HUNPROTEXC

MIO-ENZIMEK SZERKEZETVIZSGÁLATA

POPPE LÁSZLÓ, VÉRTESSY BEÁTA, BÓTA ATTILA, MOLNÁR ZSÓFIA, BATA ZSÓFIA, MIHÁLY JUDITH

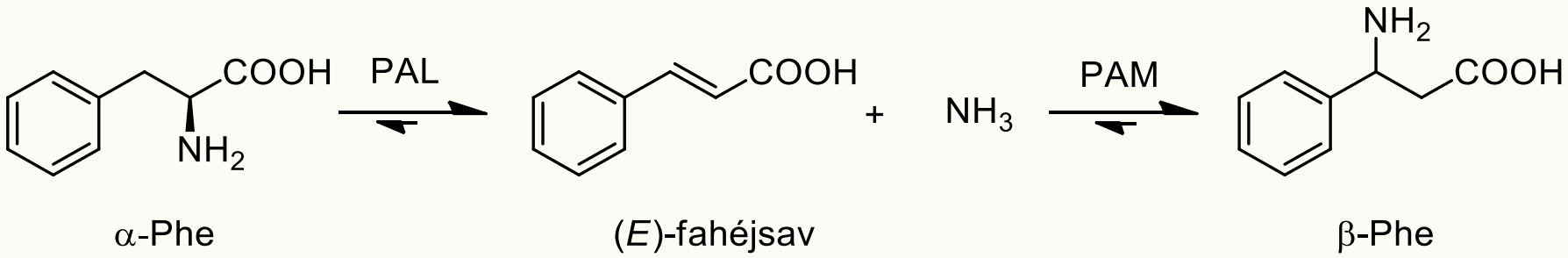
NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE

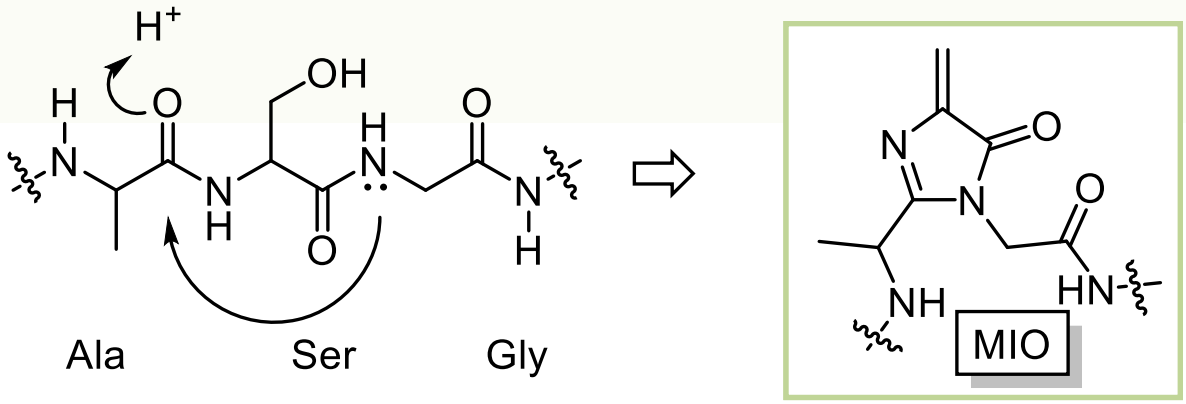
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

MIO-enzimek

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



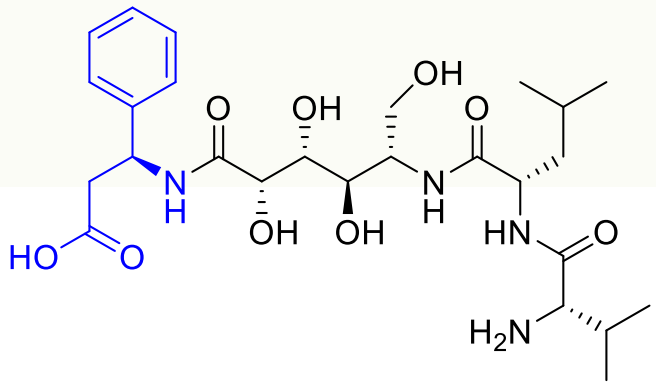
- Egyedi, három aminosavból autokatalitikusan képződő katalitikus csoport (3,5-dihidro-5-metilidén-4*H*-imidazol-4-on – **MIO**)



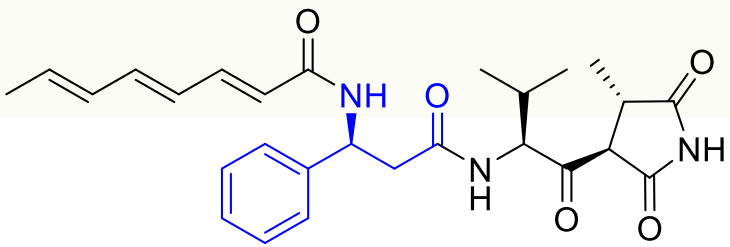
Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

MIO-enzimek jelentősége

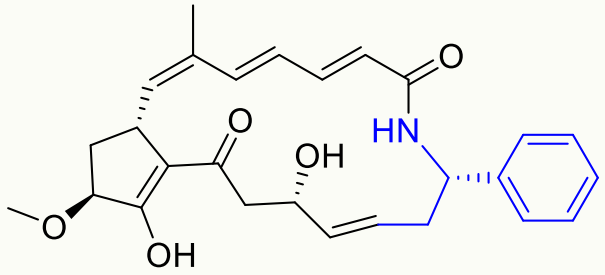
- PAL: fontos szerep növények metabolizmusában és szekunder metabolitok előállításában; PAM: szekunder metabolitok képzése
- Fenilketonúriás páciensek kezelése PAL enzimszubsztitúciós terápiával
- A MIO-enzimek biokatalizátorként felhasználhatóak értékes gyógyszermolekulák szintézisében: **PAL** (**α-Phe** származékok és analogonok), **PAM** (**β-Phe** származékok és analogonok)



