



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

---

BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM  
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR  
OLÁH GYÖRGY DOKTORI ISKOLA

## **Szerkezet funkció összefüggések vizsgálata hidroxinitril liázok és MIO-t tartalmazó I-es típusú liáz szerű enzimek esetében**

Tézisfüzet

**Bata Zsófia, MSc**

Témavezető: **Prof. Poppe László, PhD, D.Sc.**

Konzulens: **Prof. Beáta G. Vértessy, PhD, D.Sc.**

Szerves Kémia és Technológia Tanszék



Budapest

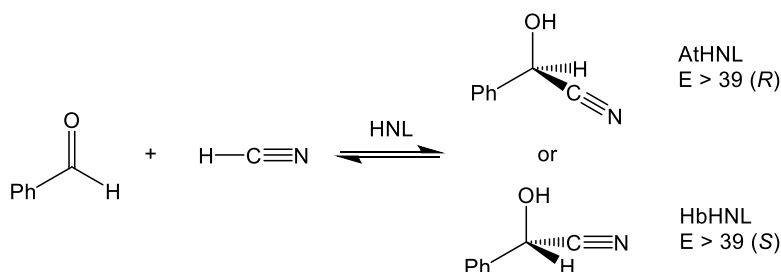
2019

# 1 Bevezetés

A biokatalizátorok alkalmazása a vegyiparban napjainkban valódi alternatívaként jelenik meg a hagyományos fém és szerves alapú katalízis mellett, zöldebb, hatékonyabb és fenntarthatóbb szintetikus folyamatok eredményezve <sup>1</sup>. Az itt bemutatott eredmények, két ipari biokatalizátorként alkalmazható fehérjecsalád, a hidroxinitril liázok és a MIO enzimek esetében a szerkezet-funkció összefüggésének felismerését célozzák, hogy megértsük ezen fehérje szerkezete hogyan határozza meg a szubsztrát kötő konformációját és hogyan képes a fehérje környezet az átmeneti állapot energiájának csökkentésével a kémiai reakciók enantioszelektív katalízisére.

## 1.1 Hidroxinitril liázok

Hidroxinitril liázok (HNL-ek, EC 4.1.2.X, X= 10, 11, 46, 47) a növényvilágban védekezésre használt enzimek, amelyek hidrogén cianid eliminációját katalizálják cianohidrinekből. A felszabaduló hidrogén-cianid megöli vagy elijeszti a növények ragadozóit. Úgy becsülik, hogy 3 000 növény faj, nagyon változatos filogenetikai osztályokból, használja a cianogén védekezést <sup>2</sup>. Szintetikus alkalmazásokban, a kémikusok a fordított irányú reakciót használják; a hidrogén-cianid enantioszelektív addícióját karbonil vegyületekre (1.ábra).



**1. ábra.** HNL katalizált reakció sémája. A természetben reakció a cianid elimináció irányába van eltolva, míg a szintetikus alkalmazásokban az enantioszelektív hidrogén-cianid addíciót használjuk ki karbonil vegyületekre, mint például az ábrán bemutatott benzaldehyd.

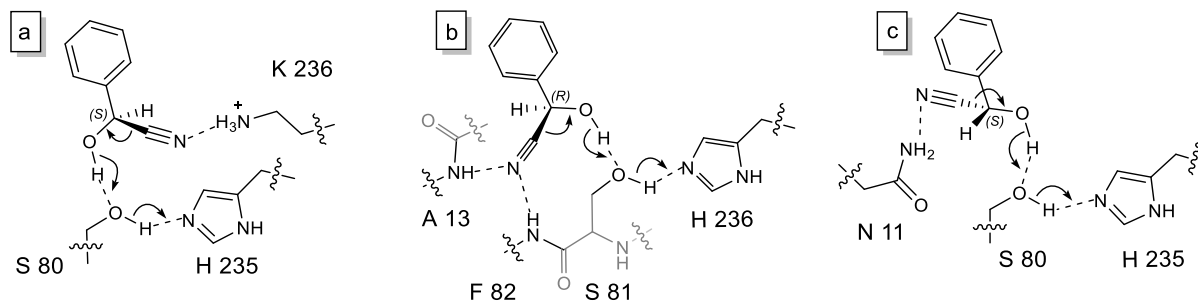
A HNL funkció hat különböző enzim családban is kialakult, ami arra enged következtetni, hogy a cianohidrin bontás egy kémiailag egyszerű feladat. A reakció végbemeneteléhez csupán egy katalitikus bázis és a ciano csoportot stabilizáló pozitív vagy parciálisan pozitív töltés szükséges. A fehérje szerepe főként az enantioszelektív környezet biztosítása. A HNL funkció több alkalommal is kialakult az észterázokhoz hasonló  $\alpha/\beta$ -hidroláz feltekeredésű fehérjék között. A gumifa (*Hevea brasiliensis*, HbHNL) kódol egy (S)-szelektív HNL-t <sup>3</sup>, míg a lúdfű

1 Bornscheuer, U. T. et al. *Nature* **485**, 185–194 (2012).

2 Dadashpour, M. & Asano, Y. *ACS Catal.* **1**, 1121–1149 (2011).

3 Selmar, D., at al. *Physiol. Plant.* **75**, 97–101 (1989).

(*Arabidopsis thaliana*, AtHNL) kódol egy (*R*)-szelektív HNL-t<sup>4</sup>. Különböző reakció mechanizmusok teszik lehetővé, hogy az AtHNL és az HbHNL tükörképi enantiomerek reakcióját katalizálják (2. ábra). Magas fokú szekvencia hasonlóság (73%) igazolja, hogy az HbHNL és az AtHNL közeli evolúciós kapcsolatban állnak, különböző biológiai funkciójuk és a tükörképi enantioszelektivitásuk ellenére.



**2. ábra.** A szubsztrát mandelonitril eltérő katalitikusan kompetens orientációjában eltérő kölcsönhatásokat alakít ki a távozó ciano csoport ezáltal az enzim másik enantiomer reakcióját katalizálja. **a.** A klasszikus HbHNL mechanizmus szerint a Lys236  $\epsilon$ -ammónium csoportja stabilizálja a távozó cianidot. Ez az enzim az (*S*)-enantiomer reakcióját katalizálja<sup>5</sup>. **b.** Az AtHNL reakció mechanizmusában, az oxianion luk-at kialakító két főlánc *N*-*H* csoport stabilizálja a távozó cianidot. Ez az enzim az (*R*)-enantiomer reakcióját katalizálja<sup>6</sup>. **c.** Az HbHNL-ből kialakított (*S*)-szelektív összetett aktív centrumú enzimekben Asn11  $\delta$ -amid *N*-*H* csoportja stabilizálja a távozó cianidot, az újonnan javasolt mechanizmus szerint

Egy ős enzim rekonstrukció azonosította az (*R*)- és (*S*)-HNL-ek illetve a közeli rokon észterázok legközelebbi közös őst. Ezekben a növényi észterázokban és hidroxinitril liázokban legalább 40%-os szekvencia azonosság figyelhető meg, ami lehetővé tette az ős enzim szekvenciák kikövetkeztetését. Négy feltételezett ős fehérjét hoztak létre: EST1, EST2, EST3 és HNL1, amelyek vélhetően a különböző funkciók közötti elágazási pontokban találhatóak (6. ábra a panelja további magyarázattal szolgál)<sup>7</sup>. Az EST3mL<sup>8</sup> mind észteráz mind HNL aktivitással rendelkezett. EST3mL szekvenciája 58%-ban azonos az HbHNL-el és 78%-ban azonos az AtHNL-el, ez utóbbival számos, az aktív helyet felépítő aminosavak is megegyeznek mint a Met236 vagy az Asn11. Az AtHNL-hez hasonlóan az EST3mL is (*R*)-szelektivitást mutatott, azonban csak nagyon kis mértékben ( $E = 6.7$ ).

