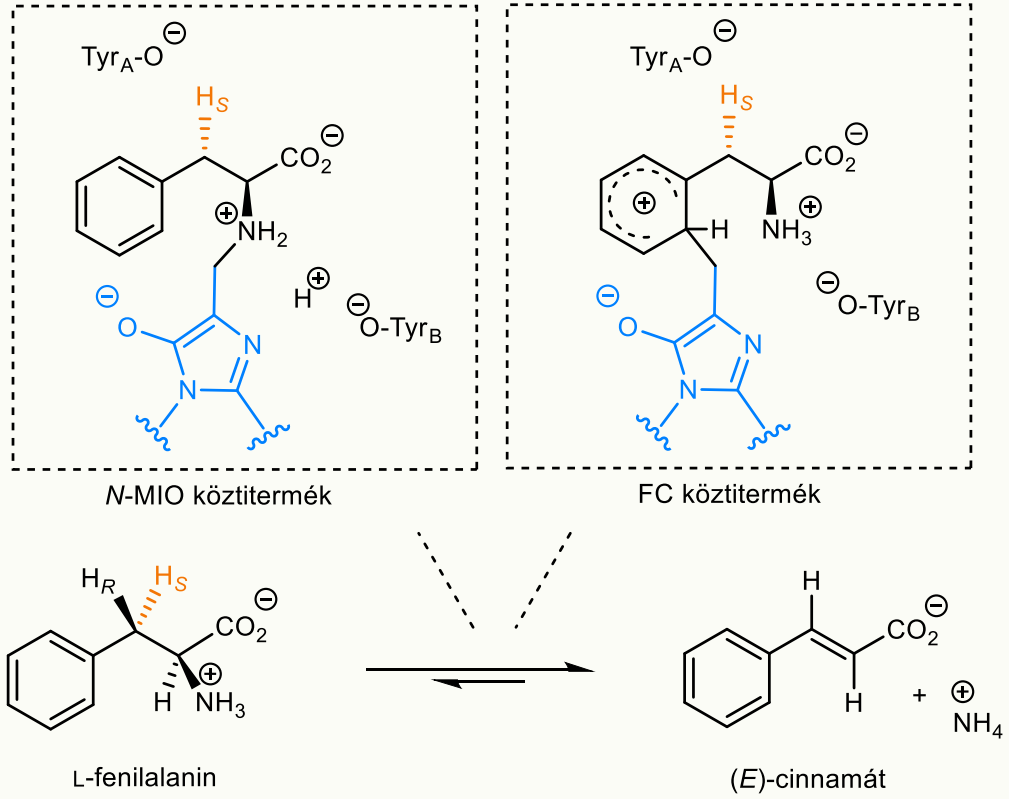


Hitachimycin

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

MIO-enzimek szerkezetének és mechanizmusának vizsgálata

- A mechanizmus még nem tisztázott pontosan
- Mitől lesz egy MIO-enzim ammónia-liáz vagy aminomutáz?
- Az együttműködésben alkalmazott vizsgálati módszerek:
  - Röntgenkrisztallográfia
  - Molekula modellezés
  - SAXS

