

Spektroskopické studie bilirubin oxidázy a jejího mutantu

Leona Švecová^{1,2}, Tomáš Koval², Tereza Skálová², Lars Henrik Østergaard³,
Jan Dohnálek²

¹Katedra inženýrství pevných látek, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, České vysoké učení technické v Praze, Břehová 7, 115 19, Praha 1

²Biotechnologický ústav Akademie věd ČR, centrum Biocev, Průmyslová 595, 252 50 Vestec, Česká republika

³Novozymes A/S, Brudelysvej 26, DK-2880 Bagsvaerd, Dánsko

Abstract

Bilirubin oxidáza (BOD) z organismu *Myrothecium verrucaria* je využívána v medicíně pro stanovení množství bilirubinu v krvi při vyšetření jater. Přestože byla krystalová struktura BOD již publikována dříve, neodpovídá na otázku týkající se určení aminokyselin účastnících se přenosu e^- od e^- -poskytujícího substrátu k primárnímu akceptoru e^- . Pro zodpovězení této otázky byl navržen a připraven mutant BOD s lokální mutací aminokyseliny v blízkosti aktivního místa BOD. Spektroskopické studie ukázaly, že navzdory mutaci, zůstala struktura a stabilita vzorku zachována.

Klíčová slova: Bilirubin oxidáza; Církulární dichroismus.

Úvod

Bilirubin oxidáza z rostlinného patogenu *Myrothecium verrucaria* (BOD; EC 1.3.3.5) je schopná katalýzy oxidace širokého spektra organických a některých anorganických látek doprovázené redukcí molekulárního kyslíku na vodu. BOD je známá především díky katalýze oxidace bilirubinu na biliverdin, čehož je využíváno v medicíně při stanovení množství bilirubinu v krvi při vyšetření jater [1].

BOD obsahuje 4 redoxně aktivní ionty mědi v aktivních místech. Tyto ionty Cu jsou děleny na tři typy podle jejich spektroskopických a magnetických vlastností. BOD má celkem dvě aktivní místa - *oxidační* a *redukční*. Oxidační místo obsahuje iont Cu typu I (T1), který je primárním akceptorem elektronů od e^- -poskytující látky. Od T1 jsou e^- transportovány přes cystein-histidinové můstky do redukčního aktivního místa, které obsahuje iont Cu typu II (T2) a 2 ionty Cu typu III (T3). Redukční místo je zodpovědné za redukcí O_2 na H_2O [2].

Přestože byla krystalová struktura BOD již vyřešena a popsána dříve (PDB kód: 2XLL [1], 3ABG [3]), stále zde zůstávají nezodpovězené otázky týkající se mechanismu vazby substrátu a cesty transportu e^- od e^- -poskytující látky k T1. S cílem přiblížit se odpovědím na tyto otázky byl navržen mutant s lokální mutací aminokyseliny v blízkosti oxidačního aktivního místa. Tato práce se zabývá stanovením vlivu mutace na výsledný vzorek a vhodností vzorku pro další studie.

Experiment

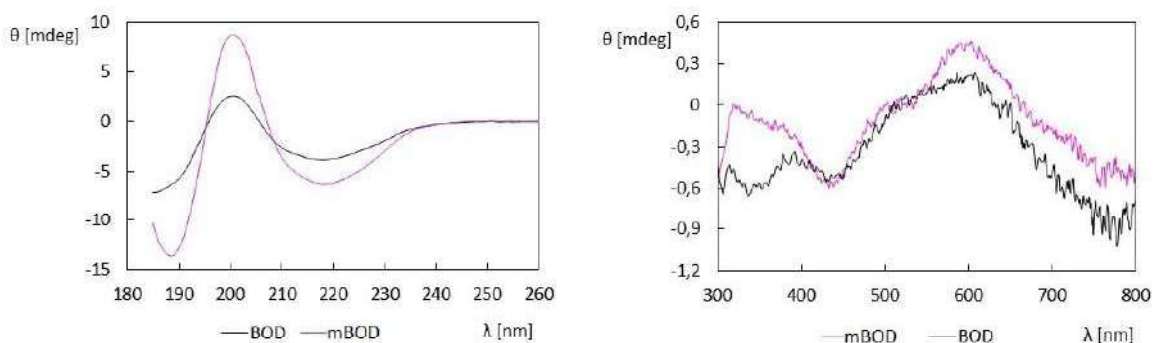
Církulární dichroismus (CD)

Zachování terciární struktury mutantu (mBOD) enzymu BOD bylo studováno pomocí *CD absorpční spektroskopie*. Bylo stanoveno procentuální zastoupení prvků sekundární

struktury a ověřena přítomnost iontů Cu (T1 a T3) v aktivních místech BOD a mBOD. Pro studium terciární struktury bylo použito UV záření o vlnových délkách 186-260 nm a pro ověření přítomnosti kovů záření o vlnových délkách 300-800 nm. Vzorky enzymů byly rozpuštěny v roztoku obsahujícím 20 mM fosfátový pufr pH 7,4 a 100 mM NaCl a jejich koncentrace byla 0,1 mg/ml pro měření v UV oblasti a 3,5 mg/ml v UV/VIS oblasti záření.

Výsledky a diskuze

Změny ve struktuře mutantu mBOD oproti nemutovanému enzymu BOD byly studovány pomocí UV CD absorpční spektroskopie. Procentuální zastoupení prvků sekundární struktury shrnuje tabulka 1. Z výsledků je patrné, že při mutaci nedošlo v terciální struktuře k výrazným změnám. Přítomnost iontů mědi ve strukturách BOD a mBOD byla ověřena pomocí UV/VIS CD absorpční spektroskopie. V obou případech byl pozorován signál při 610 nm odpovídající absorpci iontem Cu T1 a dále signál při 330 nm odpovídající páru iontů Cu T3 spojených pomocí hydroxidového iontu OH⁻ [4]. CD absorpční spektra jsou uvedena na obrázku 1.



Obrázek 1: UV CD (vlevo) a UV/VIS CD (vpravo) absorpční spektrum BOD a mBOD.

Tabulka 1: Procentuální zastoupení prvků sekundární struktury BOD a mutantu mBOD stanovených pomocí UV CD absorpční spektroskopie.

	BOD	mBOD
α -šroubovice (%)	12,3	12,5
β -vlákno (%)	39,5	37,4
β -ohyb (%)	15,4	15,0
smyčka (%)	32,8	35,3

Závěr

Bilirubin oxidáza z rostlinného patogenu *Myrothecium verrucaria* (BOD) patří mezi více-měďné oxidoreduktázy, které využívají 4 redoxně aktivní ionty Cu kovalentně navázané ve

strukturu k přenosu e^- od e^- -poskytující látky ke konečnému akceptoru e^- (O_2). Cesta transportu e^- přes ionty Cu byla podrobně studována a popsána. Nicméně cesta e^- od e^- -poskytující látky k primárnímu iontu mědi (T1) dosud popsána nebyla.

S cílem objasnit tuto cestu byla navržena lokální mutace aminokyseliny (v blízkosti aktivního místa BOD), podezřelá z účasti na transportu e^- . Zachování terciární struktury BOD a jejího mutantu mBOD a přítomnost iontů mědi byla ověřena pomocí CD absorpční spektroskopie. Experimentálně bylo prokázáno, že mutací nedošlo k významné změně struktury oproti nemutovanému enzymu. Na základě těchto výsledků lze doporučit vzorek mutantu k další analýze a ke studiu enzymatické aktivity, která by měla jeho roli při transportu e^- prokázat.

Reference

- [1] J. A. Cracnell, et al. Bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria*: X-ray determination of the complete crystal structure and a rational surface modification for enhanced electrocatalytic O_2 reduction. *Dalton Trans* **40**: 6668-6675, 2011.
- [2] D. J. Kosman. Multicopper oxidases: a workshop on copper coordination chemistry, electron transfer, and metallophysiology. *J Biol Inorg Chem* **15**: 15-28, 2010.
- [3] K. Mizutami, et al. X-ray analysis of bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria* at 2.3 Å resolution using a twinned crystal. *Acta Cryst* **F66**: 765-770, 2010.
- [4] H. Morishita, et al. Study on dioxygen reduction by mutational modifications of the hydrogen bond network leading from bulk water to the trinuclear copper center in bilirubin oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* **450**: 767-772, 2014.

Poděkování

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou Českého vysokého učení technického v Praze (grant č. SGS16/246/OHK4/3T/14), projektem BIOCEV (CZ.1.05/1.1.00/02.0109), projektem Strukturální dynamika biomolekulárních systémů (CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000447) z Evropského fondu pro regionální rozvoj, Grantovou agenturou České republiky (grant č. 14-36566G) a institucionální podporou AV ČR, v. v. i. RVO: 86652036.