4 Andexer, J. N. *et al. ChemBioChem* **13**, 1932–1939 (2012).

5 Gruber, K., *et al. J. Biol. Chem.* **279**, 20501–20510 (2004).

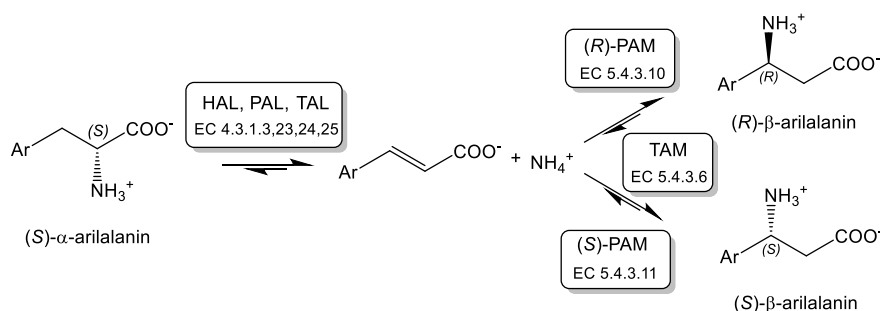
6 Andexer, J. N. *et al. ChemBioChem* **13**, 1932–1939 (2012).

7 Devamani, T. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **138**, 1046–1056 (2016).

8 EST3 több különböző módszerrel is rekonstrukták. EST3mL a maximum likelihood módszerrel rekonstrukt szekvenciájú enzimet jelöli.

## 1.2 MIO-t tartalmazó I-es típusú liáz szerű enzimek

A MIO-t tartalmazó I-es típusú liázok családjába (MIO enzimek) két funkcionálisan különböző, azonban nagy fokú szerkezeti hasonlóságot mutató enzim család tartozik, az aromás aminosav ammónia-liázok (AL) és az aromás aminosav amino mutázok (AM), 3. ábra<sup>9</sup>. Az AL-ok reverzibilis ammónia eliminációt katalizálják hisztidinből (HAL, EC 4.3.1.3), fenilalaninból (PAL, EC 4.3.1.24) vagy tirozinból (TAL, EC 4.3.1.23)<sup>10</sup>. AM-ok az  $\alpha$ - és  $\beta$ -fenilalanin (PAM, EC 5.4.3.10, 11) illetve az  $\alpha$ - és  $\beta$ -tirozin (TAM EC 5.4.3.6) egymásba alakulását katalizálják. A természetes szubsztrátjaik irányába az AL-ok és az AM-ok magas szelektivitást mutatnak az  $\alpha$ -arilalaninok irányába, csak L-aromás aminosavakat fogadnak el, illetve szintetizálnak ((S)-enantiomer)<sup>9</sup>. A PAM reakció a  $\beta$ -fenilalanin irányába is magas enantioszelektivitást mutat. Az eukarióta organizmusokból származó PAM-ok (R)- $\beta$ -fenilalanint termelnek<sup>11</sup>, míg a 200 aminosavval rövidebb, prokarióta szervezetekből származó PAM-ok (S)- $\beta$ -fenilalanint állítanak elő<sup>12</sup>. Az AL és AM reakciók katalízisében fontos szerepet játszik egy ritka elektrofil módosított aminosav a 4-metilidénimidazol-5-on (MIO).



3. ábra. MIO enzimek által katalizált reakciók. AL a nem-oxidatív ammónia eliminációt katalizálják (S)-  $\alpha$ -arilalaninokból, mint az L-hisztidin, az L-fenilalanin vagy az L-tirozin. Az AM-ok az (S)-  $\alpha$ -arilalaninok, az L-fenilalanin vagy az L-tirozin átalakulását katalizálják (R)- vagy (S)-  $\beta$ -fenilalaninná. Fenilalanin 2,3-aminomutázok (PAM) (R) vagy (S)- $\beta$ -fenilalanin szelektív szintézisét katalizálják, míg a tirozin 2,3-aminomutázok (TAM) az (R)- és (S)- $\beta$ -tirozin keverékét eredményezik.

Különbféle reakciómechanizmusokat feltételeznek az AL által katalizált reakcióra, amelyekben más-más szerepe van a MIO-nak, 4. ábra. Az N-MIO mechanizmus egy N-MIO közti terméket feltételez, amely kovalens kötés létrejöttével alakul ki a szubsztrát amino csoportja és a MIO exociklikus metilidén csoportja között<sup>13</sup>. A Friedel-Crafts (FC) mechanizmus egy FC közti termék létét feltételezi, amelynek szerkezete hasonlít a Friedel-

9 Parmeggiani, F., et al. *Chem. Rev.* **118**, 73–118 (2018).

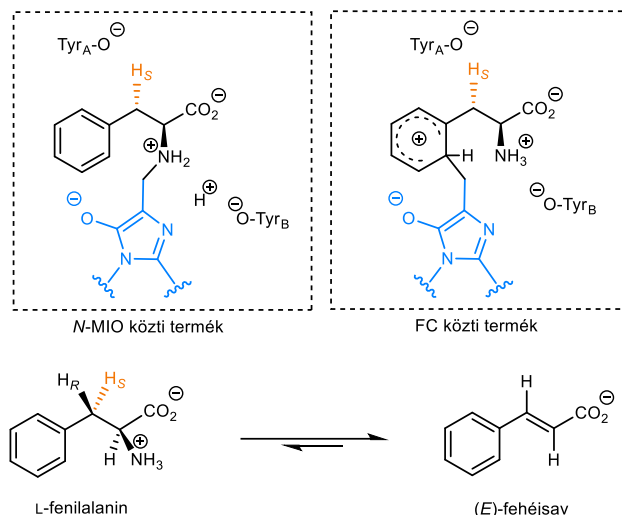
10 A fourth aromatic ammonia lyase EC category 4.3.1.25 exists. Enzymes having both phenylalanine and tyrosine ammonia lyase activities belong to this family.

11 Mutatu, W., et al. *Biochemistry* **46**, 9785–9794 (2007).

12 Magarvey, N. A., et al. *ACS Chem. Biol.* **3**, 542–54 (2008).

13 Hermes, J. D., et al. *Biochemistry* **24**, 2959–2967 (1985).

Crafts reakciókra jellemző  $\sigma$ -komplexre. Ez a mechanizmus a közti termékben kovalens kötéssel feltételez a szubsztrát aromás csoportja és a MIO exociklikus metilidén csoportja között<sup>14</sup>. Mind a két mechanizmus szerint a  $\beta$ -helyzetű *pro-S* proton ( $H_S$ ) levételéért egy tirozín felelős, amely a flexibilis belső hurok régióban helyezkedik el (TyrA 4. ábraán.).