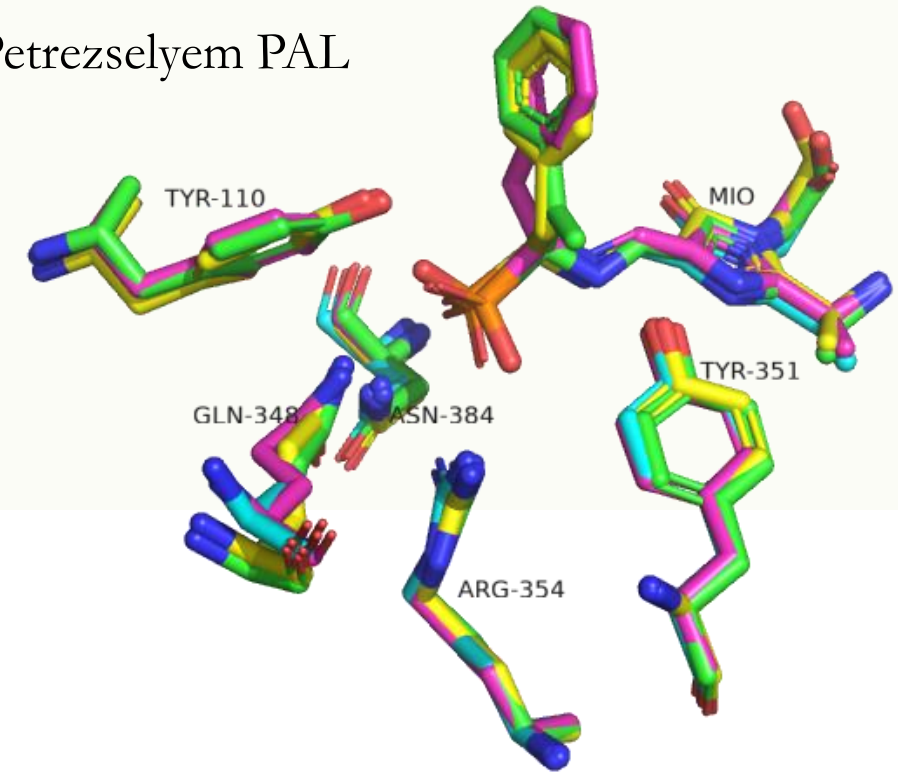


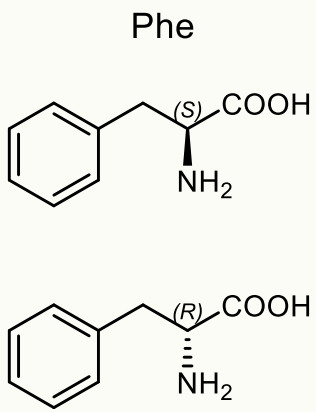
NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

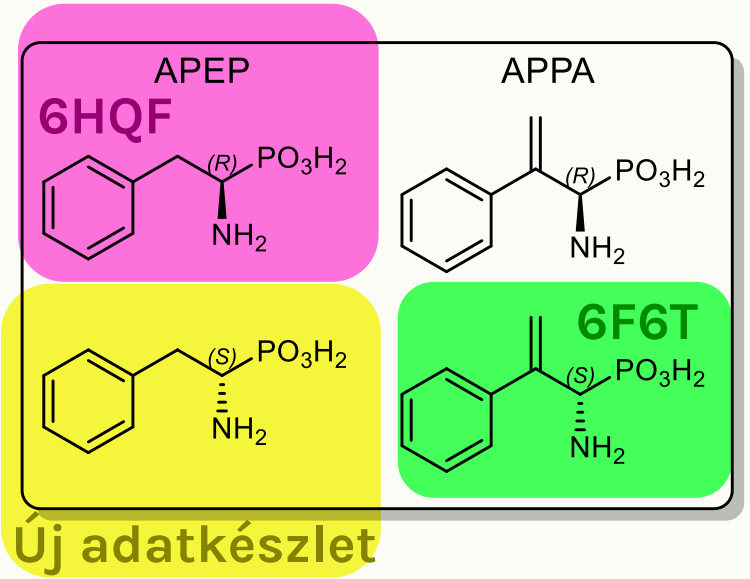
MIO-enzimek szerkezetvizsgálata röntgendiffrakcióval

- Különböző prokarióta és eukarióta MIO-enzimek szerkezetének meghatározása
- Petrezselyem PAL (**PcPAL**): szerkezetmeghatározás apo állapotban és szubsztrátanalóg inhibítorokkal

Petrezselyem PAL







6H2O - apo

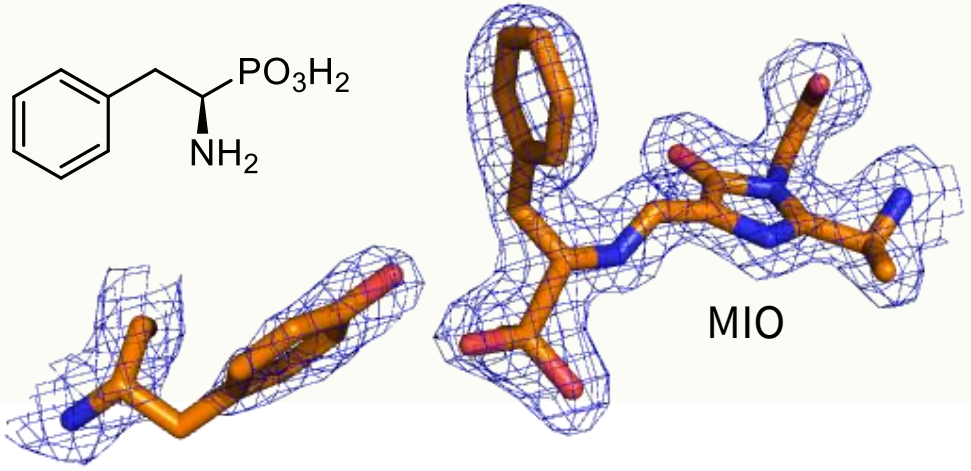
NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