Pyloricidin B



Andrimid

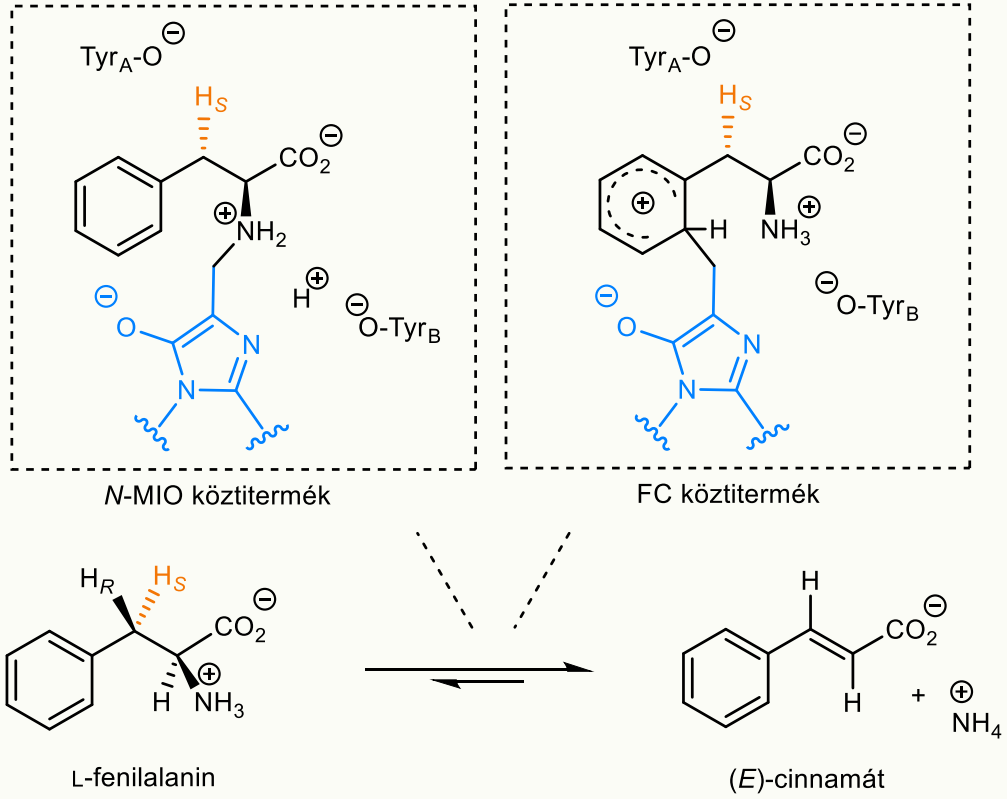


Hitachimycin

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

MIO-enzimek szerkezetének és mechanizmusának vizsgálata

- A mechanizmus első részének pontos tisztázása
- Mitől lesz egy MIO-enzim ammónia-liáz vagy aminomutáz?
- Az együttműködésben alkalmazott vizsgálati módszerek:
  - Röntgenkrisztallográfia
  - Molekulamodellezés
  - SAXS
  - Hőfokfüggő IR

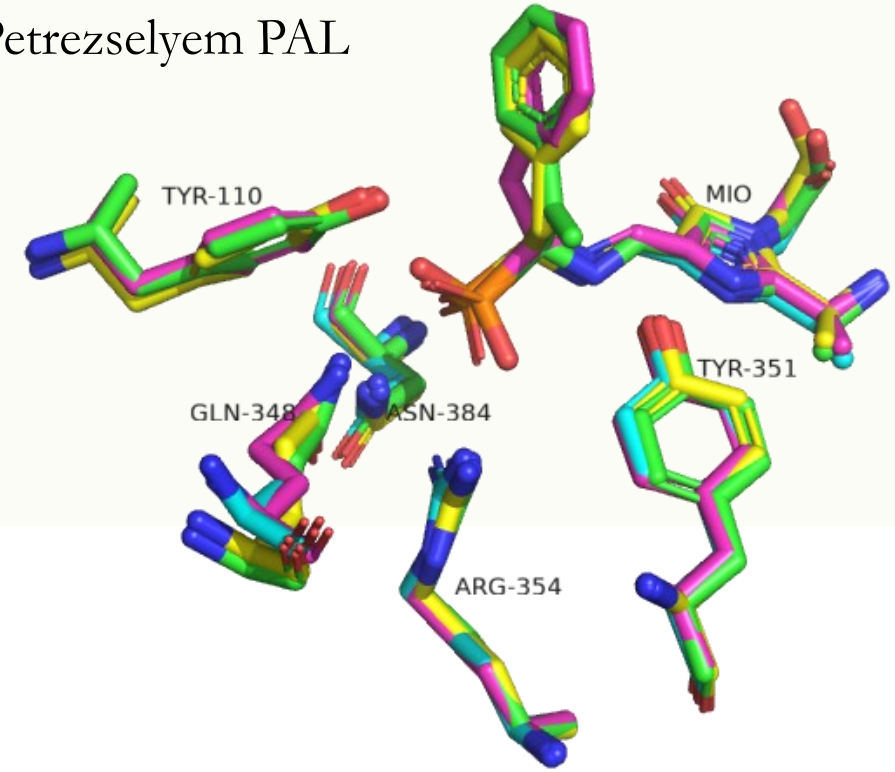


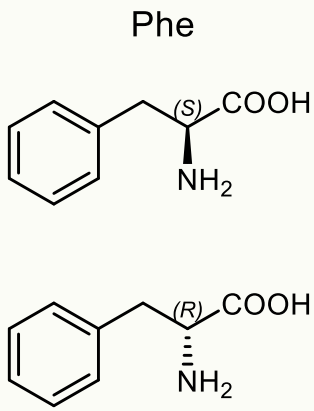
NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

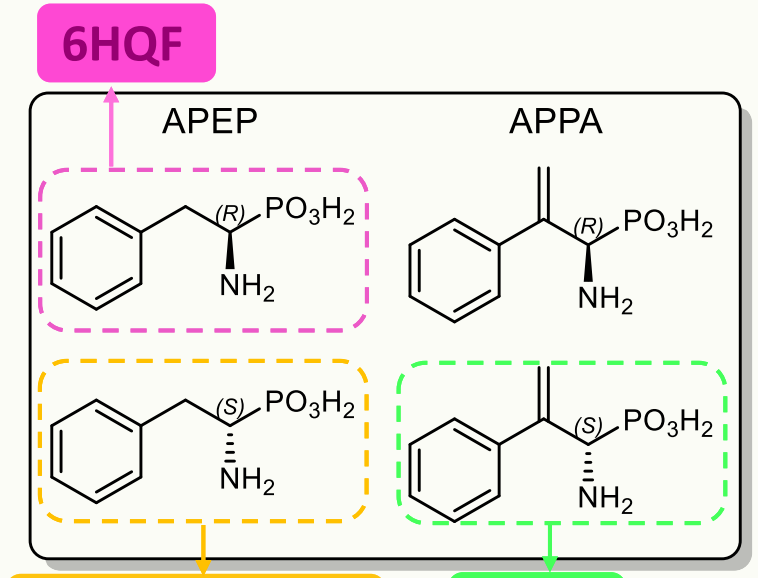
MIO-enzimek szerkezetvizsgálata röntgendiffrakcióval

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

Petrezselyem PAL







6H2O - apo

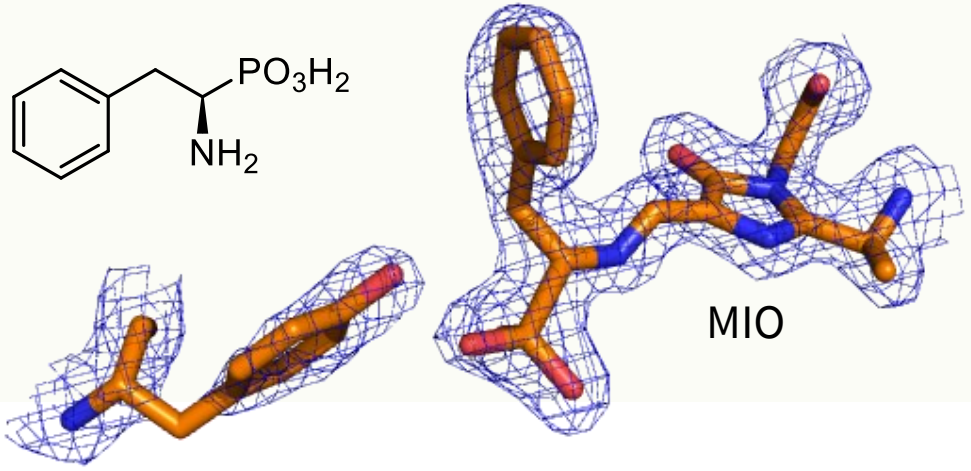
Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

Bata et al. : *Adv. Synth. Catal*. **2017**, *359*, 2109 – 2120; *Acta Cryst. A* **2018**, *74 (Suppl.)*, e37-e38; *ACS Catal*. **2021**, *11*, 4538 – 4549.

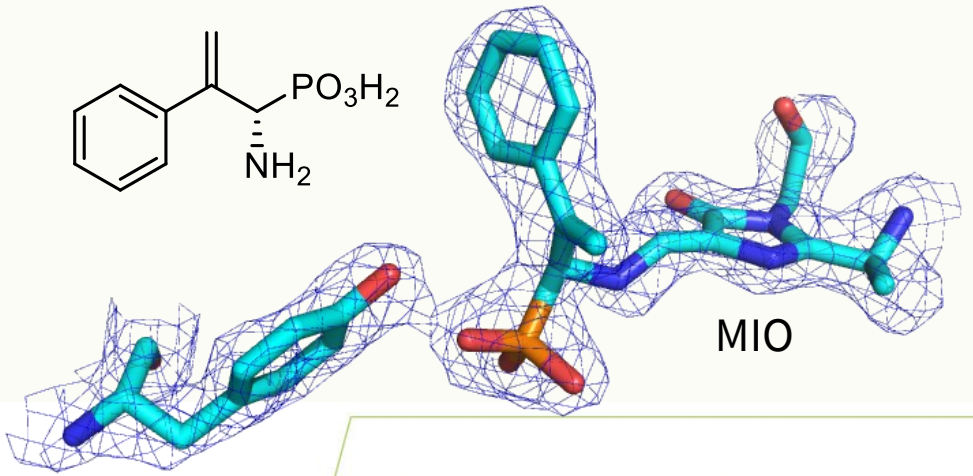
Inhibitorok kovalens kötődése a MIO-csoporthoz

- **Katalitikus tirozin pozíciója (Tyr110) egyértelmű** az inhibítor-PcPAL szerkezetekben
- Krisztallográfiai adataink az ***N*-MIO mechanizmust támasztják alá**

(*R*)-APEP



(*S*)-APPA

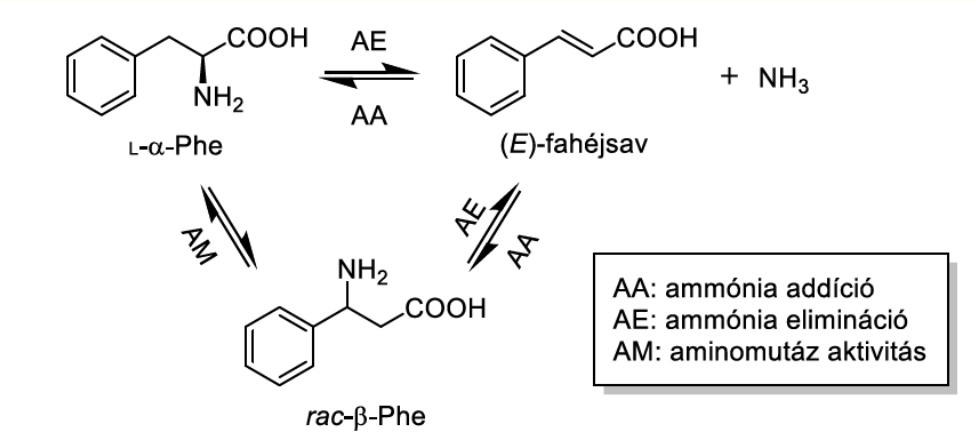


NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

Bata et al. : *ACS Catal*. **2021**, *11*, 4538 – 4549.