4. ábra Feltételezett reakció mechanizmusok az AL reakcióra. Az N-MIO intermedier útvonalon, egy kovalen kötés alakul ki a szubsztrát amino csoportja és a MIO elektrofil között. A Friedel-Crafts útvonal szerint a kötés a szubsztrát fenil csoportja és a MIO között jön létre.

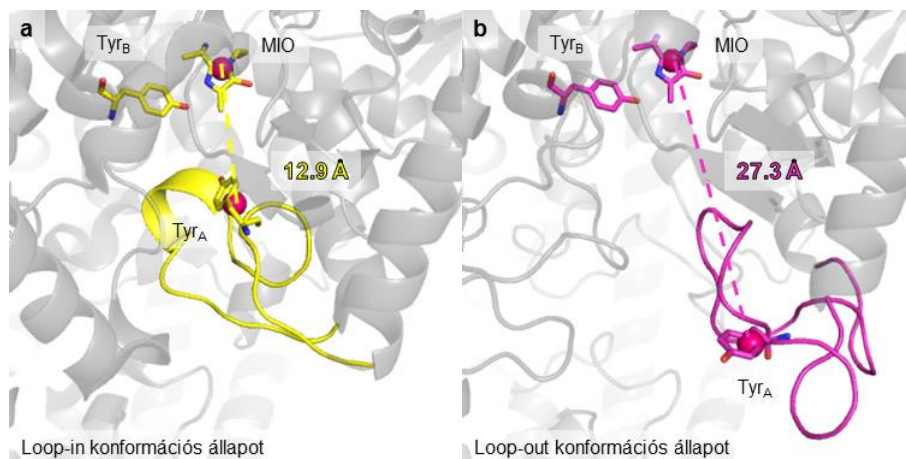
A MIO enzimek aktív centrumát két mozgékony hurok rész fedi; a belső és a külső hurok. Magas krisztallográfiai B-faktor értékek jelezték a két hurok nagyfokú flexibilitását, és a térbeli közelségük nyomán azt feltételezték, hogy a két huroknak fontos szerepe van a szubsztrát kötődésben és a katalízisben. Továbbá feltételezték, hogy a belső hurok flexibilitása meghatározó lehet a meghatározó különbség az AL-ok és az AM-ok között<sup>15</sup>. A feltételezés abból indult, ki, hogy a belső hurok konformációjának a „loop-in” állapotból a „loop-out” állapotba (*Petroselinum crispum* PAL (PcPAL)<sup>16</sup> szerkezetében láthatóhoz hasonlóan, 5. ábra) kell változnia a szubsztrát bekötődése és a termék távozása közben. Ugyanakkor a „loop-out” állapot biológia relevanciája megkérdőjelezhető és valószínű, hogy PcPAL jelenlegi szerkezete modellezési hibát tartalmaz. A PDB adatbázisból minden MIO enzim típusba tartozó szerkezet inner-loop elektronsűrűségeket megvizsgálva megállapítható, hogy amennyiben megfigyelhetőek elektronsűrűségek az belső hurok esetében, akkor a hurok minden esetben „loop-in” konformációban található. Ezáltal azt tűztük ki célul, hogy kísérletesen meghatározzuk a PcPAL szerkezetét katalitikusan kompetens konformációban. Célunk volt továbbá, hogy vizsgáljuk az erősen kötődő inhibitorok kötő konformációját, illetve a kötődésük

14 Poppe, L. & Rétey, J. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **44**, 3668–3688 (2005).

15 Heberling, M. M. *et al. ACS Chem. Biol.* **10**, 989–997 (2015).

16 Ritter, H., Schulz, G. E. *Plant Cell* **16**, 3426–3436 (2004).

hatását a fehérje kristályosíthatóságára. Mivel mind (*R*)- mind (*S*)-konfigurációjú erősen kötődő inhibitorra jellemeztünk, így tökéletes lehetőségünk adódott arra, hogy vizsgáljuk, hogyan befolyásolja az aktív centrum alakja az inhibitor kötődését és mi lehet az szerkezeti oka a MIO enzimek enantioszelektivitásának.



5. ábra. Belső hurok konformációi a MIO enzimekben. **a.** Katalitikusan kompetens belső hurok konformáció a *Taxus canadensis* PAM (TcPAM) szerkezetében (3NZ4)<sup>17</sup>. **b.** „Loop-out” konformáció a *Petroselinum crispum* PAL (PcPAL) szerkezetében (1W27)<sup>16</sup>. A TyrA katalitikus bázis 27,3 Å távolságra található a MIO csoporttól, így ebben a konformációban nem tudja betölteni a szerepét.

## 2 Módszerek

A PcPAL, AvPAL és *Kangiella koreensis* PAL (KkPAL) illetve ezek mutánsait kódoló bakteriális expressziós vektorokat molekuláris klónozással és mutagenezissel állítottam elő. A bakteriális sejt extraktumból Ni-NTA affinitás kromatográfiával választottam el a célfehérjét a többi sejtalkotótól, majd a tisztított fehérje minőségét SDS-PAGE és fotometriás módszerekkel ellenőriztem.

Az amino foszfonsavak PcPAL-hoz, *Rhodospiridium toruloides* PAL-hoz (RtPAL) és *Anabaena variabilis* PAL (AvPAL)-hoz való kötődését kinetikai vizsgálatokkal jellemeztem, Majd a PcPAL-hoz való kötődést termodinamikai egyensúlyban izotermális titráló kalorimetriával is kiegészítettem. A PcPAL harmadlagos szerkezetét röntgenkristallográfiával mértem és fejtettem meg apo formában illetve (*R*)-(1-amino-2-feniletill)foszfonsav és (*S*)-(1-amino-2-fenilallil)foszfonsav ligandumokkal kötött állapotokban.

PcPAL és TcPAM fehérék esetében a ligandum kötődési útvonalakat és a belső hurok kötődés során megfigyelhető mozgását változó gyorsítású molekuladinamikai szimulációkkal modelleztem (RAMD).

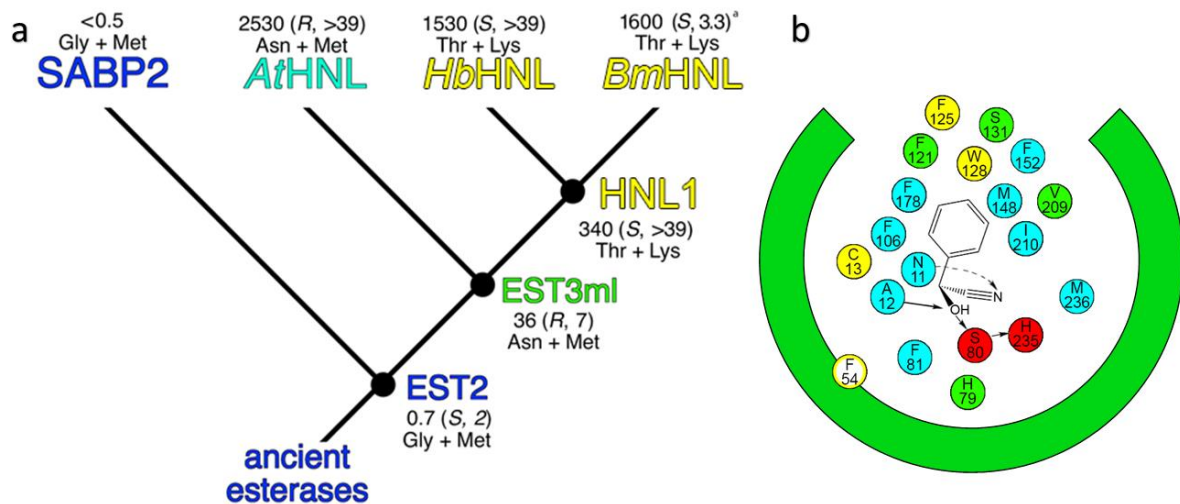
<sup>17</sup> Feng, L., et al. *Biochemistry* **50**, 2919–2930 (2011).

Molekuladinamikai szimulációkkal vizsgáltam a szerkezet hatását a szubsztrát kötődésre a vad típusú (*S*)-szelektív AtHNL-ben, a vad típusú (*R*)-szelektív HbHNL-ben illetve az összetett aktív helyeken a AtHNL és HbHNL fehérjeláncokban.

### 3 Eredmények és értékelésük

#### 3.1 Ősi és modern HNL-ok reakció mechanizmusa

Az HbHNL és az AtHNL különböző mechanizmusának megértésére megpróbáltuk felcserélni az enzimek mechanizmusát és ezáltal az enantioszereklivitását, az aktív centrumokat felépítő nem homológ aminosavak felcserélésével. A 16 nem homológ felcserésés katalitikusan inaktív illetve nem vízoldható formájú enzimeket eredményezett, így kialakítottunk olyan, összetett aktív centrumokat, melyeket részben az AtHNL-ben és részben az HbHNL-ben kódolt aminosavak építik fel (például az A9-H7-es összetett aktív helyben 9 aminosav megegyezik az AtHNL-ben találhatóakkal, míg 7 aminosav megegyezik az HbHNL-ben találhatóakkal.). Az összetett aktív centrumokba az aminosavak kiválasztása az ősi enzim EST3mL-hez képesti szekvencia hasonlóságok alapján történt.



6. ábra **a** Egyszerűsített filogenetikus fa amely tartalmazza az HbHNL-t (*Lys*-mechanizmus, sárga szöveg), AtHNL-t (*oxianion luk* mechanizmus, cian színű szöveg), *Baliospermum montanum* HNL-t (*BmHNL*), *Nicotiana tabacum* észterázát (*SABP2*, kék szöveg), illetve több rekonstruált ősi enzimet (*HNL1*, *EST2*, *EST3ml*). A fekete számok a mandelonitril szubsztráttal mért HNL aktivitásokat mutatják, ( $\text{min}^{-1}$  mértékegységben). [Felsőindexben lévő „a” jelöli, hogy a *BmHNL*-re vonatkozó adat forrása <sup>18</sup>] **b** *EST3mL* aktív centruma hasonlít az A10-H6 összetett aktív centrumokra, csupán 4 aminosav különböző a vizsgált 16-ból, amelyeket zöld-el jelöl az ábra. Az *EST3mL*-ben fenilalanin található mind az 54-es mind a 81-es pozíciókban, így minden bizonnyal ez utóbbi lezárja az *oxianion luk*-at. A *Lys236* hiányában, a zárt *oxianion luk* mellett, az *EST3ml*-ben minden bizonnyal az Hb-A10-H9 enzimekre javasolt *Asn* mechanizmussal történik a cianid elimináció.

Az összetett aktív centrumú HbHNL variánsok (Hb-A9-H7 és Hb-A10-H6) minden bizonnyal egy olyan katalitikus mechanizmust alkalmaznak amely különbözik mind a két vad típusú enzim mechanizmusától. A kilenc aminosav csere, amely a vad típusú HbHNL-ből a Hb-A9-H7 variánst eredményezte, ellehetetlenítette az HbHNL-re jellemző (*S*)-szelektív Lys-mechanizmust, mivel a helyettesítések megváltoztatták az esszenciális Thr11 és Lys236 aminosavakat. Azt vártuk, hogy az Asn11, Ala12, és Phe81 aminosavak elégségesek lesznek az (*R*)-szelektív AtHNL szerű oxianion-luk mechanizmus kialakításához, ugyanakkor HbHNL-A9-H7 megtartotta a nagyfokú (*S*)-szelektivitását ( $E > 39$ ). A tény, hogy az összetett aktív centrumú enzim megőrizte a vad típusú enzim aktivitásának nagyjából 3%-át, az összes katalitikus aminosav hiányában, arra utal, hogy az ilyen összetett aktív centrumú enzimek új mechanizmus-t találtak az (*S*)-szelektív mandelonitril reakciójának katalizálásához, ami az Asn-mechanizmus nevet kapta, 2. ábra c, mivel itt Asn11  $\delta$ -amid N-H csoportja stabilizálja a távozó cianidot

A feltételezett Asn mechanizmus minden bizonnyal egy evolúciós mérföldkő lehetett a modern HNL reakció mechanizmusok kialakulásában, 6. ábra. Mind HbHNL, mind AtHNL észterázokból alakultak ki, ugyanakkor közvetlen módon nem lehetett a modern észterázok és a Lys-mechanizmussal működő HNL aktivitását felcserélni, mivel a két aktivitás közötti átmenetben katalitikusan inaktív enzimek találhatóak<sup>19,20</sup>.

Ugyanakkor az HbHNL és AtHNL legközelebbi ősnének rekonstrukciója (EST3mL, 6. ábra)<sup>21</sup>, olyan enzimet eredményezett, amely mind az észter hidrolízist, mind a hidroxinitril bontást katalizálta<sup>21,22</sup>. Ennek az ősnének az aktív helye nagyban hasonlít a bemutatott összetett aktív helyű enzimekre, tartalmazza többek között a kritikus Asn11-es aminosavat. Az ősnének aktív centrumát felépítő összes aminosav vagy megegyezik az A10-H6 aktív helyben található aminosavakkal (17 ilyen van) vagy olyan aminosavak, amelyeket egyik modern HNL sem tartalmazza (5 darab). ESTmL esetében a HbHNL-A10-H6 összetett aktív centrumú enzimhez hasonló aktivitásokat ~2,3% illetve 1,6% és enantioszelektivitásokat *R*, 7 illetve *S*, 3,3 figyeltünk meg. Az ESTmL-hez hasonlóan az Hb-A10-H6 fenilalanin-t tartalmaz mind az 54-es mind a 81-es pozíciókban, ez utóbbi a modellezési eredmények alapján valószínűsíthető, hogy lezárja az oxianion lukat, ezáltal megakadályozza az AtHNL-re jellemző mechanizmussal történő katalízist. Feltételezve, hogy az HbHNL-A10-H6 az Asn mechanizmussal működik

---

19 Padhi, S. K. *et al. Chem. Biol.* **17**, 863–871 (2010).

20 Nedrud, D. M. *et al. Chem. Sci.* **5**, 4265–4277 (2014).

21 Devamani, T. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **138**, 1046–1056 (2016).

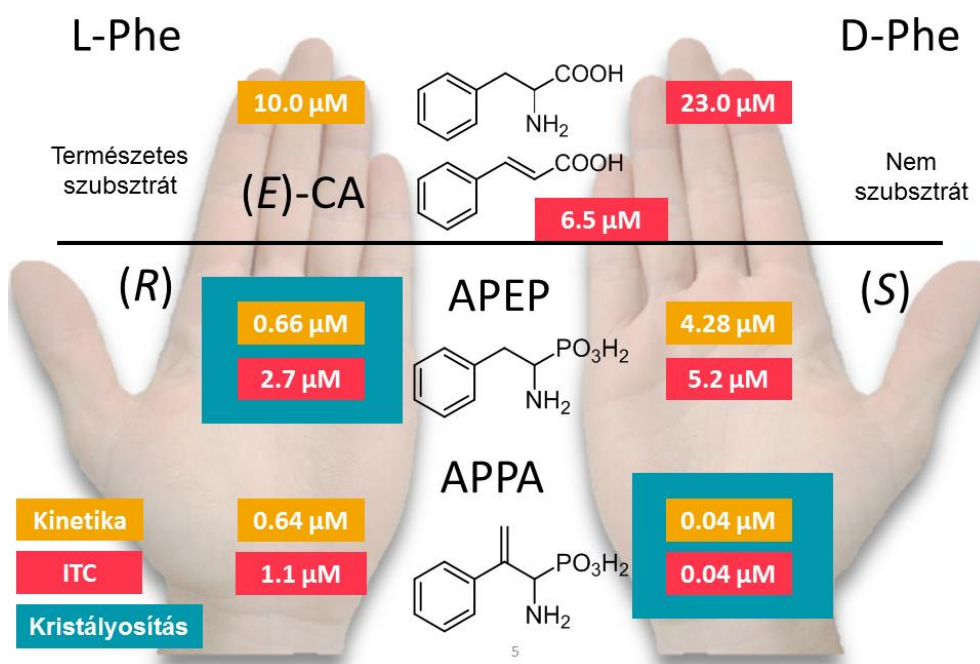
22 Rauwerdink, A. *et al. Mol. Biol. Evol.* **33**, 971–979 (2016).



lehetséges, hogy az EST3mL esetében is az Asn mechanizmussal történik a cianid elimináció. Ez arra utal, hogy az új Asn mechanizmus felfedezése az összetett enzimek esetében nem a véletlen műve, hanem sokkal inkább az ősi mechanizmus újbóli megtalálását jelenti, amely mérföldkő volt a modern HNL katalitikus mechanizmusok kialakulásában. Egy ilyen mechanizmusnak kompatibilisnek kell lennie mind a korábbi, észteráz aktivitással mind az ezt követő HNL aktivitásokkal, mivel csak így lehetséges egy olyan evolúciós útvonal az egyiktől a másikig, amelynek minden eleme funkcionálisan aktív enzim. Tekintettel arra, hogy mind az EST3mL, mind az összetett aktív centrumú enzimek jelentősen lassabbak, mint a modern, vad típusú enzimek, az evolúciós nyomás az enzim aktivitásának növelése irányába hathatott, ami kialakította az Asn mechanizmusból a modern HNL mechanizmusokat. A lehetséges útvonal egy-egy elemét vizsgáltuk, amelyeknek nem volt katalitikus hatása, azonban ezek a lehetséges 9! (~360 000) evolúciós útvonal csak kis részét fedik le, tehát nem zárják ki egy legjobb útvonal létezését, amely minden egyes lépésben katalitikusan aktív enzimeket találunk.

### 3.2 Amino foszfonsav inhibitorok jellemzése

Az új inhibitorok jellemzése hozzájárulhat az enzimek működési mechanizmusának megértéséhez. Azt találtuk, hogy a természetes szubsztrát (L-Phe) foszfonsav analogonjának ((1-amino-2-feniletill) foszfonsav, APEP) mind a két enantiomerje illetve a  $\beta$ -helyzetben metilidén csoportot tartalmazó deriváltjának ((1-amino-2-fenilallil) foszfonsav, APPA) mind a két enantiomerje inhibeálta a PcPAL-t, 7. ábra. A vizsgált enantiomerek abszolút konfigurációját röntgenkristallográfiás módszerrel minden kétséget kizáróan meghatároztuk. Enzim kinetikai mérések alapján, a  $\beta$  helyzetben metilidén csoporttal szubsztituált, természetes szubsztrát tükörképi párja mutatta a legerősebb, ugyanakkor lassú típusú inhibíciót. Váratlanul mind az (S)-APPA mind az (R)-APEP lassan kötődő inhibitoroknak bizonyultak. Lassú kötődés abban az esetben fordul elő, ha két lépéses kötődési folyamat áll fent. Ennek oka lehet valamilyen szerkezeti változás, mint például konformáció változás vagy akár kovalens kötés létrejötte ami egy erősebben kötődő állapotot hoz létre. Izotermális titráló kalorimetriával (ITC) megmértük az APEP és APPA disszociációs állandóit,  $K_d$ , 7. ábra, és kötődési termodinamikát részletesen elemeztük.

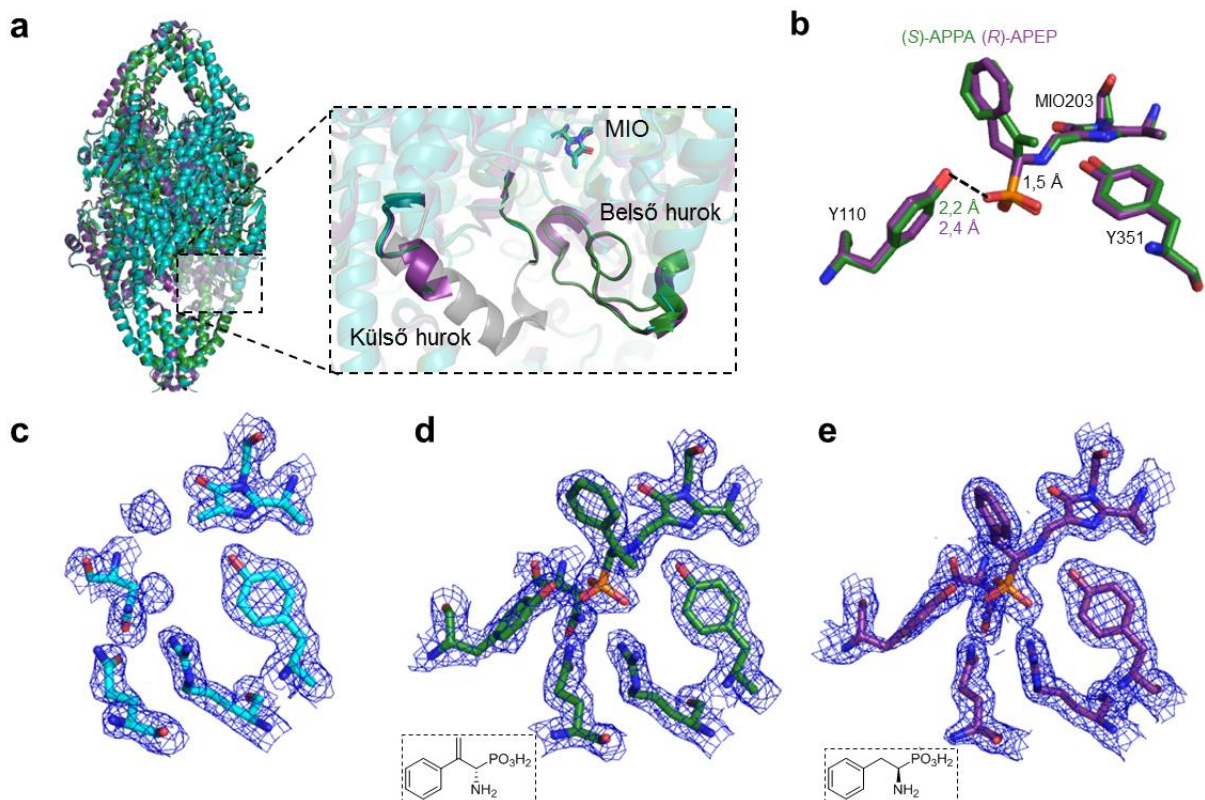


7. ábra. A természetes szubsztrát és aminosavak különböző enantiomerjeinek PcPAL-hoz való kötődésének jellemzése kinetikai és termodinamikai módszerekkel. Sárga dobozok mutatják a kinetikai mérések során a természetes szubsztrátra meghatározott Michaelis konstanst ( $K_m$ ), illetve az aminosavak esetében mért inhibíciós konstansokat ( $K_i$ ). A piros háttérben lévő számok mutatják az izotermális titráló kalorimetriával meghatározott disszociációs állandókat ( $K_d$ ). A kék háttérrel kiemelik, hogy melyik molekulával tudunk fehérje-kristályszerkezetet meghatározni.

További eukarióta PAL (RtPAL) és prokarióta PAL (AvPAL) enzimekkel végzett kinetikai mérések bizonyították, hogy a vizsgált aminosav molekulák általános PAL inhibitorok, így valószínűsíthető, hogy ezek általános MIO enzim inhibitorok bizonyulhatnak.

### 3.3 Ligandok kötődése MIO enzimekhez

A legerősebben kötődő (R)-APEP és (S)-APPA tükörképi izomériájuk kapcsán ideális választást nyújtanak a PAL enantioszelektivitásának molekuláris okainak vizsgálatára. Az inhibitorokat tartalmazó PcPAL kristályszerkezetekben, 8. ábra, meglepő módon mind a két foszfonsav a MIO-hoz kovalensen kötött állapotban volt megfigyelhető, annak ellenére, hogy mind a két esetben reverzibilis volt az inhibíció. Ezek a kristályszerkezetek jelentik az első közvetlen bizonyítékot az *N*-MIO katalitikus mechanizmusa PAL-ok esetében. A két inhibitor kötő pozíciója között a legjelentősebb különbség a  $\beta$ -helyzetű szénatom helyzetében figyelhető meg. A szerkezetek alapján valószínű, hogy a  $\beta$ -helyzetű szénatomnak a katalitikus TyrA-hoz viszonyított elhelyezkedése lehet a meghatározó abban, hogy melyik enantiomer reakcióját képes az enzim katalizálni.



8. ábra. A PcPAL-ra meghatározott új kristályszerkezetekben a belső hurok katalitikusan kompetens loop-in konformációban található, és ezek a szerkezetek iránymutatást adnak a PAL enantioszelektivitásával kapcsolatban. **a.** A három PcPAL szerkezet (6H2O cian, 6F6T zöld, 6HQF lila) egymásra illesztett szalagos megjelenítése, egy közeli képpel az aktív helyről, amely kiemeli az aktív helyet záró külső és belső hurok részeit. **b.** (R)-APEP és (S)-APPA kötő konformációjának egymásra illesztése, melyből jól látható, hogy a legnagyobb eltérés a  $\beta$ -helyzetű szénatom pozíciójában található. Mind a két inhibitor amino-N atomja és a MIO exociklikus metilidén csoportja közötti távolság 1,5 Å, így kijelenthető, hogy mind a két molekula kovalensen kötött. **c.** PcPAL apo szerkezete. **d.** PcPAL (S)-APPA kötött szerkezete, **e.** PcPAL (R)-APEP kötött szerkezete. A kísérleti elektron sűrűségeket kék háló jelzi (2Fo-Fc térkép, 1  $\sigma$  szintű kontúrral) a katalitikusan esszenciális aminosavak (Tyr110, Mio203, Tyr351), és az inhibitorok hidrofil oldalával közvetlen kapcsolatban lévő aminosavak esetében (Gln348, Arg354, Asn384).

A krisztallográfia mérések és modellezési adatok együttesen négy érveléssel cáfolták a loop-out konformáció biológiai fontosságát, a PcPAL esetében és megkérdőjelezték a loop-flexibilitás hipotézist az eltérő PAL és PAM aktivitások magyarázatára. Először, az adatbázisból letöltött mérési adatok alapján nem voltak megfigyelhetőek jelentős elektron sűrűségek az 1W27<sup>16</sup> szerkezetbe modellezett hurok (loop) koordinátáinál. Másodsor, egyetlen általunk a PcPAL-on végzett krisztallográfiai mérés estében sem láttunk semmilyen a loop-out konformációra utaló elektron denzitást. Harmadjára, a RAMD szimulációk során, a ligandum távozás során egyetlen esetben sem figyeltünk meg átmenetet a loop-in és a loop-out konformációk között. Végül a PcPAL és a TcPAM esetében nagyon hasonló belső hurok mozgékonyt figyeltünk meg mind a normál MD mind a RAMD szimulációk során, ami arra utal, hogy ugyan eltérőek a kristályszerkezetben dinamikus viselkedésük még is hasonló.

A RAMD szimulációk során két azonos, fő szubsztrát kötődési /termék távozási útvonalat azonosítottunk az eukarióta PAL és PAM-ok esetében. Az első megegyezik a korábban krisztallográfiai adatok alapján javasolt útvonallal és a belső és a külső hurok között halad <sup>23</sup>. A második eddig ismeretlen útvonal egybe esik, egy a MIO enzimek esetében evolúciósan konzervált víz csatornával. Ez a csatorna egyedül az (S)-szelektív prokarióta organizmusokban megtalálható PAM-okból hiányzik, mint a *Pantoea agglomerans* PAM (PaPAM). Az összes ilyen PAM-ban megtalálható két konzervált mutáció, amely lezárja az egyik illetve másik kimeneteli útvonalat. Kiválasztottuk és jellemeztük a KkPAL-t, ami egy kiválóan alkalmas prokarióta PAL arra, hogy vizsgáljuk, milyen hatása van a távozási útvonalakat bezáró mutációknak az enzim aktivitásra, és ezáltal reméljük, hogy először tudunk *de novo* PAM aktivitást kialakítani.

---

<sup>23</sup> Christianson, C. V., *et al. Biochemistry* **46**, 7205–7214 (2007).

## 4 Tézisek

- I. Létrehoztunk azonos aktív centrumokat két ellentétes enantioszelektivitását mutató homológ hidroxinitrilázokban, és megmértük az hidroxilnitriláz aktivitásukat valamint meghatároztuk az enzimek enantioszelektivitásait, az elméletileg azonos aktív helyeken. Molekula dinamikai szimulációkkal megmutattam, hogy a katalitikusan aktív konformációk száma alapján becsülhető a HNL reakció mechanizmusa. Majd a szimulációk alapján javasoltam, hogy váratlan enantioszelektivitást mutató összetett aktív centrumú hidroxilnitrilázok esetében a katalízis egy új mechanizmussal megy végbe. Ez a mechanizmus evolúciós megfontolások alapján feltehetőleg egy ősi katalitikus mechanizmus. [2]
- II. Az aktív helyet felépítő aminosavak relatív mozgásának vizsgálatával megállapítottam, hogy a negyvennégy vizsgált aminosav közül tizenhét aminosav más relatív pozícióban van, aminek hatására más alakja és ezáltal más funkciója lesz az elméletileg azonos aktív helyeknek az összetett aktív helyű hidroxilnitrilázok esetében. Azonosítottam két aminosav csoportot, amelyeknek relatív pozíció változásai korrelációt mutattak, ezek alapján feltételeztem, hogy a csoportokon belül az aktív helytől távolabbi aminosavak hatására az aktív helyet kialakító aminosavak pozíciója megváltozik, így magyarázva az azonos aminosavakból felépülő aktív helyek eltérő alakját. [2]
- III. Kinetikai vizsgálatokkal jellemeztem öt különböző amino foszfonsav molekula kötődését a *Petroselinum crispum* PAL-hoz (PcPAL). A legerősebben kötődő (1-amino-2-feniletill) foszfonsav (APEP) és (1-amino-2-fenilallil) foszfonsav (APPA) két enantiomerjét külön is vizsgáltam mind kinetikai mérésekkel mind izotermális titráló kalorimetriával. Két független módszerrel bizonyítottam, hogy a  $\beta$ -helyzetű metilidén csoport megfordítja a PcPAL enantiopreferenciáját és nagyon erős ( $K_i = 40$  nm) kötődést hoz létre. Megmutattam továbbá, hogy mind az (R)-APEP mind az (S)-APPA lassú kötődést mutat. [1,3]
- IV. Kísérleteimmel igazoltam, hogy az APEP és APPA kiváló inhibitora további eukarióta és prokarióta PAL-oknak, így bizonyítottam, hogy az APEP és APPA általános PAL inhibitorok. Ebből kiindulva feltételeztem, hogy általánosan alkalmazható MIO enzim inhibitorok is. [3]
- V. Röntgendiffrakciós módszerrel meghatároztam a PcPAL fehérje kristályszerkezetét apo formában illetve (R)-APEP és (S)-APPA kötött formában. Bemutattam, hogy a

(*R*) és (*S*) enantiomerek kötő konformációja a  $\beta$ -helyzetű szénatom esetében mutatja a legnagyobb eltérést, ezáltal valószínűsítettem, hogy ez a különbség a meghatározó a PAL enzimek enantioszelektivitásában.

- VI. Javasoltam, hogy a loop-in konformáció a katalitikusan kompetens konformáció a MIO enzimek esetében, ami nem nyílik ki jelentősen a katalitikus ciklus során, így a loop-out konformáció biológiai fontosságát megkérdőjelezhető a MIO enzimeknél. Az 1W27<sup>16</sup> mérési adatok újraértékelése során nem találtam mért a balsó hurok atomokhoz tartozó elektron denzitásokat a loop-out konformációban. Továbbá, az általam mért kristályszerkezetekben semmilyen a loop-out konformációra utaló mérési adatot nem tapasztaltam, azonban az erősen kötődő inhibitorok esetében jól meghatározott elektron denzitásokat figyeltem meg a loop-in konformációhoz tartozó pozíciókban. Végül, egyetlen esetben sem figyeltem meg átmenetet a loop-in konformációból a loop-out konformációba a szubsztrát bekötődés/termék távozás során a RAMD szimulációkban.
- VII. Azonosítottunk és rekombináns úton termeltettünk egy új MIO enzimet a *Kangiella koreensis*-ből. Szubsztrát vizsgálatok megmutatták, hogy az enzim egy PAL. Jelentős stabilitása ( $T_m = 81^\circ\text{C}$ ) alapján valószínű, hogy számos destabilizáló hatású mutáció bevitele lehetséges anélkül, hogy az KkPAL termeltethetősége romlana, így kiválóan alkalmas enzim mérnökségi tanulmányokhoz. [4]

## 5 Alkalmazási lehetőségek

A biokatalizátorok alkalmasak kémiai reakciók fenntartható és környezetbarát megvalósítására mind laboratóriumi mind ipari méretekben. A természetben számos fehérje alapú biokatalizátor megtalálható, melyeket már ma is számos aszimmetrikus szintézisben és kinetikus reszolválási technológiában alkalmaznak<sup>1</sup>. A hidroxinitrilázokkal előállítható cianohidrinek kiváló alapanyagai számos továbbalakítási reakciónak, amelyekkel a termékek széles spektrumát állíthatjuk elő a hidroxil savaktól kezdődően az aminonitrilekig. A MIO enzimek felhasználási lehetőségei szintén igen széleskörűek, alkalmazhatóak a biotranszformációkban illetve akár közvetlen gyógykezelésként is. MIO enzimek segítségével megvalósítható számos farmakológiailag aktív hatóanyag szintézise, gyógyszereszerű molekulák illetve ezek prekursorainak előállítása<sup>9</sup>. A HNL és MIO enzimek szerkezet-funkció összefüggéseinek pontos megértése hozzájárulhat az enantioszelektivitás szerkezeti okainak megéréséhez, ami lehetőséget nyújt az enzimek nem természetes aktivitásának fejlesztéséhez, amely jelenleg a biokatalízis egyik legintenzívebben kutatott területe.

## 6 Közlemények

### 6.1 Tézis pontok alapjául szolgáló közlemények

1. Bata Zs., Belle E.:  
**Biokatalizátorok a zöldebb jövőért- enzimek a vegyiparban,**  
Élet és tudomány, 2018. 03. 23. LXXIII, 12. (BZs 55%)
2. Jones B.J., Bata Zs., Kazlauskas R.J:  
**Identical active sites in hydroxynitrile lyases show opposite enantioselectivity and reveal possible ancestral mechanism.**  
*ACS Catalysis*, 7, 4221–4229, **2017** (IF 10.614, BZs 100%, FI:1)
3. Bata Zs., Qian R., Roller A., Horak J., Bencze L. Cs., Paizs Cs., Hammerschmidt F., Vertessy B. G., Poppe L.:  
**Metylidene group on phosphonic acid analogue of phenylalanine reverses the enantiopreference of phenylalanine ammonia-lyases**  
*Advanced Synthesis and Catalysis*, 359, 2109-2120, **2017** (IF 5.646, BZs 100%, FI:3)
4. Varga A., Bata Zs., Csuka P, Bordea D., Vértessy B.G., Marcovici A., Irimie F. D., Poppe L., Bencze L. Cs.:  
**A novel phenylalanine ammonia-lyase from *Kangiella koreensis*,**  
*Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia*. LXII, 3, 293-308, **2017** (IF: 0.148, BZs 90%)

### 6.2 Egyéb közlemények

1. Bata Zs., Vertessy B. G., Poppe L.,  
**Enzimmérszínéség fenilalanin ammonia liázon**  
*Tavaszi szél konferencia kiadvány*, 2018.05.04-06., Győr, Magyarország
2. Banoczi G., Szabo Cs., Bata Zs., Filip A., Hornyanszky G., Poppe L.:  
**Structural modeling of phenylalanine ammonia-lyases and related MIO-containing enzymes- and insight into thermostability and ionic interactions.**  
*Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia* 60(4), **2015**, (IF: 0.148, I: 1)
3. Tomin A, Weiser D, Hellner G, Bata Zs., Corici L, Péter F, Koczka B, Poppe L.:  
**Fine tuning the second generation sol-gel lipase immobilization with ternary alkoxysilane precursor systems.**  
*Process Biochemistry* 46, 52-58. **2011**, (IF: 2.627, I: 44)
4. Tomin A., Weiser D., Bata Zs., Corici L., Péter F., Poppe L.:  
**Entrapment of Lipases in Novel Sol-gel Systems.**  
*Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia*, 54(2), 77-82, **2009**. (IF: 0.231, I: 5)

## 6.3 Doktori értekezés témájához kapcsolódó konferencia előadások

### 6.3.1 Szóbeli előadások

Bata Zs., Molnár B., Leveles I., Varga A., Paizs Cs., Poppe L., Vértessy B. G.:  
**Structural snapshots of multiple enzyme-ligand complexes pave the road for semi rational enzyme engineering.**

3. Debreceni Röntgendiffrakciós Kerekasztal Konferencia, 2019. 01. 24, Debrecen, Magyarország

Bata Zs., Csuka P., Varga A., Bánóczy G., Madaras E., Bencze L. Cs., Paizs Cs., Vértessy B. G., Poppe L.:

**Expanding the MIO-enzyme toolbox –Novel enzymes, structures and mechanistic considerations**

Novel Enzymes, 2018. 10. 09-12, Darmstadt, Németország

Bata Zs., Molnár B., Leveles I., Varga A., Paizs Cs., Poppe L., Vértessy B. G.:

**Structural snapshots of multiple enzyme-ligand complexes pave the road for semi rational enzyme engineering**

31<sup>st</sup> European Crystallographer's Meeting, 2018. 08. 22-27, Oviedo, Spanyolország

Bata Zs., Madaras E., Vértessy B. G., Poppe L.:

**MIO enzimes családban konzervált szubsztrát bekötődési útvonalak feltérképezése változóirányú gyorsítású molekuladinamikai szimulációkkal**

Kemometria és Molekula Modellezés (KeMoMo) szimpózium, 2018. 05. 24-25, Szeged, Magyarország

Bata Zs., Qian R., Hammerschmidt F., Paizs Cs., Vértessy B. G., Poppe L.:

**Slow Binding Mechanism of High Affinity Mirror Image MIO Enzyme Inhibitor**

European Molecular Biology Organization (EMBO) Practical course: The application of kinetic methods to dynamic biological systems, 2017. 06. 25-30, Canterbury, Anglia

Bata Zs., Qian R., Roller A., Hammerschmidt F., Paizs Cs., Vértessy B. G., Poppe L.:

**Mirror image inhibitor enhance crystallization of the industrially relevant PcPAL**

Hungarian Molecular Life Sciences 2017. 03. 31- 04.02, Eger, Magyarország

Bata Zs., Jones J. B., Kazlauskas R. J.:

**Modeling explanation of altering the enantioselectivity of hydroxynitrilase**

BME Oláh György Doktoráns konferencia, 2017. 02. 02, Budapest, Magyarország

Bata Zs., Paizs Cs., Vértessy B. G., Poppe L.:

**A fehérjekristályosítás módszerének bemutatása PcPAL példáján keresztül**

BME Oláh György Doktoráns konferencia, 2017. 02. 02. Budapest, Magyarország

Bata Zs., Jones B.J., Kazlauskas R.J.:

**R or S, hogyan döntenek a hidroxinitrilázok?**

Kemometria és Molekula Modellezés (KeMoMo) szimpózium, 2016. 05. 12-13, Miskolc, Magyarország



Bata Zs., Vida L, Bánóczy G, Hammerschmidt F., Vértessy B. G., Poppe L.:  
**Computational and experimental investigation of novel type MIO-enzyme inhibitors**  
Kemometria és Molekula Modellezés (KeMoMo) szimpózium, 2015 05. 14-15, Szeged, Magyarország

### 6.3.2 Poszter előadások

Bata Zs., Madaras E., Leveles I., Hammerschmidt F., Paizs Cs., Poppe L., Vértessy B. G.:  
**Bioactive 3D structure of phenylalanine ammonia-lyase reveal key insights into ligand binding dynamics**  
BME VBK 145, 2018. 06. 01, Budapest, Magyarország

Bata Zs., Madaras E., Leveles I., Hammerschmidt F., Paizs Cs., Poppe L., Vértessy B. G.:  
**Bioactive 3D structure of phenylalanine ammonia-lyase reveal key insights into ligand binding dynamics**  
62<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Biophysical society, 2018. 02. 17-21, San Francisco, California, USA. **Flash Talk, 90 s és poszter előadás**

Bata Zs., Madaras E., Ibolya L., Hammerschmidt F., Paizs Cs., Poppe L., Vértessy B. G.:  
**Catalytically competent novel 3D structure of phenylalanine ammonia-lyase reveal key insights into ligand binding dynamics**  
Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Youth Scientific Forum és Annual meeting, 2017. 09. 7-10 és 2017. 09. 10-14, Jeruzsálem, Izrael

Bata Zs., Leveles I., Qian R., Hammerschmidt F., Paizs Cs., Poppe L., Vértessy B. G.:  
**Catalytically competent structure of eukaryotic phenylalanine ammonia-lyase**  
13<sup>th</sup> International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, 2017. 07. 09-13, Budapest, Magyarország, **Short talk, 5 perc és poszter előadás**

Bata Zs., Qian R., Roller A., Hammerschmidt F., Paizs Cs., Vértessy B. G., Poppe L.:  
**Experimental and computational characterization of aminophosphonic acid MIO enzyme inhibitors**, Conference Poster price  
BME Oláh György Doktoráns konferencia, 2017. 02. 02. Budapest, Magyarország

Bata Zs., Qian R., Roller A., Hammerschmidt F., Paizs Cs., Vértessy B. G., Poppe L.:  
**Experimental and computational characterization of aminophosphonic acid MIO enzyme inhibitors**  
8<sup>th</sup> International meeting on biocatalysis, Biocat2016, 2016. 08. 28 – 09. 01. Hamburg, Németország

Bata Zs., Hammerschmidt F., Vértessy B. G., Poppe L.:  
**Experimental characterization of aminophosphonic acid MIO enzyme inhibitors**  
FEBS advances course: Advanced Methods in Macromolecular Crystallization VII. 2016 06. 27- 07. 02. Nové Hradý, Csehország