Bata et al. : *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359*, 2109 – 2120; *Acta Cryst. A* **2018**, *74 (Suppl.)*, e37-e38.

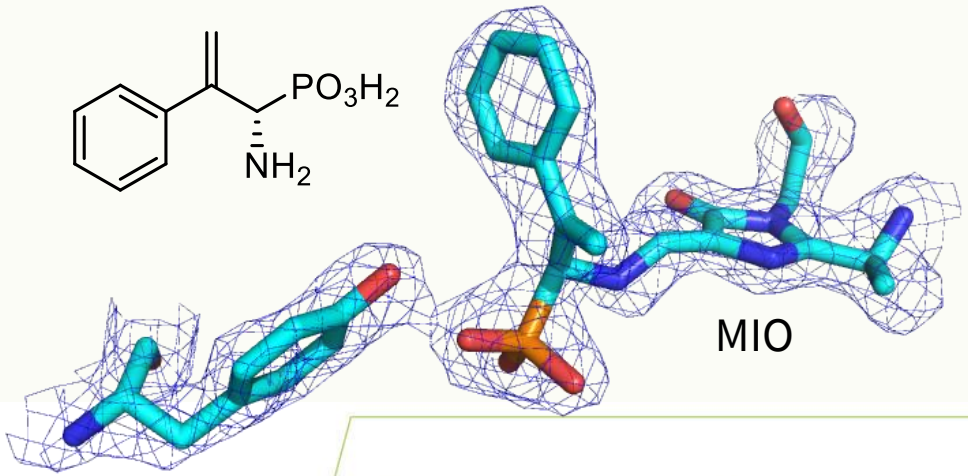
Inhibitorok kovalens kötődése a MIO-csoporthoz

- Katalitikus tirozin pozíciója (Tyr110) egyértelműen látszik az inhibítorokat tartalmazó szerkezetekben
- Eredményeink az *N*-MIO intermedieren át lejátszódó mechanizmust támasztják alá