MIO-enzimek mechanizmusának vizsgálata molekuladinamikával

- A PcPAL szerkezetek alapján **molekuladinamikai** vizsgálatok
- ***Eddigi hipotézisek***: a PAL / PAM különbség oka az aktív hely flexibilis Tyr hurok eltérő mozgásában lehet
  PAL – nagyobb mozgás: „kinyílás”
  ⇕
  PAM – kisebb flexibilitás:
  az (*E*)-cinnamát intermedier



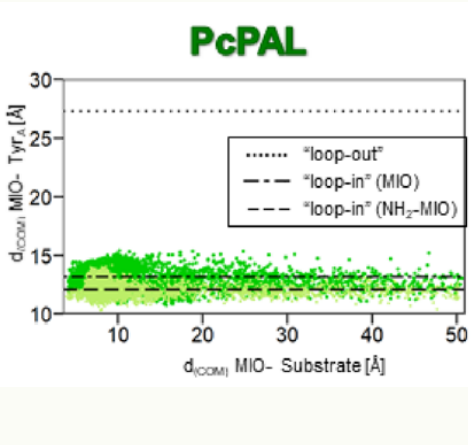
- **PcPAL** és *Taxus canadensis* fenilalanin 2,3-aminomutáz (**TcPAM**): a szusztrát és termék ki- és bemeneti útvonalak vizsgálata **RAMD** (*Random Acceleration Molecular Dynamics*) módszerrel
- RAMD és CAVER (fehérje-üregkereső algoritmus) vizsgálatok: **konzervált** szusztrát és a termék ki- és bemeneti **útvonalak** (köztük eddig ismeretlen utak) azonosítása

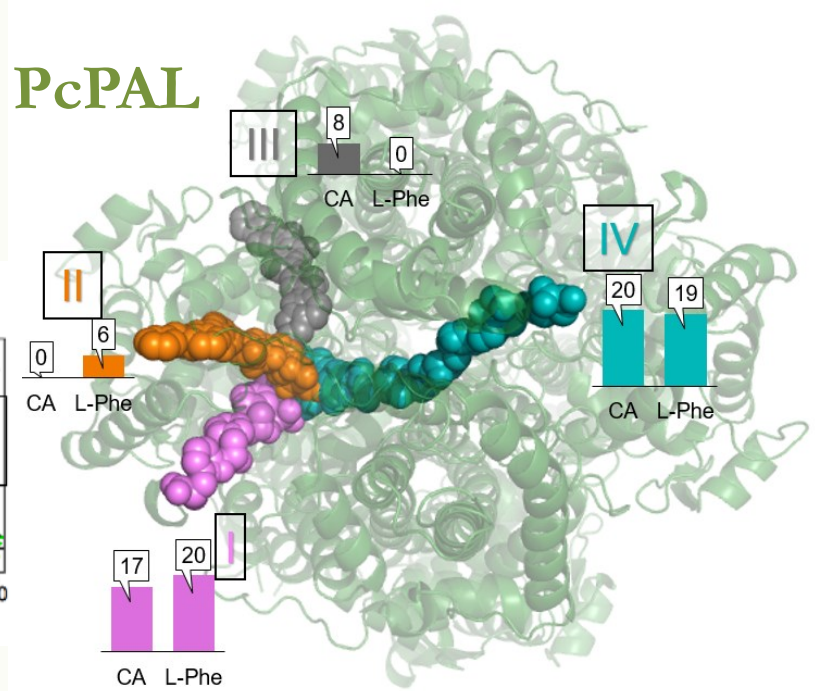
NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

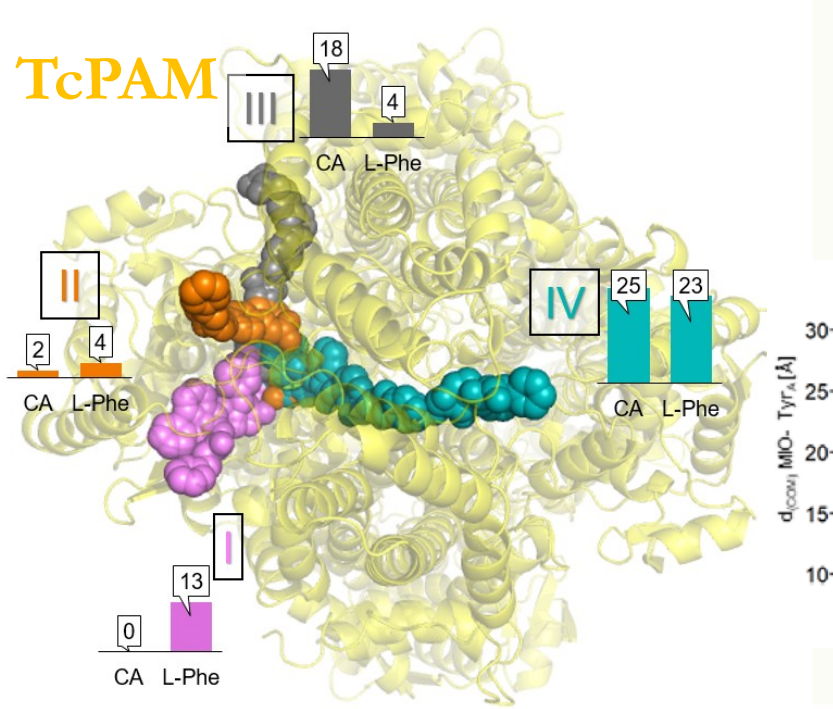
Bata et al. : *ACS Catal*. **2021**, *11*, 4538 – 4549.

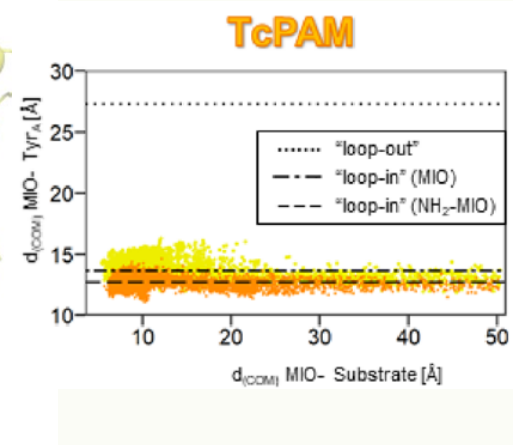
PAL / PAM szubszrát és termék be- és kimeneti útvonalak

- Nagy súlyú, új, a *C*-terminális doménen át vezető be-/kimeneti útvonal (**IV**)









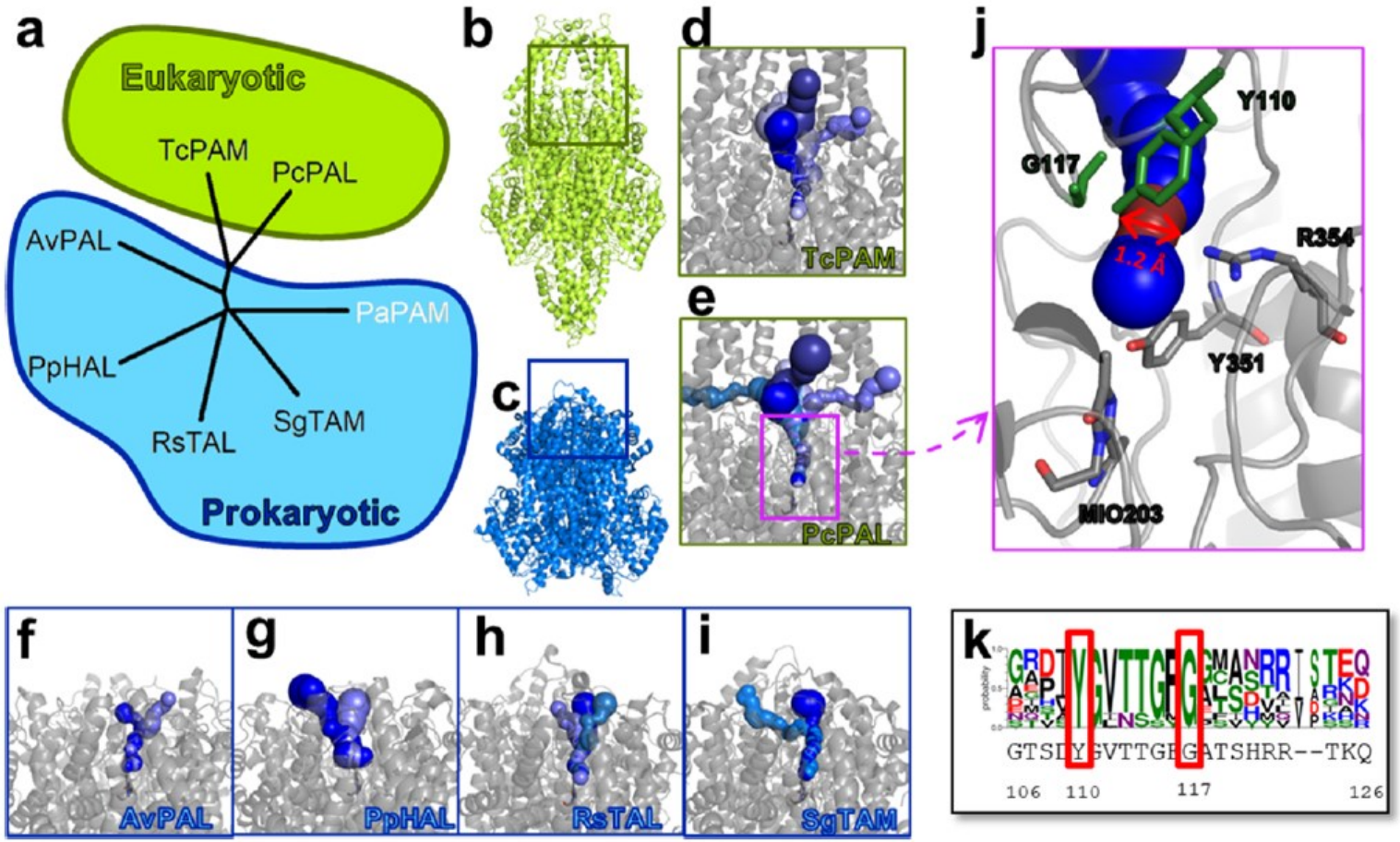
- A szimulációk során ***nem történt*** a katalitikus tirozin ***nagy mértékű mozgása a TcPAM esetében sem***

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

Bata et al. : *ACS Catal*. **2021**, *11*, 4538 – 4549.

MIO-enzimek: **konzervált** szubszrát és termék be- és kimeneti útvonalak

- MIO-enzimek CAVER (fehérje-üregkereső algoritmus) vizsgálata: az eukarióta MIO-enzimek négy útvonalának **közös kezdőrésze konzervált**



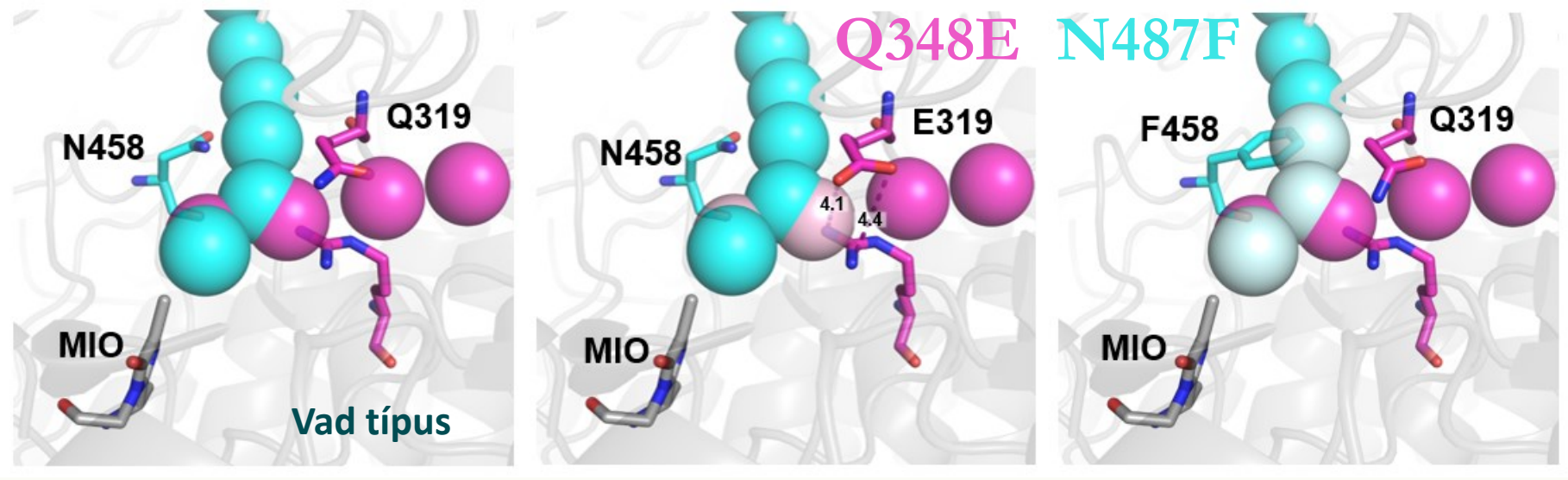
- Az (*S*)-szelektív **PaPAM** (*Pantonea agglomerans*) a leginkább zárt MIO-enzim
- A **PaPAM** zártságát okozó aminosav oldalláncok bevitele a többi MIO-enzimbe

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

Bata et al.: *ACS Catal*. **2021**, *11*, 4538 – 4549.

TcPAM: Konzervált utak részleges zárása, egyszeres és kétszeres mutánsok

- **TcPAM**: az (*R*)-szelektív aminomutáz **Q319E**, **N458F** egyszeres, valamint **Q319E**+**N458E** kettős mutánsainak létrehozása



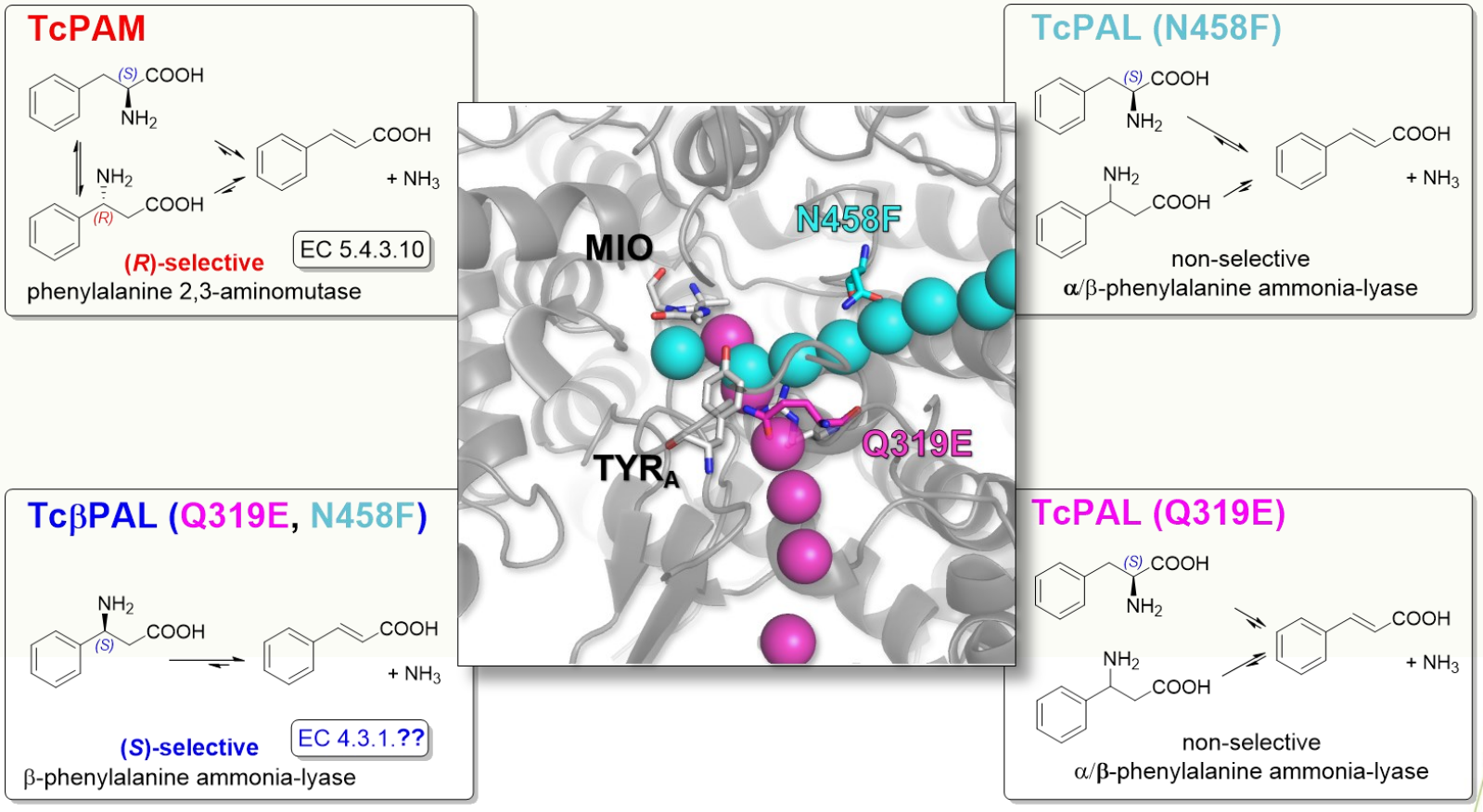
NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

Bata et al. : *ACS Catal*. **2021**, *11*, 4538 – 4549.

MIO-enzimek: **konzervált** szubszrát és termék be- és kimeneti útvonalak

TcPAM:

(*R*)-szelektív 2,3-aminomutáz



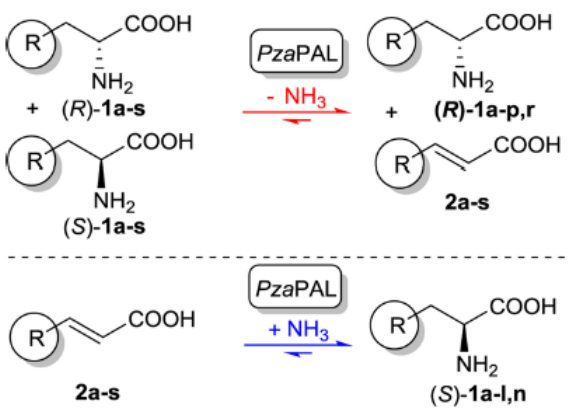
- **Egyszeres mutánsok**: enantiomerszelektivitás és reakciósebesség csökken, megszűnt az aminomutáz aktivitás

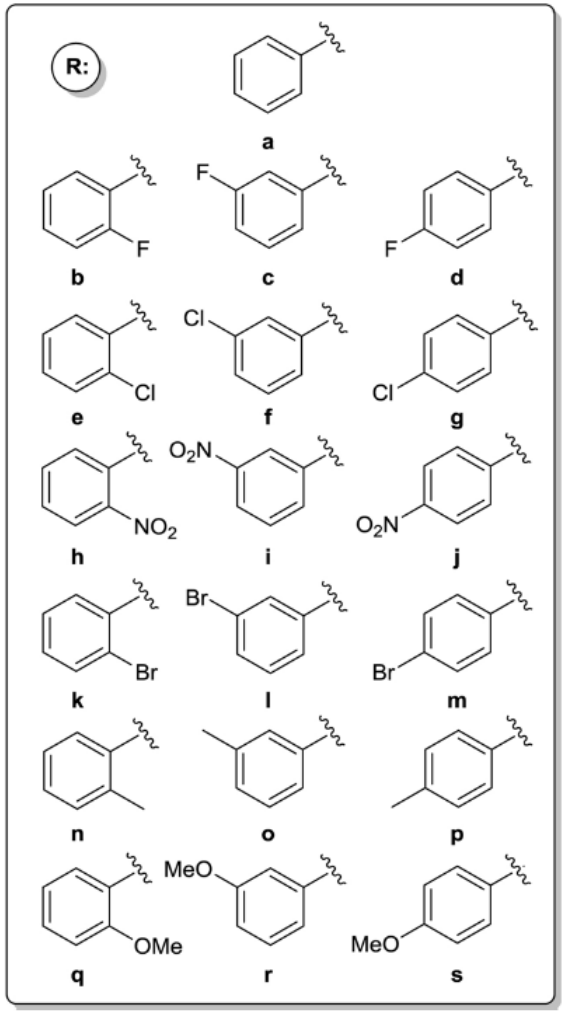
Dupla mutáns:

(*S*)-szelektív β-liáz, megfordult enantiomerpreferencia

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

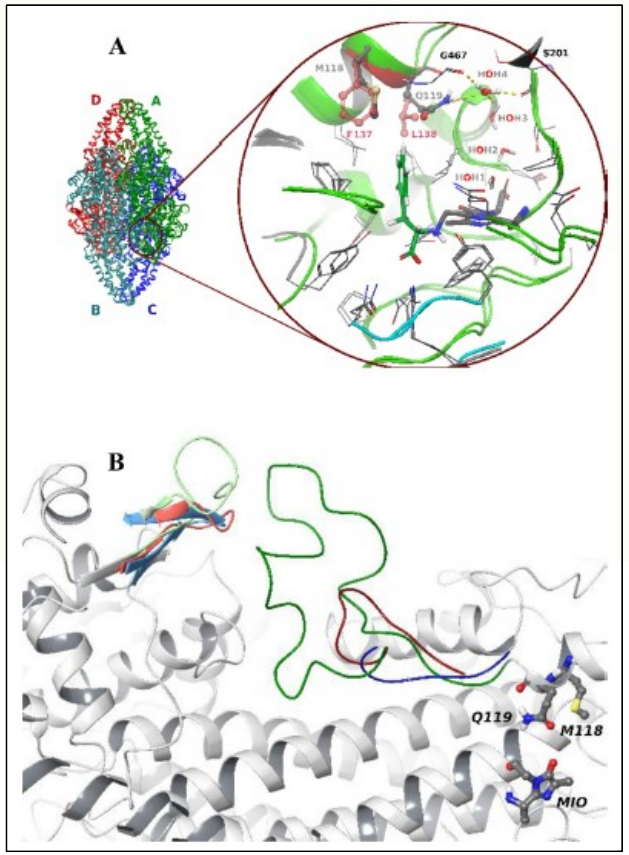
Bata et al. : *ACS Catal*. **2021**, *11*, 4538 – 4549.

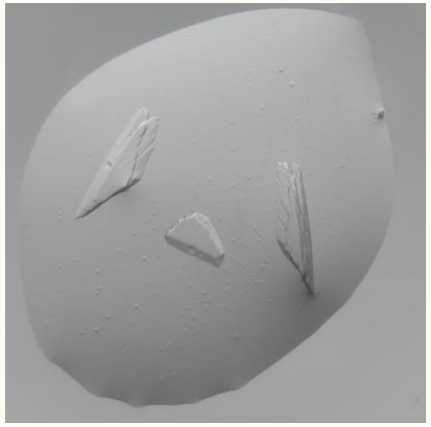


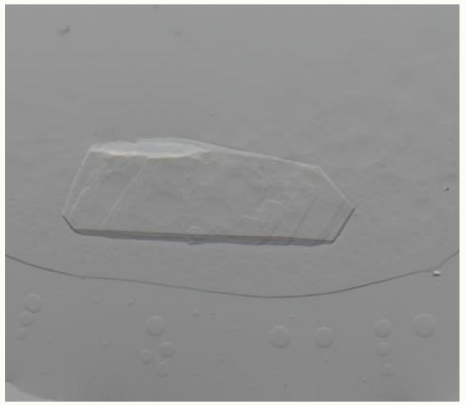


További MIO-enzimek: *Pseudozyma antarctica* PAL

- Különböző MIO-enzimek azonosítása bioinformatikai úton
- ***Pseudozyma antarctica* PAL**: karakterizálás / kristályosítás





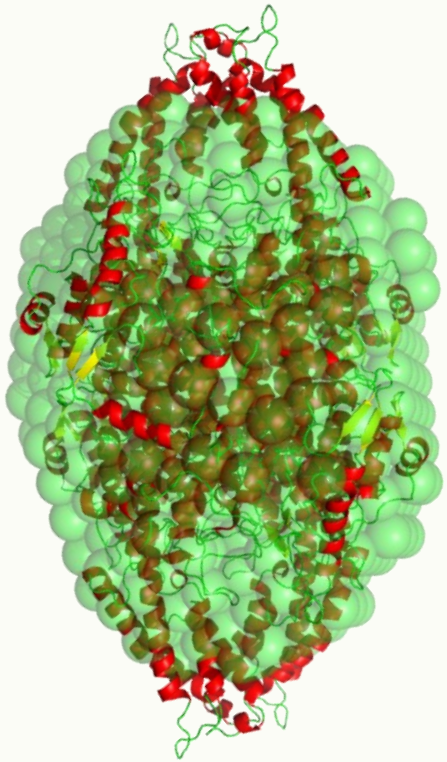


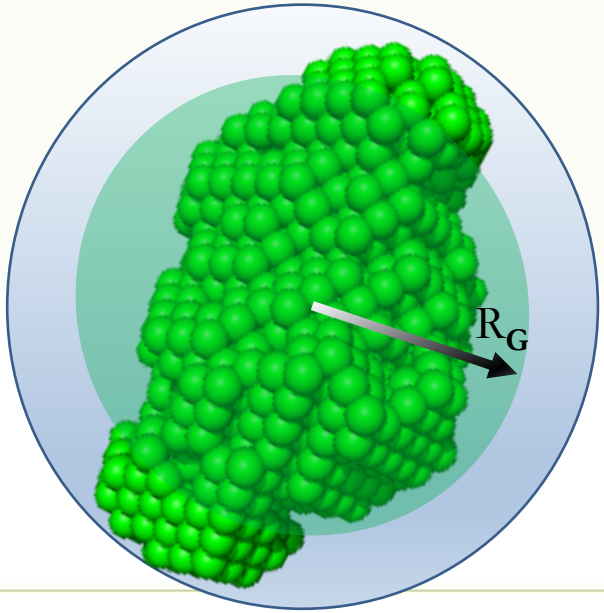
NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

Varga et al.: *Cat. Today* **2021**, *366*, 185 – 194.

PcPAL 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 egységei növekvő hőmérséklettel "fellazulnak"



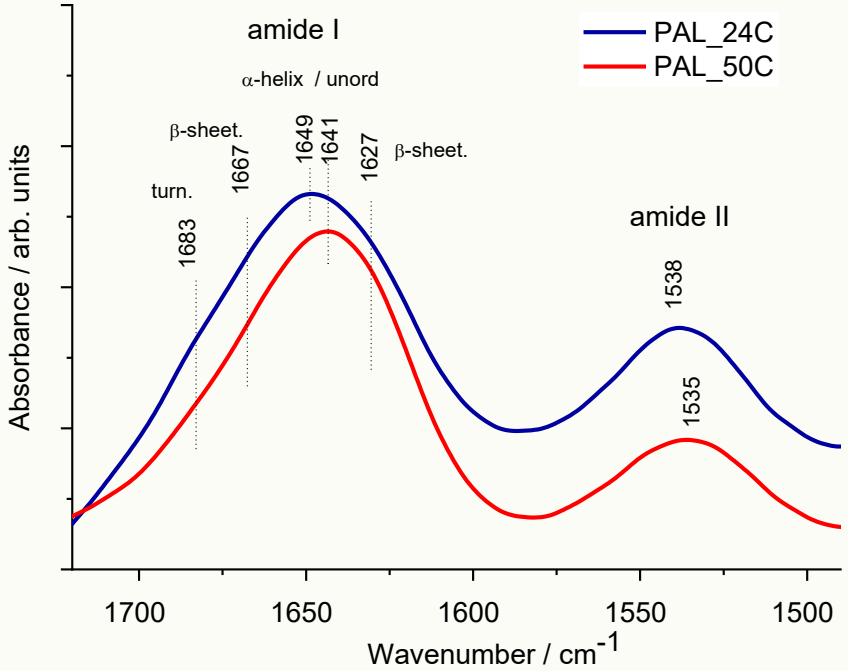


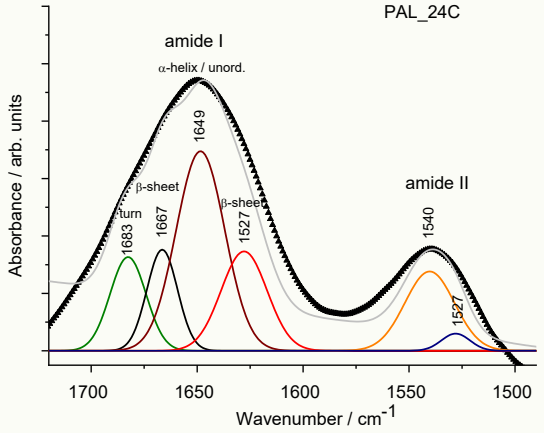
R_G = 4.66 +/- 0.05 nm 20°C-on
4.70 +/- 0.27 nm 50°C-on
4.77 +/- 0.71 nm 70°C-on

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

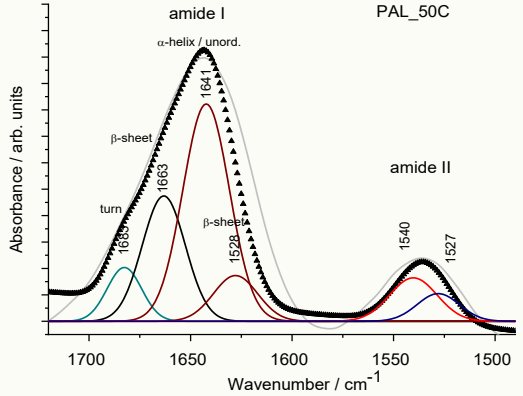
PcPAL hőfokfüggő IR vizsgálata oldatfázisban - konformációváltozás

IR: a **PcPAL** szekunder konformációs elemek hőmérsékleti változásának vizsgálata (az amid I sáv változása)





Következtetések: csúcsfelbontás alapján



- **24 °C**: 3 konformációs állapot van jelen (**turn, β, α**) 4 rezgési sáv alapján
- **50 °C**: a rezgési sávok eltolódnak és rendezetlenebb forma jön létre (**β** aránya megnő az **α**-hoz viszonyítva, amid II sáv 2 domináns komponensből áll) ⇒ *C-terminális domén rendezetlensége*: **IV út gátlás**

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

Összefoglalás, további tervek

- MIO-enzimek szerkezetének meghatározása (PcPAL)
- Ammónia liázok és aminomutázok közötti különbségek vizsgálata
- Enantiomer szelektivitás vizsgálatok (értelmezés, megváltoztatás)
- Új MIO-enzimek azonosítása és izolálása, kristályosítása (PzaPAL)
- PcPAL aktivitás - alak hőmérsékletfüggése (SAXS, IR)

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

UNIVERSITAS BUDAPESTINENSIS DE ROLANDO EÖTVÖS NOMINATA · 1635

MŰEGYETEM 1782

ttk

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE

AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM