

- 2014/14/E/NZ1/00053 [2015-2020] Oksygenazy zależne od 2-oksoglutaranu w biosyntezie alkaloidów o aktywności farmakologicznej – struktury, mechanizmy reakcji i racjonalne przeprojektowywanie enzymów – prof. T. Borowski

Dioksygenazy zależne od 2-oksoglutaranu (ODDs) stanowią wielką rodzinę enzymów uczestniczących w rozmaitych procesach biologicznych. W czasie cyklu katalitycznego wszystkie ODDs wytwarzają w swoich miejscach aktywnych bardzo reaktywny układ ferrylowy, który jest następnie wykorzystywany do przeprowadzenia specyficznej reakcji utleniania substratu. Zakres typów reakcji przeprowadzanych przez ODDs jest bardzo szeroki i obejmuje zarówno stosunkowo proste reakcje, np. hydroksylacja grup alifatycznych, jak i złożone transformacje np. reakcje cyklizacji i ekspansji pierścienia występujące na szlakach biosyntezy antybiotyków β -laktamowych. Z wykorzystaniem metod bioinformatycznych wyszukaliśmy trzy nowe rodzaje ODDs katalizujących złożone reakcje o potencjalnym znaczeniu przemysłowym lub farmaceutycznym, których mechanizmy są bardzo słabo poznane. Reakcje te to utlenianie 2-oksoglutaranu do etylenu, utleniająca deaminacja (kanamycyny) oraz powstawania mostka endonadtlenkowego (w syntezie mykotoksyny – verruculogenu). W ramach tego projektu pragniemy: 1) wyznaczyć modele struktury przestrzennej wybranych ODDs, 2) rzucić nowe światło na ich mechanizm reakcji, przez 3) uzyskać wgląd w czynniki determinujące specyficzność reakcji. Planujemy przeprowadzenie sprzężonych ze sobą badań strukturalnych, biochemicznych i biofizycznych oraz obliczeniowych nad tymi słabo poznanymi grupami ODDs.

U podstaw naszego projektu badawczego leży kilka hipotez. Po pierwsze, zakładamy, że będzie możliwe przeprowadzenie ekspresji, oczyszczania i krystalizacji wybranych do badań ODD. Nasze wyniki wstępne oraz opublikowane dane wskazują, że produkcja i oczyszczanie tych białek jest możliwe. Co więcej, wiele enzymów z tej rodziny zostało już wykrytych i krystalizowanych. Po drugie, zakłada się, że współczesne narzędzia obliczeniowe są wystarczająco precyzyjne do przeprowadzenia znaczących badań nad mechanizmami reakcji enzymatycznych. W tym zakresie, niedawno opublikowane wyniki badań nad innym enzymem zależnym od 2-oksokwau dostarczają argumentu pozytywnie potwierdzającego to założenie.