(*R*)-APEP



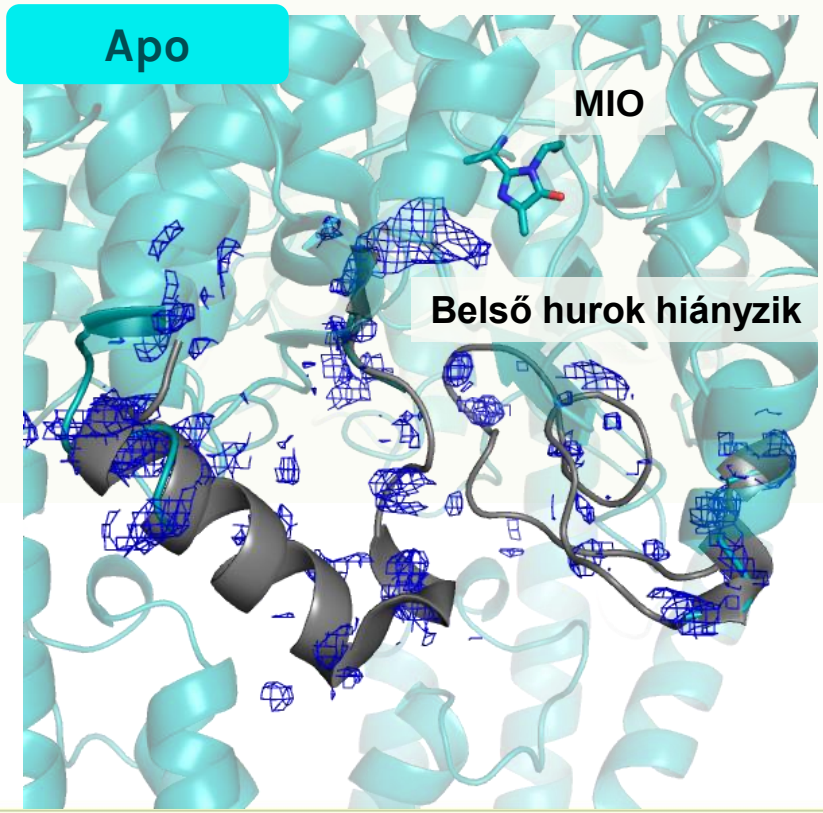
(*S*)-APPA

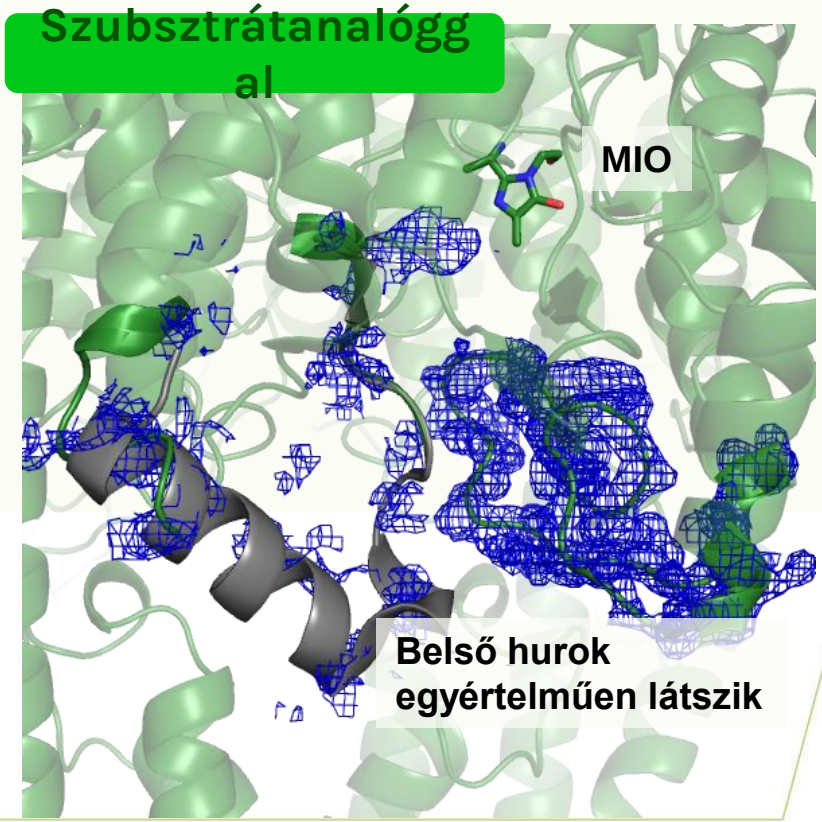


NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

Mozgékony katalitikus hurok elhelyezkedése

- Szubsztrát analóg – katalitikus **Tyr hurok** konformációt rögzíti
- Korábbi szerkezeti részleteket és mechanisztikus feltételezéseket megkérdőjelező eredmények





NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

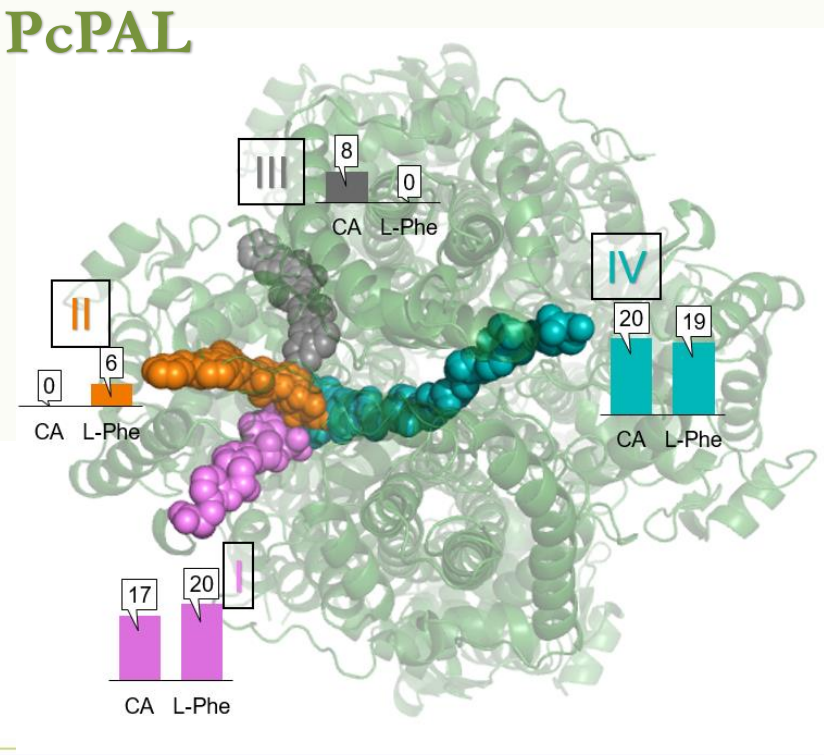
MIO-enzimek mechanizmusának vizsgálata molekuladinamikával

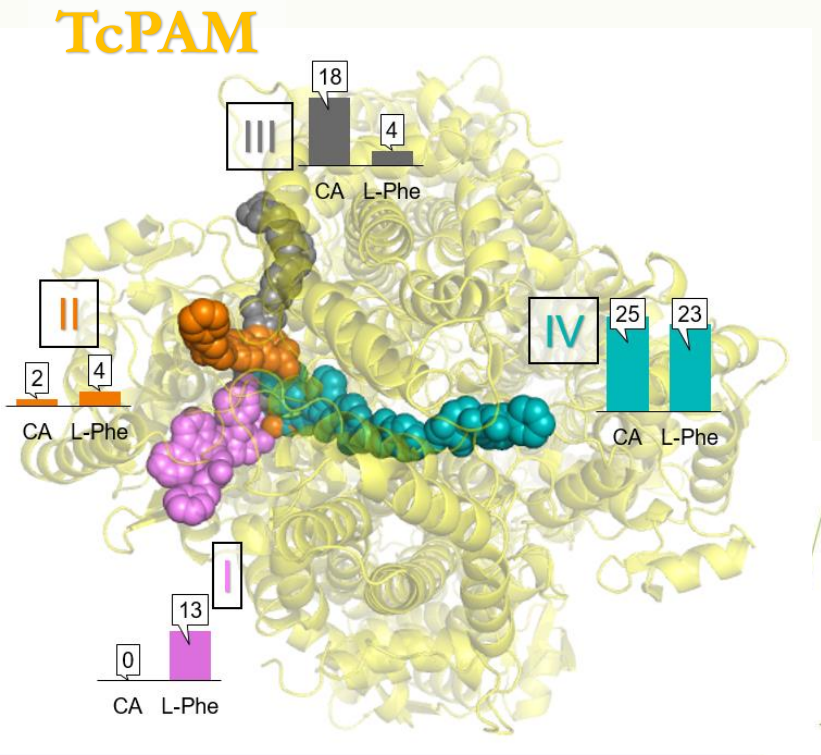
- Az általunk depozitált PcPAL szerkezetek alapján lehetőségünk nyílt **molekuladinamikai** vizsgálatok elvégzésére
- **PcPAL** és *Taxus canadensis* fenilalanin 2,3-aminomutáz (**TcPAM**) esetében vizsgáltuk a szusztrát és a termék ki- és bemeneti útvonalait **RAMD** (Random Acceleration Molecular Dynamics) módszer segítségével
- Hipotézis: a PAL-ok és PAM-ok között a flexibilis hurok mozgásában lehet különbség
- A MD vizsgálatok alapján eddig ismeretlen, **konzervált** szusztrát és a termék ki- és bemeneti **útvonalakat** tudtunk azonosítani

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

Konzervált szubsztát és termék be- és kimeneti útvonalak

- Az eukarióta MIO-enzimekben négy, konzervált közös résszel kezdődő útvonalat azonosítottunk
- Az azonosított útvonalak között nagy súllyal szerepel egy új, az enzimek *C*-terminális domén belsején át vezető be-/kimeneti útvonal

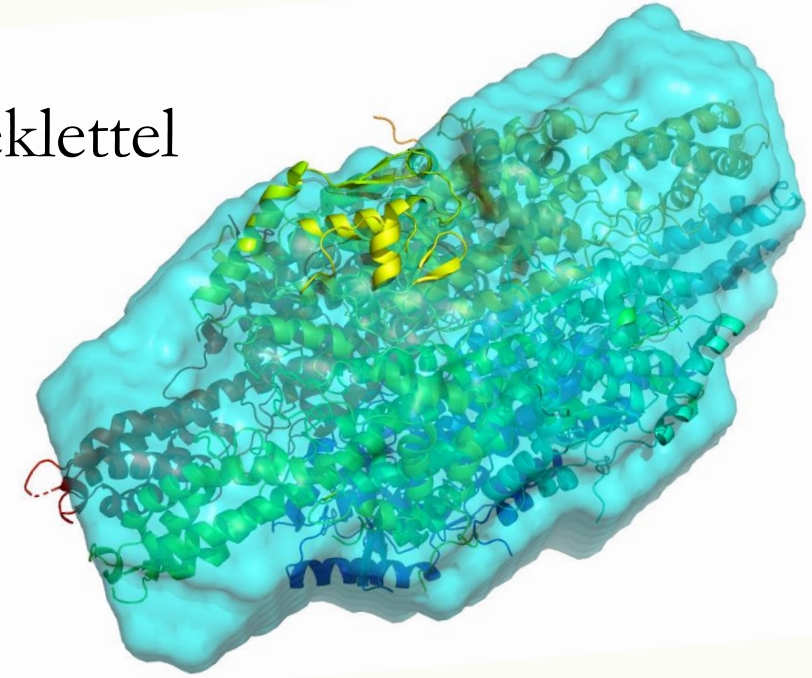


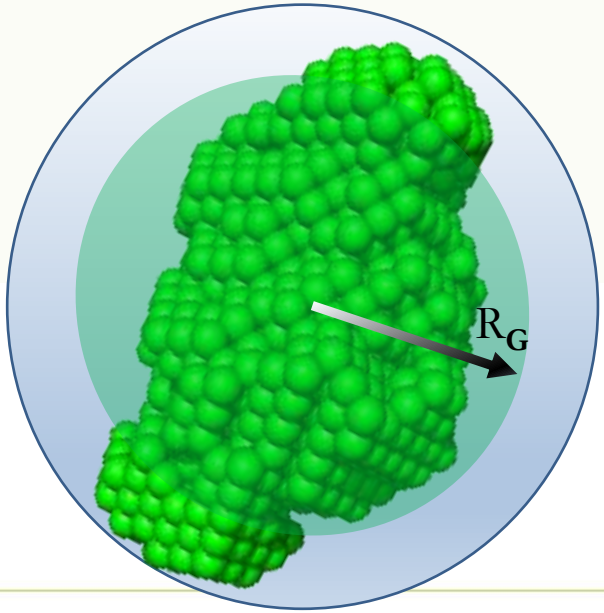


NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

MIO-enzimek szerkezetvizsgálata SAXS módszerrel oldatfázisban

- **Oldat fázisban** tudjuk vizsgálni a fehérjék alakját
- Méréseink alapján az **Rg** (Guinier radius) a hőmérséklettel kismértékű növekedést mutat
- Ez arra utal, hogy az enzim szerkezeti egységeinek pakolódása a növekvő hőmérséklettel "fellazul"





R_G = 4.66 +/- 0.05 nm 20°C-on
4.70 +/- 0.27 nm 50°C-on
4.77 +/- 0.71 nm 70°C-on

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

További terveink

- Új MIO-enzimek azonosítása és izolálása
- További MIO-enzimek szerkezetének meghatározása
- Ammónia liázok és aminomutázok közötti különbségek vizsgálata
- Enzimek aktivitásának hőmérsékletfüggése az alak viszonyában
- Enantioszelektivitás vizsgálatok (értelmezés, megváltoztatás)

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

UNIVERSITAS BUDAPESTINENSIS DE ROLANDO EÖTVÖS NOMINATA

1635

MŰEGYETEM 1782

mta ttk

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE

AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM