

Tytuł polski: „Mechanizmy cyklizacji związków czynnych biologicznie katalizowane przez enzymy zależne od żelaza”

Tytuł angielski: "Mechanisms of cyclization reactions leading to biologically active compounds catalyzed by iron dependent enzymes"

Kierownik projektu: prof. dr hab. Tomasz Borowski

Numer projektu: 2022/45/B/ST4/01411

Bardzo wiele produktów naturalnych, z których znacząca część jest użytecznych w medycynie, zawiera w swojej strukturze jeden lub więcej pierścieni. Znaczna część reakcji cyklizacji jest katalizowana przez enzymy zależne od żelaza, z których wiele jest wciąż słabo scharakteryzowanych. Przykładami mogą być główne obiekty tego projektu badawczego, czyli dioksygenaza 4,5-dihydroksyfenyloalaniny (DODA, EC: 1.13.11.29), która katalizuje kluczowy etap biosyntezy barwników o właściwościach antyoksydacyjnych - betalain, i syntaza ektoiny (EctC, EC: 4.2.1.108) katalizująca ostatni etap biosyntezy ektoiny (kwasu (S)-2-metylo-1,4,5,6-tetrahydro-pirymidyno-4-karboksylowego), która jest substancją osmolityczną chroniącą komórki przed odwodnieniem. Te dwie grupy enzymów zależnych od żelaza zostały genetycznie i częściowo biochemicznie i strukturalnie scharakteryzowane, jednak nadal istnieje wiele ważnych otwartych pytań dotyczących ich struktury i mechanizmów katalitycznych. W ramach tego projektu podejmiemy ściśle zintegrowane badania, które będą wykorzystywać krystalografię białek, pomiary szybkiej kinetyki enzymatycznej, spektroskopię Mossbauera i metody obliczeniowe (symulacje dynamiki molekularnej, badania QM/MM nad mechanizmami reakcji, obliczenia właściwości spektralnych Mossbauera, racjonalne przeprojektowanie enzymów), w celu: uzyskania struktur krystalicznych enzymów i ich kompleksów z substratami/mimetykami lub produktami, wyjaśnienia mechanizmów reakcji katalitycznych, rozwikłania struktury i dynamicznych czynników determinujących aktywność, specyficzności i wydajności reakcji enzymatycznych, oraz przeprowadzenia racjonalnego przeprojektowania enzymów. Kluczowym etapem biosyntezy betalain jest oksydacyjne otwarcie pierścienia L-DOPA katalizowane przez DODA, w wyniku czego powstaje 4,5-seco-DOPA. Pod względem chemicznym reakcje katalizowane przez DODA wciąż skrywają kilka nierozwiązanych zagadek. Na przykład, dotychczas scharakteryzowane DODA pochodzenia roślinnego wykazują wyłącznie aktywność 4,5-ekstradiolową – produkują kwas betalainowy (BA), który w przypadku *B. vulgaris* DODA jest mieszaniną 95:5 (S)- i (R)-enancjomerów. Z kolei enzymy DODA z *Escherichia coli*, *Amanita muscaria* i *Gluconacetobacter diazotrophicus* oprócz aktywności 4,5-ekstradiolowej rozszczepiają również pierścień aromatyczny L-DOPA przy wiązaniu C2-C3, co daje 2,3-seco-DOPA i ostatecznie muskaflawinę. Obecnie nie wiadomo, skąd bierze się ta podwójna aktywność tych enzymów. Ponadto nie jest jasne, czy DODA odgrywa jakąkolwiek aktywną rolę w cyklizacji 4,5-seco-DOPA do BA. Wreszcie, pochodzenie wysokiej enancjoselektywności cyklizacji 4,5-seco-DOPA jest nadal nieznane. Na poziomie strukturalnym enzymy DODA są jak dotąd słabo scharakteryzowane. Ektoina i jej pochodna 5-hydroksyektoina są „chemicznymi chaperonami” wykorzystywanymi przez komórki (głównie bakterie) do ochrony przed odwodnieniem spowodowanym nadmiernym zewnętrznym zasoleniem. Kluczowym etapem biosyntezy ektoiny jest wewnątrzcząsteczkowa reakcja kondensacji N-γ-acetylo-L-2,4-diaminomaślanu katalizowana przez EctC, w wyniku której powstaje ektoina i uwalniana jest cząsteczka wody. Do tej pory scharakteryzowano biochemicznie kilka enzymów EctC, a dwa z nich zostały skrytalizowane, ale te struktury krystaliczne wciąż pozostawiają wiele ważnych pytań otwartych. Dlatego wysoce pożądane jest otrzymanie kryształów z większym obsadzeniem Fe i substratu, oraz uzyskanie dodatkowych struktur dla produktów pośrednich reakcji. Stan utlenienia i stan spinowy jonu Fe, struktura jego powłoki koordynacyjnej oraz szczegółowy mechanizm reakcji są obecnie nieznane.