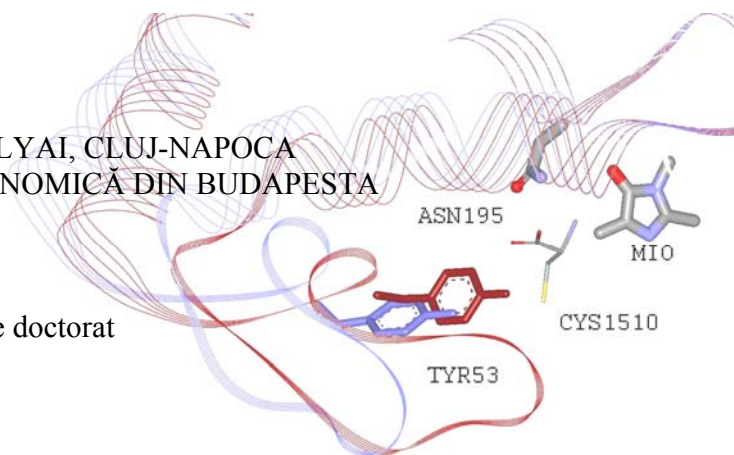


UNIVERSITATEA BABES-BOLYAI, CLUJ-NAPOCA
UNIVERSITATEA TEHNICĂ ȘI ECONOMICĂ DIN BUDAPESTA

Rezumatul tezei de doctorat



Seff Amalia-Laura

ANALIZA COMPUTAȚIONALĂ A REACȚIILOR CATALIZATE DE ENZIME

Conducători Științifici:

Prof. Dr. Ioan Silaghi-Dumitrescu[†]

Prof. Dr. László Poppe

Acad. Prof. Dr. Ionel Haiduc

Juriu

Președinte

Conf. Dr. Cornelia Majdik

Referenți:

Prof. Dr. Paul Mezey, Memorial University of Newfoundland, Canada

CR1 (CNRS) Dr. Dragoș Horvath, University of Louis Pasteur Strasbourg, France

Conf. Dr. Radu Silaghi-Dumitrescu, Universitatea Babes-Bolyai, Cluj-Napoca

Susținere publică:

9 iulie, 2010

Cluj-Napoca

Cuprins

Lista de abrevieri.....	3
Cuvinte cheie	3
Introducere	4
1. Date de literatură.....	5
1.1. Amoniu-liazele	5
1.1.1 Structurile amoniului-liazelor.....	5
1.1.2 Mecanismul de reacție a PAL, HAL și TAL.....	7
CONTRIBUȚII ORIGINALE	9
2. Modele și metode.....	9
2.1. Modelare prin omologie	9
2.2. Analiza conformațională în enzima rigidă.....	9
2.2.1 Analiza conformațională efectuată în structura rigidă PAL din pătrunjel modificată parțial.....	9
2.2.2 Analiza conformațională de tip 2 pentru intermediarii legați covalent substrate-MIO în structura parțială a 1GKM _{mod}	10
2.3. Optimizarea geometriilor intermediarilor covalenți, a L-histidinei și (E)-urocanatului în situsul catalitic al enzimei HAL.....	12
2.3.1 Optimizarea geometriei după al doilea tip de analiză conformațională	12
2.4. Calcule DFT pe liganzi în reacții catalizate de HAL.....	13
3. Rezultate și discuții.....	15
3.1. Structurile active ale amoniului-liazelor	15
3.1.1 Modelarea conformațiilor active ale PAL	15
3.1.2 Modelarea conformațiilor active ale structurilor HAL.....	17
3.2. Studiul computațional al histidin amoniului-liazei: o conformație cu buclă modificată și rolul ionului de Zn (II).....	19
3.2.1 Construirea unui situs catalitic închis a 1GKM HAL pentru calcule.....	19
3.2.2 Comparația conformațiilor intermediarilor covalenți a reacției HAL cu aranjamentele substratului și produsului	20
3.2.3 Rolul ionului de Zn(II) în reacția catalizată de HAL	25
Concluzii.....	29
Lista de publicații.....	31
Bibliografie selectată	33

Lista de abrevieri

1B8F _{mod}	Structură parțial modificată a enzimei histidinamoniu-liază (1B8F)
1GKM _{mod}	Structură parțial modificată a enzimei histidină amoniu-liază inhibată de L-cysteine (1GKM)
1W27 _{mod}	Structură parțial modificată a enzimei fenilalanină amoniu-liază (1W27)
B3LYP	Funcțională hibridă cu trei parametri a lui Becke combinată cu funcțională de corelare Lee-Yang-Parr
CS	Analiză conformațională sistematică
DFT	Teoria funcționalelor de densitate
E ₁ cB	Mecanismul de eliminare a amoniacului prin adiție Michael
EC	Sistemul de numerotare elaborată de Comisia de Enzimologie
FC	Mecanism de tip Friedel-Crafts
HAL	Histidin amoniu-liaza
MIO	Grupare 3,5-dihidro-5-metiliden-4 <i>H</i> -imidazol-4-on
MM	Mecanică moleculară
<i>N</i> -MIO	Intermediar covalent al reacției HAL legat la gruparea MIO prin gruparea amino a L-histidinei
PAL	Fenilalanin amoniu-liaza
PAM	Fenilalanin-2,3-aminomutaza
PDB	Baza de date a structurilor de proteine Brookhaven
PI	Inhibitor fosfonat 2-aminoindan
TAL	Tirozin amoniu-liaza
TAM	Tirozin-2,3-aminomutaza
QM	Metoda mecanică cuantică
QM/QM	Metode hibride de mecanică cuantică

Cuvinte cheie: fenilalanin amoniu-liaza • histidin amoniu-liaza • modelare prin omologie • analiză conformațională • docking • DFT • Zn²⁺

Introducere

Investigarea mecanismelor de reacție catalizate de enzime prin modelarea computațională a avansat semnificativ în ultimii ani. Metodele de modelare computațională pot investiga câteva întrebări importante asupra mecanismului și catalizei enzimatice, întrebări care nu pot fi studiate cu ușurință prin experiment.

Enzimele PAL, HAL și TAL catalizează eliminarea de amoniac din L-fenilalanină, L-histidină și din L-tirozină atunci când se formează acidul (*E*)-cinamic, acidul (*E*)-urocanic și acidul (*E*)-cumaric. Aceste amoniu-liaze necesită prezența grupării prostetice electrofile MIO. Structurile cristaline găsite pentru PAL și HAL prezintă bucla Tyr, importantă din punctul de vedere a mecanismului, într-o poziție deschisă (PAL, cod PDB: 1W27), parțial deschisă (HAL) sau chiar lipsă (PAL, cod PDB: 1T6P), conformații care nu pot fi studiate computațional.

S-a observat că o serie de ioni de metal diferiți, precum Cd^{2+} , Mn^{2+} sau Zn^{2+} pot mări activitatea enzimei HAL. Aceste date experimentale au fost motivul pentru care, în timpul studiilor doctorale, am analizat situsul catalitic al structurii cristaline parțial modificate a enzimei HAL în prezența ionului de Zn^{2+} .

Pe parcursul studiilor doctorale, am vrut să verificăm următoarele aspecte care sunt incluse în analiza mecanismului de reacție catalizată de amoniu-liaze utilizând diferite metode computaționale:

- primul pas a fost să construim *in silico* structuri parțial modificate pentru enzimele PAL și HAL pornind de la structurile cristaline cunoscute care conțin situsuri catalitice închise și compacte;
- analiza conformațională sistematică a substratului legat covalent de gruparea MIO efectuată în situsul catalitic al structurilor cristaline parțial modificate a fost o altă parte a acestui studiu;
- determinarea orientării posibile a structurii geometrice a substraturilor și a produșilor în centrul catalitic închis a PAL/HAL utilizând optimizarea geometrică și „docking”-ul liganzilor;
- calcule asupra complexării în formă Th/Tbp a ionului de Zn^{2+} în prezența substratului L-histidină în situsul catalitic al enzimei HAL în conformație închisă;
- determinarea acidității protonului *pro*-(*S*) β din L-histidină, L-4-nitro-histidină și din complexul Zn^{2+} prin calcule la nivel de teoria funcționalei de densitate (DFT **D**ensity **F**unctional **T**heory). Aici ionul de Zn(II) poate avea un efect mare asupra acidității protonului *pro*-(*S*) β și pe această cale acesta poate fi extras mult mai ușor de către o bază.

1. Date de literatură

1.1. Amoniu-liazele

1.1.1 Structurile amoniu-liazelor

Deoarece PAL, HAL and TAL catalizează reacții aproape identice (în care eliminarea amoniacului are loc din amino acizii cu cicluri aromatice conducând la formarea de acizi nesaturați α,β), aceste enzime au structuri similare. Asemănarea structurilor cristaline este prezentată în Figura 1A, B, C și D, și Figura 2A, B și C).

HAL, PAL și TAL conțin 4 situsuri catalitice în fiecare homotetrimer. Fiecare monomer din structura enzimei are o buclă internă și o alta externă în regiunea Tyr. Fiecare buclă internă din monomeri se află în aceeași regiune cu bucla externă a monomerului următor, care este orientat în direcția opusă.

Structura de raze-X¹ a tirozină amoniu-liazei – (*Rhodobacter sphaeroides*, cod PDB: 2O7B, Figura 1D) – prezintă o conformație mult mai apropiată și compactă a regiunii de buclă de interes (Figura 1H), ca și în cazul structurii cristaline găsite pentru enzima HAL din bacterie (*Pseudomonas putida*, cod PDB : 1B8F, Figura 1A)², unde bucla internă din din situsul catalitic (Figura 1E) nu este complet închisă și unde bucla externă nu poate fi identificată. În cazul structurii PAL din pătrunjel³ (*Petroselinum crispum*, cod PDB: 1W27, Figura 3C), conformația regiunii de buclă conținând Y110 din situsul catalitic (Figura 1G, 2A) este deschisă și inactivă, în comparație cu structura de raze-X⁴ a PAL din drojdie (*Rhodospiridium toruloides*, cod PDB: 1T6P, Figura 1B), în care regiunea de buclă Y110 (secvența Q104 - T122 din bucla internă și secvența H345 - R359 din bucla externă) lipsește (Figura 1F).

Structura PpHAL din bacterie (cod PDB: 1GKM)⁵ prezintă un situs catalitic parțial deschis, accesibil solventului (Figura 2B). Toate cele șase structuri cristaline determinate pentru HAL până acum conțin Tyr53, importantă din punct de vedere catalytic, într-o conformație de buclă parțial deschisă. Acesta ar putea fi motivul pentru care aceste structuri nu pot reține substratul sau liganzii analogi ai produșilor. Doar structura cristalină 1GKM a HAL (inhibată cu L-cisteină) a fost determinată în prezența unui inhibitor în centrul catalitic.

Eliminarea nonoxidativă a amoniacului din substraturi, reacție catalizată de către HAL, PAL și TAL necesită prezența grupării electrofile prostetice 3,5-dihidro-5-metiliden-4H-imidazol-4-on (MIO).^{6,7}

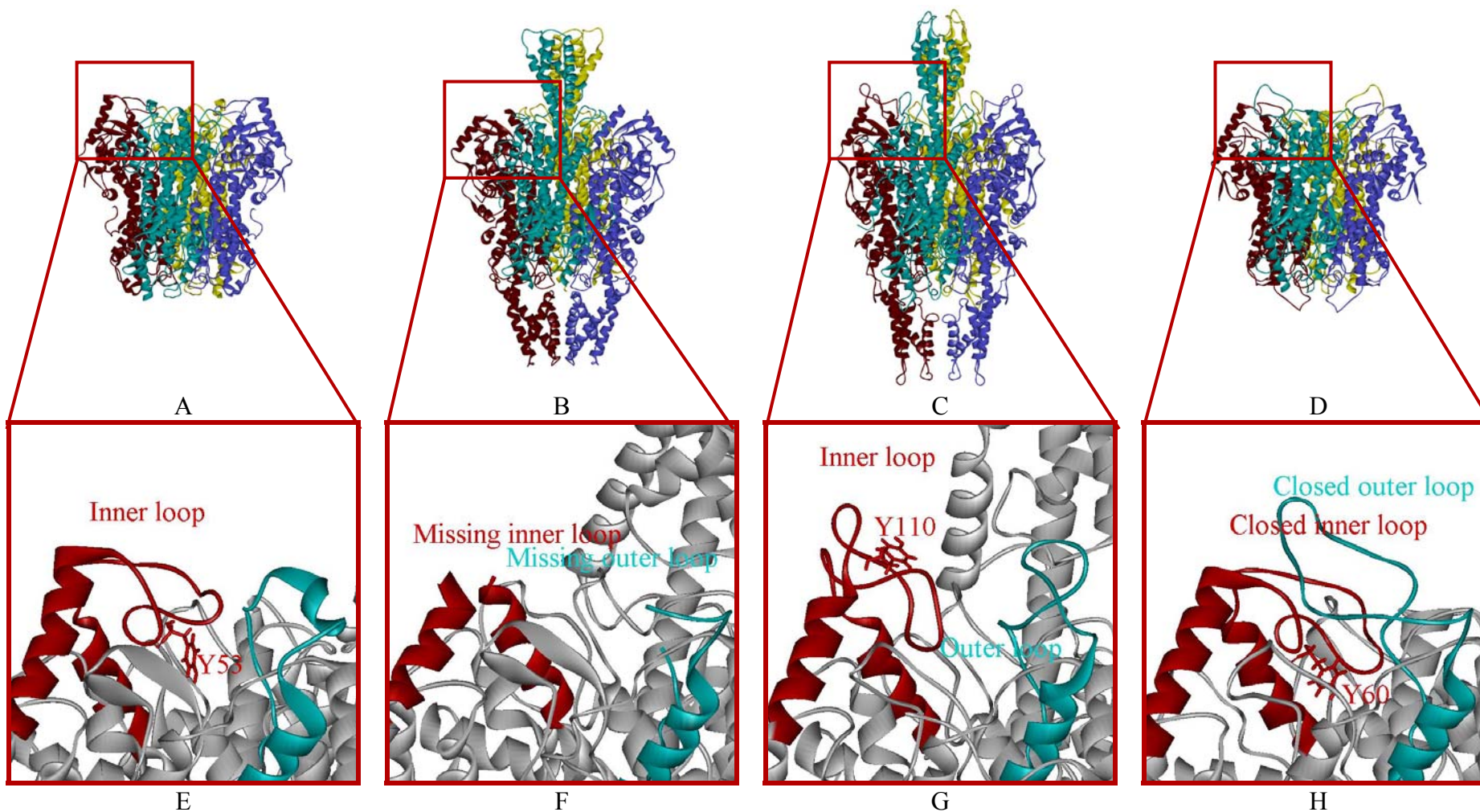


Figura 1. Reprezentarea ribbon a homotetramerului *Pp*HAL (cod PDB 1B8F) (A), a homotetramerului *Rt*PAL (cod PDB 1T6P) (B), a homotetramerului *Pc*PAL (cod PDB 1W27) (C) și a homotetramerului *Rs*TAL (cod PDB 2O7B) (D) prezentând subunitățile A (galben), B (violet), C (verde) și D (roșu); Reprezentarea grafică a regiunii aminoacizilor Tyr (model stick) în structurile cristaline a (E) *Pp*HAL (cod PDB 1B8F), (F) *Rt*PAL (cod PDB 1T6P), (G) *Pc*PAL (cod PDB 1W27) și (H) *Rs*TAL (cod PDB 2O7B), o parte a lanțurilor D (roșu) și C (verde).

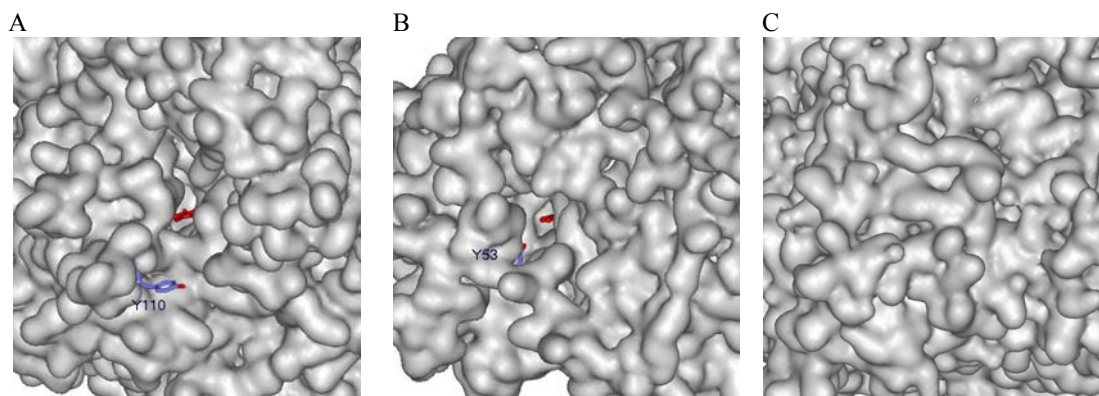


Figura 2. Compararea canalelor de intrare a substratului către gruparea MIO (roșu) din structurile amoniu-liaze. Reprezentarea suprafeței moleculare a structurilor (A) *PcPAL* (cod PDB 1W27), (B) *PpHAL* (cod PDB 1GKM) și (C) *AvPAL* (cod PDB 3CZO). Aminoacizii analogi de Tyr110 (A) și Tyr53 (B) sunt prezentate ca și model stick în situsurile catalitice parțial deschise a structurilor amoniu-liaze.

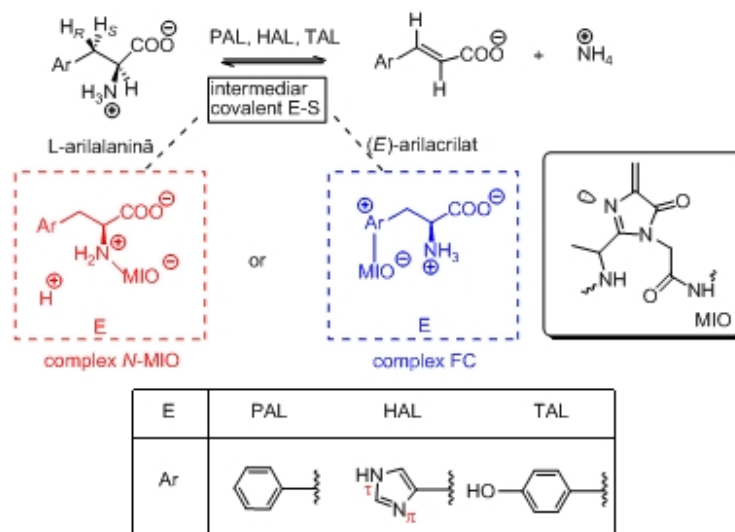
Structura de raze X apărută recent (PDB code: 3CZO),⁸ determinată pentru *Anabaena variabilis* PAL (*AvPAL*), conține cel mai compact situs catalitic în care amino acidul Tyr78 și gruparea prostetică MIO sunt incluse în totalitate și nu este accesibil pentru solvent (Figura 2C).

1.1.2 Mecanismul de reacție a PAL, HAL și TAL

Similaritatea grupării MIO sugerează cum că HAL (EC 4.3.1.3), PAL (EC 4.3.1.24) și TAL (EC 4.3.1.23) se comportă similar în timpul reacțiilor catalizate de amoniu-liaze. HAL, PAL și TAL ar trebui să extragă protonul non-acidic *pro-(S)* β din substraturile lor, fără să extragă protonii cu aciditate mai ridicată din grupările aminice a L-amino acizilor corespunzători. Pe baza datelor biochimice două mecanisme diferite au fost propuse pentru reacțiile (Schema 1) catalizate de amoniu-liaze.

Conform lui Hanson și Havar,⁹ adiția Michael (Schema 1, colorat în roșu) a grupării aminice a substratului către gruparea electrofilă prostetică MIO a enzimei are loc.

Tipic pentru acest mecanism este formarea unui intermediar covalent E-S (i.e. intermediar *N*-MIO, Schema 1), unde gruparea aminică a substratului este legat covalent de partea metilenică a grupării electrofile prostetice MIO ceea ce facilitează reacția datorită formării unei grupări de plecare mai bună.^{9,10}



Schema 1. Ecua\u021bia reac\u021biilor catalizate de aminiu-liazele con\u021bin\u0103toare de gruparea MIO. [Atomii de azot a inelului imidazol a L-histidinei \u0219i (E)-urocanatului sunt prezentate conform IUPAC cu *pros* (“near”, π) \u0219i *tele* (“far”, τ)]

Datorit\u0103 dificult\u0103\u021cii necesar\u0103 \u00een cazul mecanismului acestuia de a extrage protonul non-acidic *pro-(S)* β de c\u0103tre o baz\u0103 enzimatic\u0103 \u00een timpul elimin\u0103rii amoniacului, s-a sugerat de c\u0103tre R\u00e9tey un mecanism alternativ care include un atac de tip Friedel-Crafts (FC) la inelul aromatic a substraturilor de c\u0103tre gruparea electrofil\u0103 prostetic\u0103 MIO.¹¹ Aceasta implic\u0103 un intermediar de complex σ (Schema 1, colorat \u00een albastru) format \u00een\u021tre inelul aromatic \u0219i MIO.

CONTRIBUȚII ORIGINALE

2. Modele și metode

2.1. Modelare prin omologie

Metoda modelării prin omologie a fost folosit de către noi deoarece am avut nevoie de forma închisă (forma catalitic activă) a regiunii buclă internă, conținătoare de Y important, a structurilor de amoniu-liaze și structurile cristaline (PAL 1W27,³ HAL 1B8F,² 1GKM⁵) a PAL și HAL au fost determinate cu situsurile catalitice deschise sau parțial deschise (cu o conformație non-activă a buclei interne). Structurile de reze-X 1W27 determinată pentru PAL, 1B8F și 1GKM determinate pentru HAL nu se puteau folosite la investigarea computațională în situsurile catalitice. Obiectivul nostru a fost să modificăm doar a mică secvență de amino acizi în regiunea buclei internă care este în formă deschisă/parțial deschisă. Pentru modelarea prin omologie sa utilizat serviciul de modelare prin omologie automată Swiss-Model.^{12,13,14,15,16,17} Am luat în considerare identitatea de secvențe amino acidice între structura cristalină de interes și template.

2.2. Analiza conformațională în enzima rigidă

2.2.1 Analiza conformațională efectuată în structura rigidă PAL din pătrunjel modificată parțial

Structura de pornire a ligandului pentru analiza conformațională sistematică (CS) a fost construit din structura de inhibitor acid 2-aminoindan-2-fosfonic (PI) legat de MIO *via* atomul lui de N (din structura 2O7E).

Ligandul PI a fost introdus în structura 1W27_{mod} PAL și pentru studiul nostru o sferă de 15Å în jurul grupării prostetice MIO a fost folosit din modelul situsului catalitic. Apoi, atomi de hidrogen au fost adăugați la amino acizii de periferie a modelului nou de situs catalitic (unde s-a efectuat tăierea) prin procedura standard HyperChem¹⁸. Așadar părțile C- și N-termini de la tăiere au fost completate formând grupări amino și de aldehide. Gruparea MIO a fost corectată manual.¹⁸ 3 unghiuri de torsiune a ligandului au fost variate pentru modelul N-MIO în timpul CS a fenilalaninei legat covalent de gruparea MIO într-o ambianță rigidă de enzimă (fără molecule de apă). Analiza conformațională a fost efectuată folosind modulul CS¹⁸ implementat în

HyperChem cu setările de bază (câmp de forță MM+; gradient: 0.1 kcal/mol; metoda Polak-Ribiere; limite: 300 iterații, 150 optimizări, 15 conformații; opțiuni test: "skip if atoms are closer than 0.3 Å").

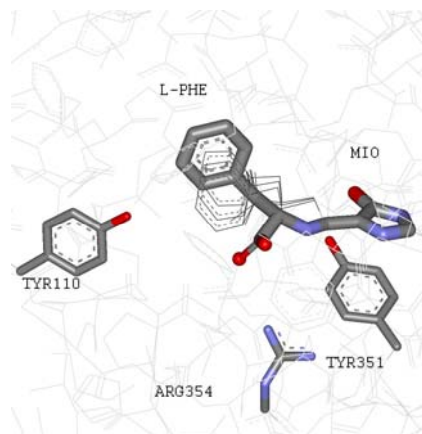


Figura 3. Rezultatele analizei conformaționale pentru intermediarul *N*-MIO a substratului natural în modelul PAL. Modelul tub arată conformerul intermediarului *N*-MIO cu cea mai bună energie, iar ceilalți conformeri sunt prezentați cu modele wireframe.

Conformerul cu cea mai bună energie a fost selectat (Figura 3), care a fost totodată în concordanță cu aranjamentul (gruparea aromatică către Leu138 și gruparea carboxilică este în vecinătatea amino acidului Arg354) găsit în structurile experimentale inhibate a TAL, pentru fiecare model de intermediar covalent. Modelul situsului catalitic *N*-MIO inițial a fost construit prin înlocuirea părții PI-MIO a modelului de situs catalitic *Pc*PAL(1W27)/PI cu aranjamentele de ligand rezultate din CS.

2.2.2 Analiza conformațională de tip 2 pentru întemediarii legați covalent substrate-MIO în structura parțială a 1GKM_{mod}

Două analize conformaționale separate au fost efectuate pentru fiecare intermediar legat covalent [modelele *N*-MIO, (*S,S*)-FC și (*R,S*)-FC], intermediarii fiind protonați la atomul de azot π sau la cel τ a inelului imidazol (seriile $N_{\pi H}$ și $N_{\tau H}$ a conformerilor). Cele șase calcule CS, incluzând ligandul și gruparea MIO [28 de atomi în modelul *N*-MIO și 29 de atomi în modelele (*S,S*)-FC / (*R,S*)-FC] au fost executate într-o ambianță rigidă de enzimă fără molecule de apă. Trei unghiuri de torsiune [de-a lungul axelor $C_{(MIO-C5)}-C_{(MIO-CH2)}$, $C_{(MIO-CH2)}-N_{(HisL)}$, $N_{(HisL)}-C_{(HisL-C\alpha)}$] au fost variate în timpul calculelor CS pentru modelul *N*-MIO, și 4 [de-a lungul axelor $C_{(MIO-C5)}-C_{(MIO-}$

CH₂), C_(MIO-CH₂)-C_(HisL-C₄), C_(HisL-C₅)-C_(HisL-C_β) și C_(HisL-C_β)-C_(HisL-C_α)] pentru modelele (*S,S*)-FC și (*R,S*)-FC. Analizele conformaționale au fost efectuate folosind modulul CS¹⁸ din HyperChem cu setările de bază (câmp de forță MM+; gradient: 0.1 kcal/mol; metoda Polak-Ribiere, limite: 300 iterații, 150 optimizări, 15 conformații; opțiuni test: "skip if atoms are closer than 0.3 Å").

Conformerii rezultați a intermediarilor covalenți obținuți în urma analizei conformaționale sistematice sunt prezentate în Figura 4.

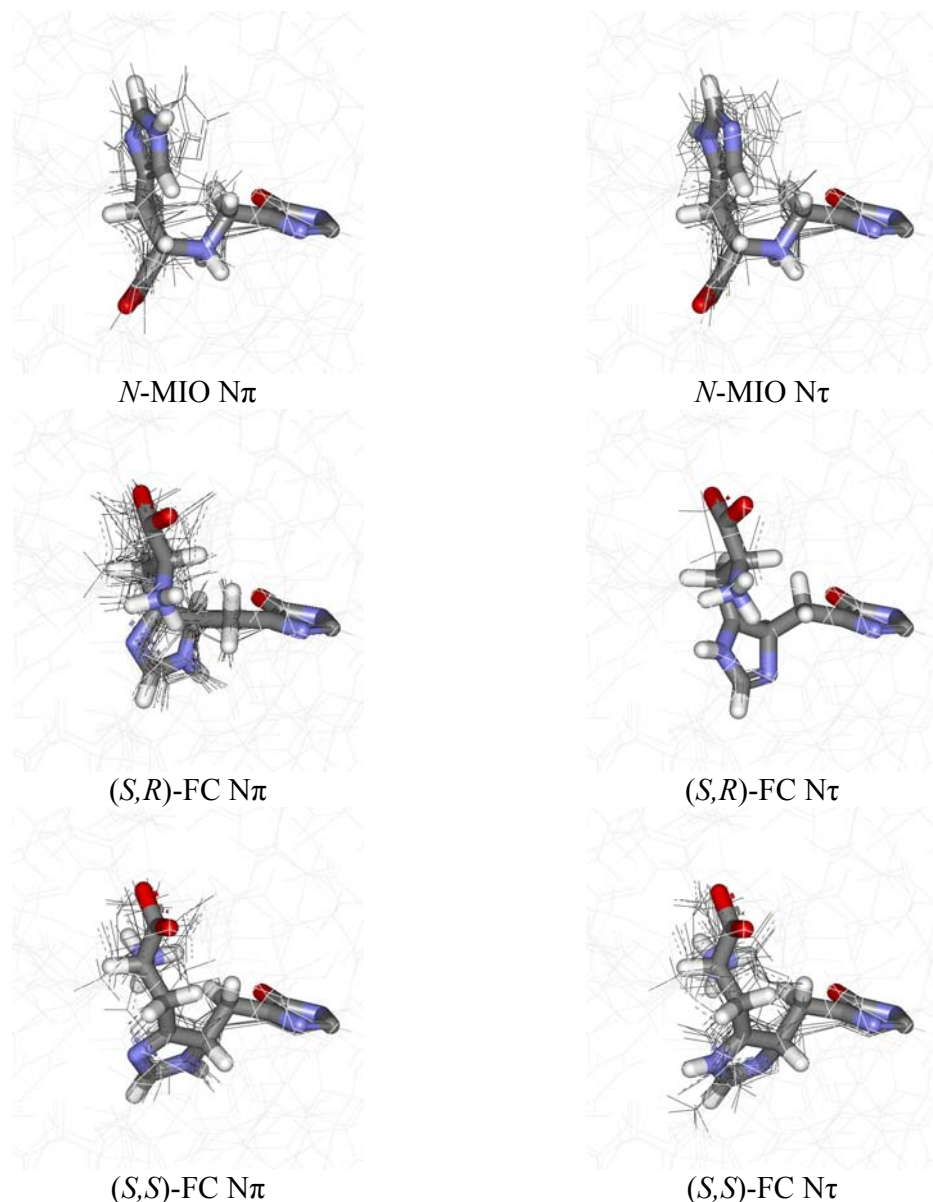
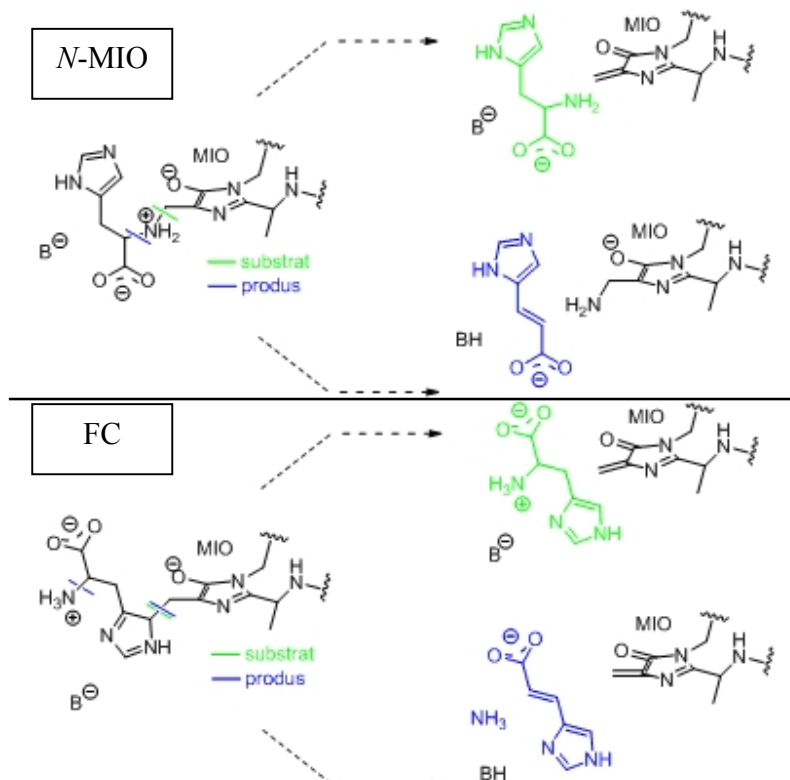


Figura 4. Rezultate obținute în urma analizei conformaționale de tip 2 (CS) a intermediarilor covalenți *N*-MIO, (*S,R*)-FC și (*S,S*)-FC.

2.3. Optimizarea geometriilor intermediarilor covalenți, a L-histidinei și (E)-urocanatului în situsul catalitic al enzimei HAL

2.3.1 Optimizarea geometriei după al doilea tip de analiză conformațională

Structurile L-histidinei și (E)-urocanatului au fost construite rearanjând legăturile, din conformerii intermediarilor covalenți care prezentau o conformație liniară a catenei principale [conformerii N-MIO : ($N_{\pi H}$: c1-c3, c5, c8, c9, c11; $N_{\sigma H}$: c1-c4, c6, c9, c10) Schema 2; conformerii (R,S)-FC : ($N_{\pi H}$: c2, c4, c5, c7-c9; $N_{\sigma H}$: c2) și conformerii (S,S)-FC ($N_{\pi H}$: c1-c2; $N_{\sigma H}$: c2) Schema 2].



Schema 2. Construirea geometriei de input a L-histidinei (verde) și (E)-urocanatului (albastru) conținând situsuri catalitice, plecând de la modelul intermediarului FC al HAL

În toate structurile substratului, intermediarului și produsilor, ligandul atașat la MIO (substratul, intermediarul) sau NH₂-MIO (produsul) și His83, Tyr280, Tyr53, Asn195, Gln277, Glu414, Arg283 și Phe329 (în total 116 atomi) au fost optimizați în cadrul unei porțiuni sferice (2221 atomi) a structurii 1GKM_{mod}, menținând partea neoptimizată rigidă. Optimizările au fost realizate cu câmpul de forță MM+ implementat în programul HyperChem¹⁸ la setările de bază (gradient: 0.1 kcal/mol; metoda Polak-Ribiere).

Pentru dockingul diferiților liganzi în situsul catalitic al 1W27_{mod} PAL s-a utilizat programul Arguslab.¹⁹

În cazul structurii 1GKM_{mod}, pentru dockingul L-histidinei zwitterionice, Tyr53 și Tyr280 au fost deprotonate și s-au variat 4 unghiuri de torsiune (de-a lungul axelor C₅-C_β, C_β-C_α, C_α-N și C_α-C_{COO-}), iar pentru dockingul (*E*)-uroconatului, s-au folosit forme protonate de Tyr53 și Tyr280. Sarcini Gasteiger au fost adăugate pe atomii de pe interfețele de legare folosite pentru docking, cu ajutorul softului AutoDock.

2.4. Calcule DFT pe liganzi în reacții catalizate de HAL

Au fost realizate calcule DFT pe modele ale L-histidinei și L-4-nitrohistidinei (amândouă conținând grupări amino protonate), pentru conformații corespunzând stării legate a HAL, folosind un model parțial al intermediarului *N*-MIO (obținut prin înlocuirea ciclului MIO din structura calculată cu un atom de hidrogen pe carbonul metilenic exociclic al MIO) și un model parțial al situsului catalitic incluzând structura intermediarului *N*-MIO coordinat la ionul de Zn²⁺ care este de asemenea coordinat de grupări His83 și Me382 și o moleculă de apă. Optimizările DFT au fost rulate folosind Gaussian 09 (rev. A.1.)²⁰ și GaussView²¹. Două structuri de L-histidină încărcate pozitiv (cu COOH și NH₃⁺) au fost construite din modelele *N*-MIO (din conformațiile C5 și C4 ale seriilor N_rH și N_πH pentru CS). Din acestea s-au construit două modele cu sarcină pozitivă pentru zwittero-histidină, înlocuind atomul de H de pe C4 al grupării imidazol cu o grupare nitro).

În modelele complexilor de Zn²⁺, ionul metalic poate avea 4 sau 5 liganzi: gruparea imidazol a ligandului *N*-MIO (N_{πH}) prin atomul N (conformerul C4 al seriei *N*-MIO N_{πH}, cu o grupare -NH₂(CH₃)⁺ ca model pentru gruparea amino legată de MIO tăiat între ciclul MIO și carbonul exociclic), un 4-metil-1H-imidazol (coordinat prin N_r și făcând parte din His83), dimetil sulfură (coordinat prin atomul de S și făcând parte din Met382) și o moleculă (pentru Th) sau două (pentru Tbp) de apă. Pentru a menține conformația ligandului histidinic legat de MIO, permisă în situsul catalitic al HAL s-au folosit constrângeri. Pentru modelele complexului Zn²⁺, s-au înghețat mai multe poziții atomice [în Modelul 1: un oxigen al grupării carboxilice din ligandul His (cel mai aproape de Arg283), atomul de carbon al grupării metil din 4-metil-imidazol (de pe His83); în Modelul 2: atomii din modelul 1 plus un atom de carbon de pe dimetil sulfură (carbonul C_γ al Met382); în Modelul 3: atomii din modelul 1 plus un atom de carbon din

gruparea metilen a MIO; în Modelul 4: atomii din modelul 1 plus un atom de C de pe dimetil sulfură, C_γ al Met382) și gruparea metilen a MIO.

Optimizările geometriilor pentru cele două tipuri de structuri ale L-histidinei, L-4-nitrohistidinei și complexii Zn²⁺ tetraedrici sau trigonal bipiramidali au fost realizate cu metode DFT utilizând funcționala hibridă triparametrizată a lui Becke combinată cu funcționala de corelație Lee-Yang-Parr, (B3LYP)^{22,23} cu seturi de baze 6-31G sau 6-31G(d,p). După optimizare s-a realizat analiza vibrațională la același nivel și s-au calculat energiile SP cu un set de baze mai mare (6-311+G(d,p) pentru Zn²⁺, cele două cicluri imidazolice, –S-CH₃ din Met382 și pentru moleculele de apă și 6-31G(d) pentru restul atomilor din model.

3. Rezultate și discuții

3.1. Structurile active ale amoniu-liazelor

3.1.1 Modelarea conformațiilor active ale PAL

Pe baza structurilor HAL,² a fost construită o structură modificată a enzimei PAL din pătrujel, care are un centru catalitic mai închis decât cel din structura determinată în stare solidă.^{8,24} Recent s-a caracterizat prin difracție de raze X structura TAL,¹ în care regiunea de buclă are o conformație compactă și deci are un situs catalitic mai compact.

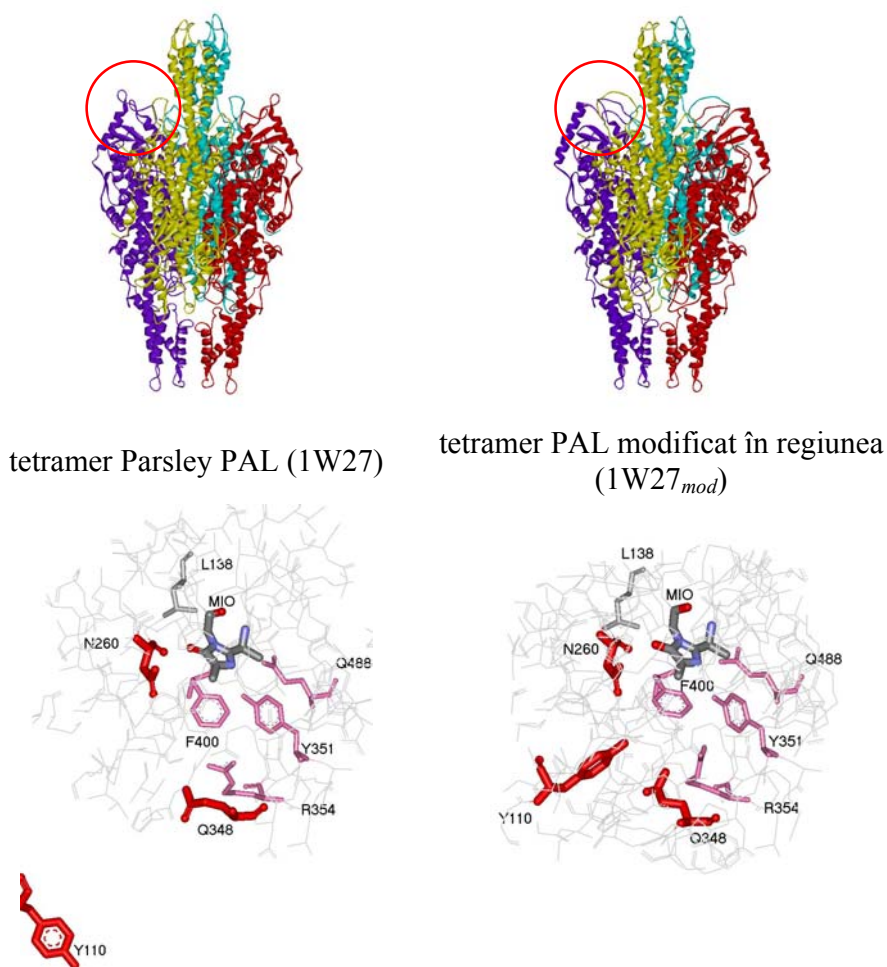


Figura 5. Tetrameri PAL și situsurile catalitice a acestora

Pe baza structurii TAL (cod PDB: 207B),¹ am construit un nou model pentru PAL cu regiunea loop modificată,²⁵ care are aminoacidul Tyr110 încorporat în situsul catalitic. Tetramerii structurii cristaline a PAL și modelul PAL sunt reprezentați în Figura 5. O comparație

mai detaliată a celor două situsuri catalitice PAL arată că amino acidul Tyr110 poate avea două orientări diferite.

În modelul nostru, Tyr110 este orientat către MIO, în timp ce în structura cristalină este departe de situsul catalitic (Figura 5).

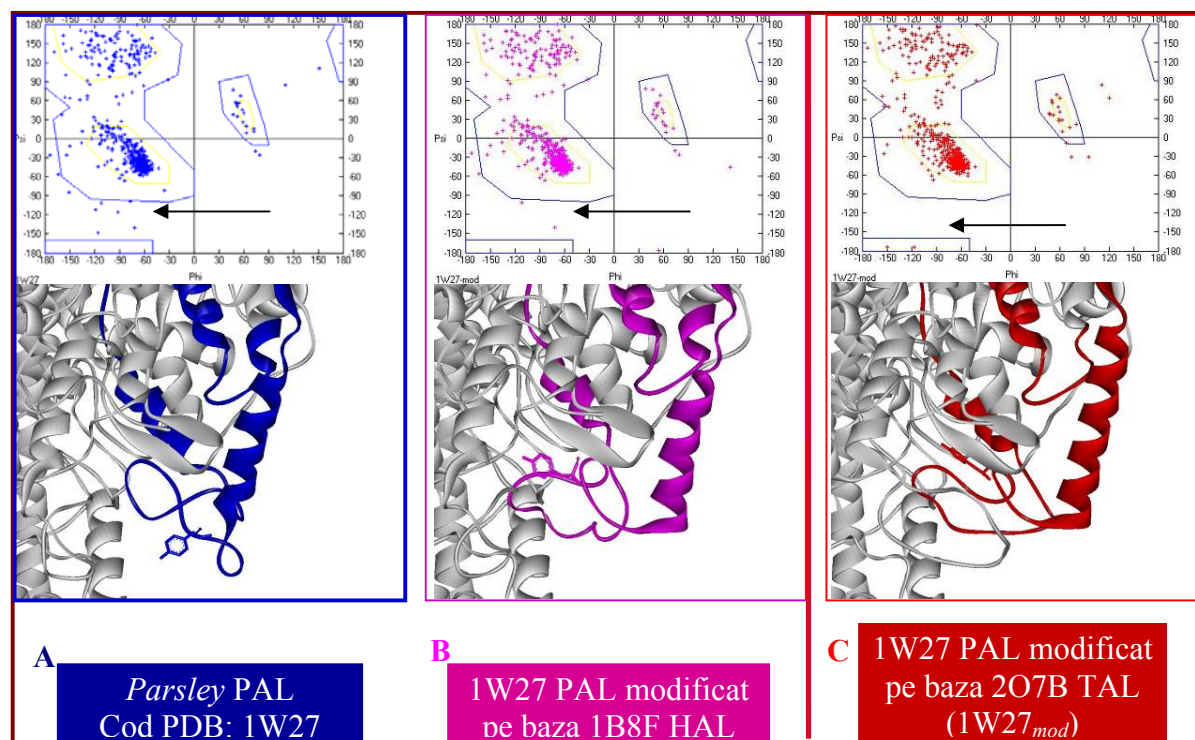


Figura 6. Reprezentarea structurilor *Petroselinum crispum* PAL determinată experimental 1W27 (albastru) și modificată plecând de la 1B8F HAL (roz) și 2O7B TAL (roșu). Graficul Ramachadran al monomerilor este dat pentru fiecare structură.

Structura parțial modificată PAL din pătrunjel (1W27_{mod}, Figure 6C) are cea mai închisă regiune buclă, respectiv un situs catalitic compact.

În urma construirii *in silico* a modelului PAL folosind șablonul TAL, o structură cristalină nouă a apărut pentru enzima PAL *Anabaena variabilis* (cod PDB: 3CZO),⁸ în care regiunea de buclă Tyr esențial pentru reacție este cel mai închis și compact dintre structurile cristaline a amoniu-liazelor. Analiza modelului PAL bazat pe șablonul TAL a arătat o bună potrivire a regiunii buclă Tyr cu cea din structura 3CZO.

Notabil, amino acidul Tyr110 din modelul 1W27_{mod} PAL, C, este într-o poziție mai bună comparativ cu poziția găsită în cazul. Acest lucru se poate explica cu structura compactă a regiunii buclă Tyr, important din punct de vedere a reacției, a șablonului TAL. Analiza

Ramachandran Plot a monomerilor la structura experimentale a PAL (1W27) din pătrunjel, la structura modificată a PAL bazat pe șablonul 1B8F HAL, respectiv la 1W27_{mod} PAL, a indicat că dintre 716 de amino acizi a unei subunități a structurii experimentale 1W27 12 amino acizi (șase în regiunea buclă Y110), în regiunea buclă Y110 a structurii 1W27 modificată utilizând șablonul 1B8F HAL opt amino acizi (numai două în regiunea buclă Y110), dar în regiunea buclă Y110 a structurii 1W27_{mod} doar patru amino acizi (niciuna din ele) sunt excluse din combinațiile Phi/Psi (Figure 6).

3.1.2 Modelarea conformațiilor active ale structurilor HAL

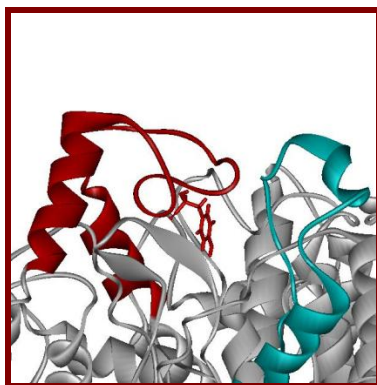
3.1.2.1 Conformația activă a structurii bacteriene 1B8F *Pp*HAL

Histidin amoniu-liaza (HAL, E.C. 4.3.1.3) este o enzimă importantă în degradarea histidinei din diverse bacterii.²⁶ Eliminarea grupării α -amino, prima etapă a degradării histidinei este catalizată de către HAL iar produsul este *trans*-urocanat α - β -nesaturat. Urocanatul este cunoscut ca și agent de protecție contra radiațiilor solare în piele.²⁷ Absența HAL la oameni conduce la boala numită histidinemie.²⁸

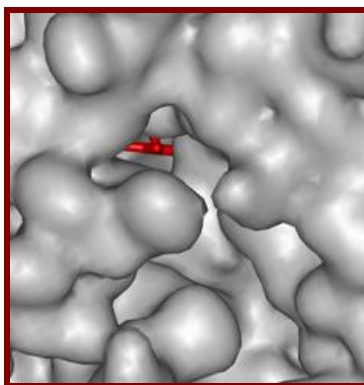
Structura cristalină a HAL bacterian din *Pseudomonas putida* (cod PDB 1B8F) determinată la o rezoluție de 2.1Å prezintă un situs catalitic parțial deschis, accesibil solventului (Figura 7B) și care conține regiunea de buclă Y53 importantă din punctul de vedere al mecanismului. (Figura 7A). Situsul catalitic recent identificat în structura cristalină a TAL (cod PDB 2O7B) este închis complet și inaccesibil solventului (Figura 7E) comparative cu situsul catalitic al pătrunjelului PAL și cel bacterian HAL.

Tyr60 determinată prin mutagenză directă este localizat în situsul catalitic al TAL (Figura 7F) comparativ cu poziționarea Tyr53 din HAL (Figura 7C).

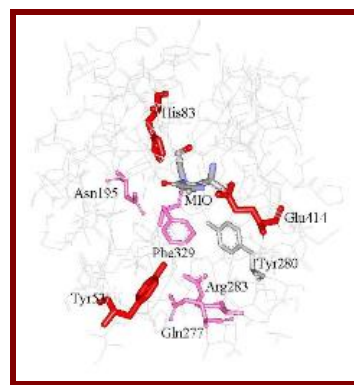
Pentru o mai bună înțelegere a mecanismului de reacție a amoniu-liazelor, s-a studiat centrul catalitic al HAL. Pe baza modelării prin omologie a secvenței de amino acizi 30-75 ale HAL pe structura de raze X a TAL (2O7B) am construit *in silico* o structură HAL parțial modificată²⁹ cu central active complet închis (Figura 7G și 7I).



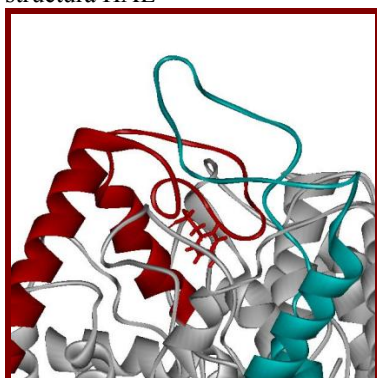
A) Regiunea de buclă Y53 din structura HAL



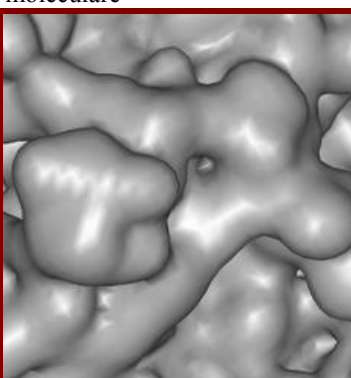
B) Reprezentarea suprafeței moleculare



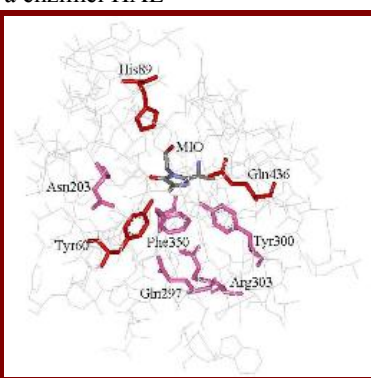
C) Amino acizii din situsul catalitic a enzimei HAL



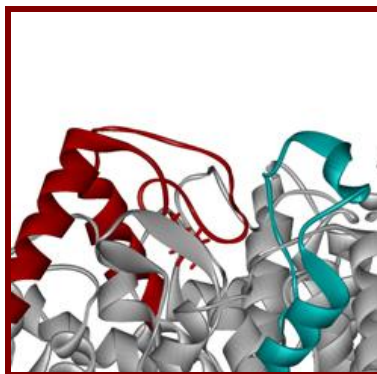
D) Regiunea de buclă Y60 din structura TAL



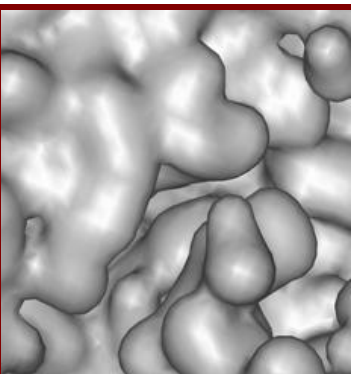
E) Reprezentarea suprafeței moleculare



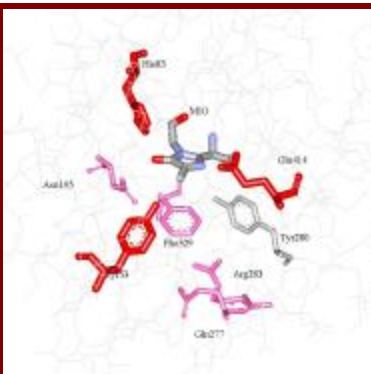
F) Amino acizii din situsul catalitic a enzimei TAL



G) Regiunea de buclă Y53 din structura 1B8F_{mod} HAL



H) Reprezentarea suprafeței moleculare



I) Amino acizii din situsul catalitic al modelului 1B8F_{mod} HAL

Figure 7. Structurile de raze-X ale HAL *bacterian* (1B8F), TAL *bacterian* (2O7B) și structura HAL parțial modificată (1B8F_{mod})

3.2. Studiul computațional al histidin amoniu-liazei: o conformație cu buclă modificată și rolul ionului de Zn (II)

3.2.1 Construirea unui situs catalitic închis a 1GKM HAL pentru calcule

1GKM este singura structură cristalină a *Pp*HAL în care există un inhibitor. Important de asemenea, lanțul lateral a Met382 are o conformație diferită de aranjamentul celorlalte cinci structuri *Pp*HAL fără liganzi.^{2,30}

Deși cele șase structuri existente *Pp*HAL conțin Tyr53 în situsul catalitic,^{2,5,30} o comparație structurală a HAL la situsurile amoniu-liaze apropiate indică buclele Tyr ca fiind în conformații parțial deschise (Figura 8a). Importanța buclei ce conține tirozina esențială catalitic din amoniu-liazele cu MIO a fost cel mai bine demonstrată pentru PAL. Buclele Tyr din structurile cristaline ale PAL fie lipseau^{4,8,31} sau se aflau într-o conformație inactive din punct de vedere catalitic. Recent, structura PAL din *Anabaena variabilis* (*Av*PAL) conținând situsul catalitic închis a confirmat conformația activă a buclei Tyr.⁸ În mod similar, structura cristalină a *Rhodobacter sphaeroides* tirozină amoniu-liazei (*Rs*TAL) prezintă în centrul catalitic bucla conținând Tyr60 în conformație activă.¹

Compararea structurii *Pp*HAL (1GKM, în albastru) cu *Rs*TAL (2O7B, în verde)¹ și cu *Av*PAL (3CZO, în portocaliu și colorat CPK)⁸ cu centrele catalitice compacte a demonstrat că bucla *Pp*HAL conținând Tyr53 adoptă o conformație parțial deschisă (Figura 8a). Deoarece structura cea mai compactă găsită a fost cea a *Av*PAL (3CZO, 2.2 Å resolution) conținând Tyr78 neaccesibilă pentru solvent și MIO electrofilă îngropată adânc în centrul catalitic,⁸ această structură amoniu-liază a fost selectată ca și șablon pentru modelarea conformației compacte a buclei Tyr a *Pp*HAL.

Comparația regiunii modificate a buclei interne conținând Tyr53 *Pp*HAL (1GKM_{mod}, Figura 8b, în roșu) cu bucla experimentală Tyr a a *Pp*HAL inhibat cu L-cisteină (1GKM, Figura 8b, în albastru) indică că Tyr53 esențială din punct de vedere catalitic din structura modificată era aproape de MIO, și prin urmare putea favoriza mai bine eliminarea protonului *pro*-(S) β din substrat, comparativ cu structura HAL originală. Mai mult, analiza graficelor Ramachandran ale subunităților structurilor HAL a condus la descoperirea existenței a 8 amino acizi orientați în afară ca și combinații Phi/Psi în structura HAL originală (1GKM, Figura 8c), pe când în regiunea de buclă a structurii HAL modificate sunt doar patru (1GKM_{mod}, Figura 8d).

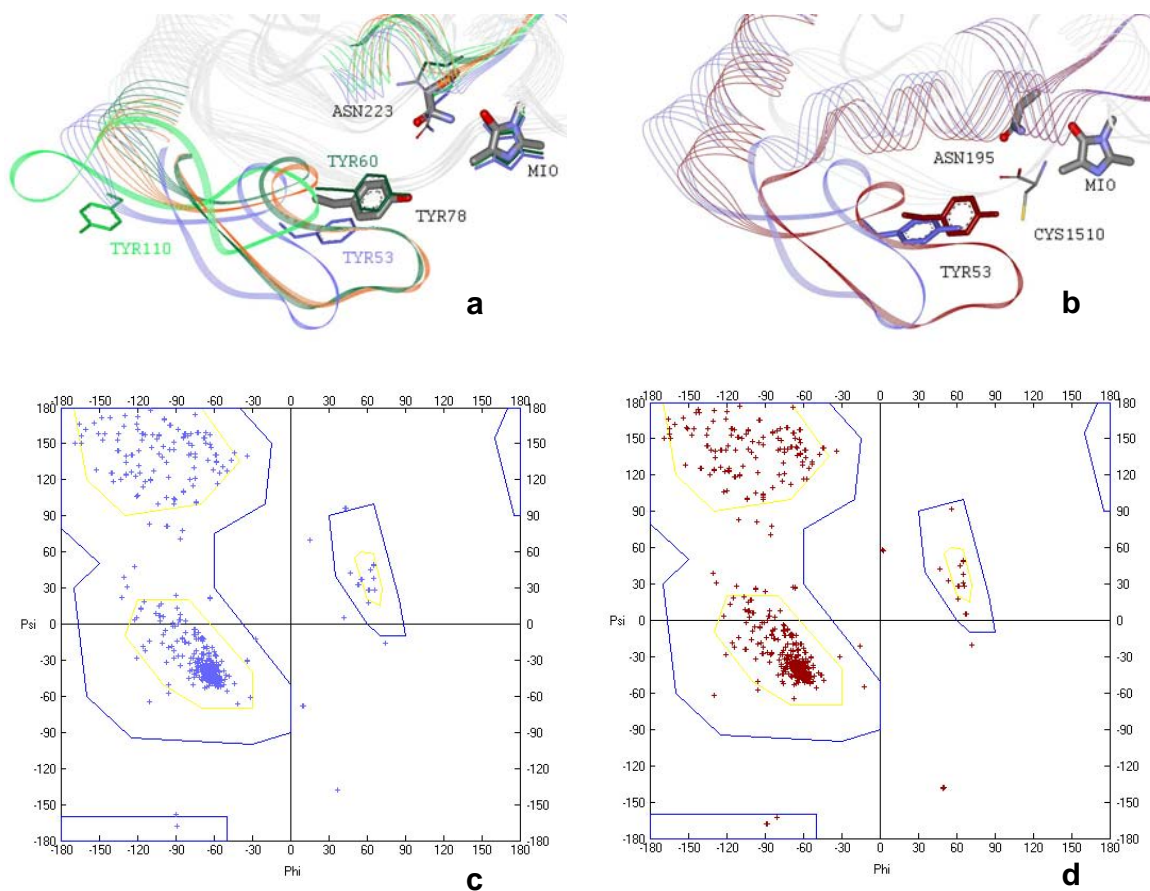


Figura 8. Bucele Tyr mobile din situsul catalitic al amoniu-liazelor conținând MIO. **a.** Comparația celor două regiuni mobile (incluzând Asn stabilizat de MIO și rezidurile Tyr) ale celor patru amoniu-liaze diferite: *Anabaena variabilis* PAL (3CZO, în portocaliu și CPK color); *Petroselinum crispum* PAL (1W27, verde deschis); *Rhodobacter sphaeroides* TAL (2O7B, verde închis); *Pseudomonas putida* HAL (1GKM, în albastru). Reziduu Asn este numerotat după AvPAL (3CZO). **b.** Suprapunerea regiunilor de buclă Tyr53 ale PpHAL (1GKM inhibată cu L-cisteină, colorată după CPK, lanțul albastru) și PpHAL cu bucla Tyr modificată (1GKM_{mod}, lanțul roșu). **c.** și respectiv **d.** graficele Ramachandran ale unităților monomere ale PpHAL (1GKM) și PpHAL parțial modificată (1GKM_{mod}).

3.2.2 Comparația conformațiilor intermediarilor covalenți a reacției HAL cu aranjamentele substratului și produsului

Rapoarte preliminare au indicat că tratarea HAL la pH ridicat în prezența L-cisteinei și a oxigenului va conduce la o inactivare ireversibilă a enzimei.^{32,33} Prin denaturarea HAL inhibat de către L-cisteină, urmată de digestia cu pronază vor rezulta doi produși cromoforici.³⁴ Într-unul din produși, metilenul exociclic al MIO a fost substituit de către grupările amino ale L-cisteinei.

Atunci când HAL inhibată cu L-cisteină a fost digerată prima oară cu tripsină, au fost izolate și identificate ca fragmente *N*-MIO două peptide cromoforice de 24-reziduuri.³⁵ Acest aspect a fost suportat mai târziu de către structura *Pp*HAL inhibată cu L-cisteină (PDB code: 1GKM⁵). Inhibitorul acestui HAL inhibat prezintă fragmentul amino apropiat de metilenul exociclic al grupării electrofilice prostetice MIO. Acest fapt poate fi considerat ca și o dovadă în plus a prezenței unui intermediar amino-enzimă în reacția HAL, după cum a demonstrat Peterkofsky.³⁶

Structurile HAL cu L-cisteină,⁵ TAL cu inhibitor 2-aminoindan-2-fosfonat⁵ și TAM co-cristalizat cu α,α -difluoro- β -tirozină³⁷ sau epoxid *p*-fluorocinamat³⁸ constituie o probă solidă în favoarea reacțiilor *via* intermediar *N*-MIO (în care substratul este legat la MIO prin intermediul grupării amino) în cazul reacțiilor cu amoniu-liaze and aminomutaze. Rétey¹¹ a propus un intermediar alternativ legat covalent. În acest caz, între partea aromatică a substratului și gruparea prostetică MIO se va forma un complex σ printr-un mecanism Friedel-Crafts (FC).

Analiza reziduurilor active ce înconjoară ligandul în HAL⁵ inhibată de L-cisteină indică că protonul *pro*-(*S*) β din substratul L-histidină poate fi extras de către unul din cele 3 reziduuri (Tyr53, Tyr280, Glu414) care pot fi considerate baze enzimatice (Figura 9). Experimente de mutageneză demonstrează de asemenea că Tyr53, Glu414³⁹ și Tyr 280^{5,39} sunt reziduuri importante în cataliză. Activitatea catalitică redusă a analogilor cu tirozină (Tyr 60 și Tyr300) mutanții cu TAL dovedește importanța Tyr53 și Tyr280 în reacția HAL.

Prin investigarea PAL analogii de fenilalanină D- și acid L-2-aminooxi-3-fenil-propionic, s-a dedus că eliminarea de amoniac aproximează calea cu mișcare minimă.⁴⁰ La câteva structuri *Rs*TAL, produșii reacției de eliminare au fost găsiți în situsul active în orientare zig-zag.¹ Principiul căii cu mișcare minimă și formei zig-zag a lanțului produsului (*E*)-urocanate al reacției HAL determină un aranjament zig-zag al intermediarului legat de asemenea covalent la substratul L-histidină. În funcție de natura intermediarului de reacție legat covalent, sunt posibile patru căi de reacție (Figura 9).

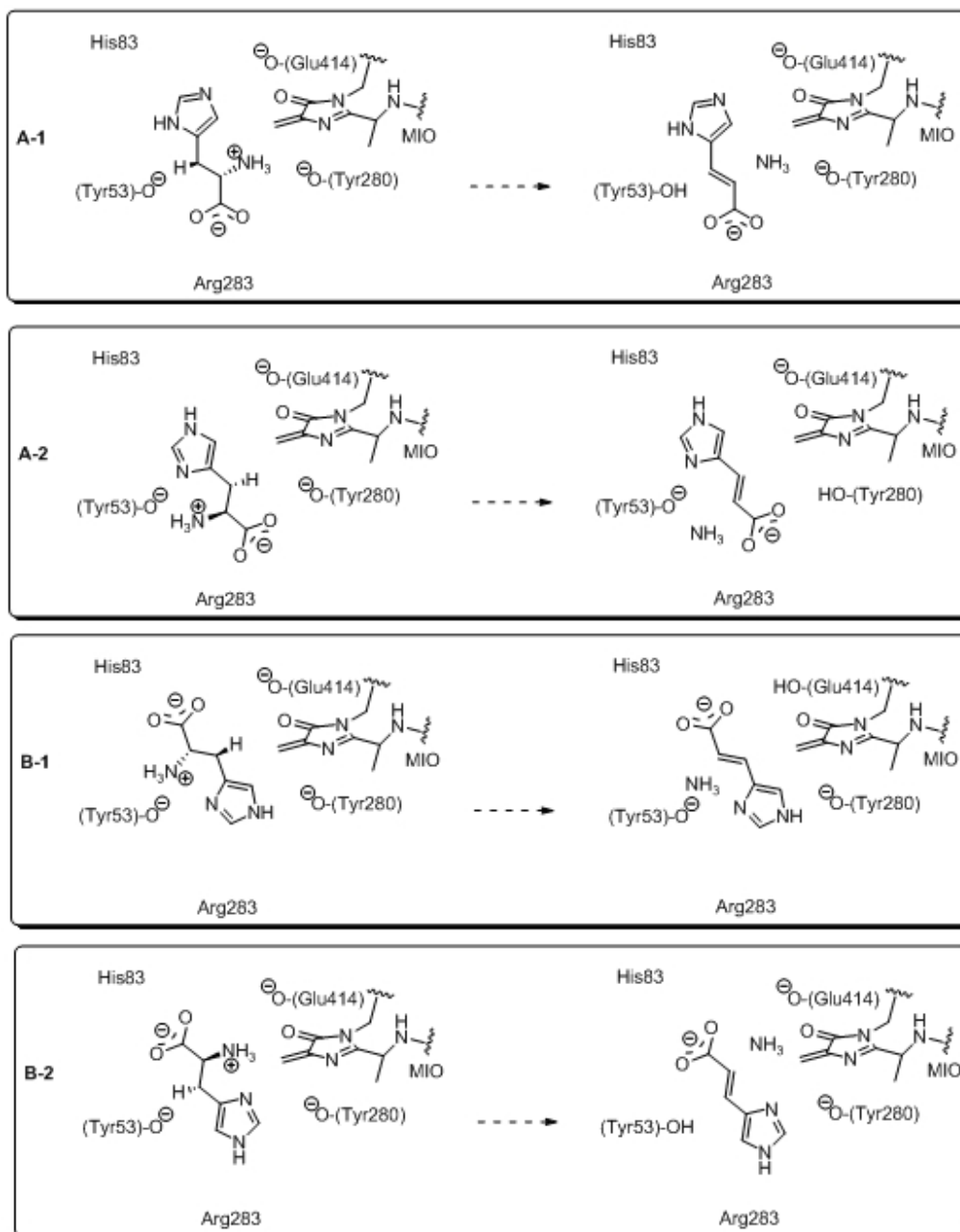


Figura 9. Patru aranjamente posibile ale L-histidinei și (*E*)-urocanat de-a lungul căilor de reacție (A-1, A-2, B-1 și B-2) pe traseul cu mișcare minimă dintre situsul catalitic HAL conținând grupare prostetică MIO, His83, Arg283 și trei baze enzimatiche posibile: Tyr53, Tyr280 și Glu414.

De-a lungul căii de reacție **A-1** pentru transformarea substratului la produs, sunt posibili atât intermediarul *N*-MIO cât și FC însă doar amino acidul Tyr53 poate extrage protonul *pro*-(*S*) β din substrat. Este posibil doar un mecanism de tip FC *via* calea **A-2** implicând Tyr280 ca bază pentru extragerea protonului *pro*-(*S*) β. De-a lungul căii **B-1**, deaminarea L-histidinei se poate

produce după un mecanism FC cu implicarea Glu414 ca și bază enzimatică. De-a lungul căii **B-2**, sunt posibile ambele mecanisme (*N*-MIO și FC) cu implicare Tyr53 ca bază pentru extragerea protonului *pro*-(*S*) β .

Pe lângă stările de substrat și produs (Figura 9), intermediarul de reacție legat covalent trebuie să respecte de asemenea cerințele referitoare la calea de reacție cu cea mai mică mișcare din situsul activ al HAL. Dacă reacția HAL se desfășoară *via* intermediar *N*-MIO, fragmentul amino al substratului L-histidină va fi legat la MIO. Dacă reacția catalizată de HAL se desfășoară *via* un intermediar de tip Friedel-Crafts, carbonul C₄ al ciclului aromatic al substratului L-histidină va forma cu MIO un complex σ . Totuși, în acest caz reacția se poate desfășura *via* doi intermediari diastereomerici [(*S,S*)-FC și (*R,S*)-FC] datorită formării unui nou centru de asimetrie la carbonul C₄ al ciclului aromatic din complexul σ .

Ca și în cazul intermediarilor posibili substratul a fost ancorat la enzimă printr-o legătură covalentă, studiul conformațional sistematic (CS) cu intermediari de reacție alternativi s-a dovedit a fi o unealtă puternică în identificarea aranjamentelor posibile în situsul catalitic al HAL. Deoarece niciuna din cele șase structuri cristaline ale HAL^{2,5,30} nu au indicat variații semnificative în majoritatea zonelor centrului catalitic, analizele CS au fost realizate în mediu enzimatic rigid. Această abordare a fost susținută de asemenea și de către analiza factorilor B ale situsului activ ale reziduurilor de amino acizi indicând o mobilitate scăzută (cu excepția reziduurilor buclei mobile Tyr53).

Deoarece ciclul imidazol permite două stări de protonare diferite ($N_{\tau H}$ sau $N_{\pi H}$) pentru fiecare intermediar de reacție, s-au realizat șase analize CS pentru cele șase alternative principale [*N*-MIO- $N_{\tau H}$, *N*-MIO- $N_{\pi H}$, (*R,S*)-FC- $N_{\tau H}$, (*R,S*)-FC- $N_{\pi H}$, (*S,S*)-FC- $N_{\tau H}$, (*S,S*)-FC- $N_{\pi H}$]. Au fost reținute doar acele conformații care aveau un aranjament zig-zag al lanțului într-un interval de 10 kcal/mol (Tabelul 1). Modelele situsurilor active ale L-histidinei and (*E*)-urocanate au fost construite pe baza conformațiilor intermediarilor covalenți ale celor șase analize CS. Substratul, produsul și cele opt reziduuri de aminoacizi relevante din punct de vedere catalitic au fost optimizate în situsul catalitic HAL (1GKM_{mod}). În acest fel, analiza comparativă a reacției $S \rightarrow I \rightarrow P(+NH_2)$ devine fezabilă (Tabelul 1).

Energiile obținute la nivel de teorie MM nu sunt în general sufficient de precise pentru studii de mecanisme enzimatice, unele observații merită amintite. Conform calculului nostru (Tabelul 1), rezultatele energetice favorizează reacția *via* intermediari de tip *N*-MIO ($N_{\tau H}$). În

acest caz, stările cu substratul legat sunt mai ridicate din punct de vedere energetic comparativ cu intermediarii reactivi *N*-MIO iar stările cu producții legați prezintă energii mai scăzute.

Tabelul 1. Energiile relative MM ale modelelor de substrat (E_S), intermediar (E_I) și produs cu gruparea amino legată de MIO (E_{P+NH_2}) și diferența de energie între stările substratului și intermediarului pentru cele două forme protonate posibile și cele trei tipuri de intermediari covalenți. Sunt prezentate tipurile de aranjamente (în conformitate cu Fig. 9) pentru aceste coordonate de reacție $S \rightarrow I \rightarrow P(+NH_2)$ care satisfac principiul mișcării minime. Sunt listate de asemenea distanțe H-O reprezentative din structurile intermediarilor covalenți substrat-MIO [I: distanțele dintre O a carboxilatului din ligand și cele două legături N-H ale Arg283, și între hidrogenul *pro*-(*S*) β al ligandului și atomii O^- ai bazelor enzimactice posibile Tyr53/Tyr280/Glu414;]. Distanțele mai mici de 2.5 Å sunt tipărite cu caractere îngroșate.

	Energie relativă (kcal/mol)			Calea de reacție	Distanțe H-O (Å) în I			
	E_S	E_I	E_{P+NH_2}		R283	Y53	Y280	E414
<i>N</i> -MIO ($N_{\pi H}$)								
c1	14.0	7.8	-10.1	A-1	2.19 /3.12	2.31	5.17	6.14
c2	5.6	2.7	-7.5	A-1	3.73/5.20	2.29	5.09	5.43
c3	14.0	8.3	-10.7	A-1	2.19 /3.03	2.33	5.23	6.50
c5	13.9	0.2	-10.0	A-1	2.28 /3.08	2.36	5.21	6.45
c8	5.7	0.0	-10.7	A-1	4.37/6.09	2.37	5.30	5.64
c9	14.7	7.8	-5.4	B-2	8.41/7.45	2.13	4.25	4.83
c11	21.8	15.4	-5.8	A-1	2.36 /2.89	2.15	5.13	6.20
<i>N</i> -MIO ($N_{\pi H}$)								
c1	20.4	11.3	14.9	A-1	4.08/5.36	2.45	5.04	5.28
c2	40.4	10.8	0.4	A-1	3.74/5.20	2.34	5.12	5.44
c3	24.1	17.9	8.5	A-1	2.18 /3.12	2.28	5.16	6.14
c4	24.0	17.6	6.2	A-1	2.19 /3.03	2.31	5.15	6.24
c6	24.2	19.7	5.5	A-1	2.19 /2.69	2.44	5.12	6.28
c9	31.7	24.1	8.2	A-1	2.32 /2.85	2.22	5.15	6.19
c10	24.9	16.5	5.1	B-2	7.68/8.63	2.15	4.13	4.75
<i>(R,S)</i> -FC ($N_{\pi H}$)								
c2	30.5	23.1	13.4	B-2	7.64/8.24	4.23	5.40	4.96
c4	28.7	24.0	10.9	B-1	8.79/9.09	4.14	5.43	5.42
c5	26.3	23.1	11.7	B-1	8.24/7.64	4.15	5.39	5.15
c7	28.7	27.2	15.7	B-1	7.41/7.89	2.66	3.18	4.02
c8	25.0	33.1	15.4	B-1	7.97/8.60	4.07	2.63	2.70
c9	28.8	25.9	11.8	B-1	8.99/9.01	3.45	5.84	6.53
<i>(R,S)</i> -FC ($N_{\pi H}$)								
c2	25.5	22.8	10.5	B-1	7.63/8.22	4.80	3.71	2.59
<i>(S,S)</i> -FC ($N_{\pi H}$)								
c1	27.9	28.6	3.2	B-1	7.34/7.90	2.67	2.92	4.15
c2	25.3	29.0	2.9	B-1	7.87/8.12	2.60	3.00	4.21
<i>(S,S)</i> -FC ($N_{\pi H}$)								
c2	27.8	28.5	6.8	B-1	7.53/8.11	2.63	2.92	4.21

Astfel, profilul energetic calculat al reacției *via* un intermediar de tip *N*-MIO (N_{TH}) este în acord cu rezultatele experimentale deoarece amoniu-liazele conținând MIO catalizează în condiții normale, eliminarea amoniacului din L-amino acizi de o manieră ireversibilă.^{26,41} Toate celelalte structuri intermediare au energii mai ridicate (10.8-33.1 kcal/mol) față de conformerul cu energia cea mai joasă, intermediarul *N*-MIO (N_{TH}).

Apoi, au fost analizate distanțele H-O din structurile optimizate ale modelelor de intermediari legați prin MIO între hidrogenul *pro*-(*S*) β al ligandului și atomii de oxigen ale posibilelor baze enzimice (Tyr53, Tyr280 și Glu414) și între gruparea oxigen a ligandului carboxilat și Arg283 (Tabelul 1). Rezultatul decisiv al acestei analize a fost observația că nu există nicio bază enzimatică în niciunul dintre aceste conformații intermediare FC suficient de aproape de hidrogenul β *pro*-(*S*) pentru a-l extrage. Prin urmare calea **A-1** implicând intermediarul covalent *N*-MIO este cea mai probabilă pentru reacția HAL dar o orientare de tip **B-2** va fi de asemenea permisă.

Structurile optimizate conținând liganzi L-histidină și (*E*)-urocanate în situsul activ al structurii HAL închise au fost comparate cu aranjamentele acestor liganzi obținute prin procedura de docking. Analiza rezultatelor AutoDock a relevat o orientare bine conservată a produsului (carboxilatul ligandului este în vecinătatea Arg283 în timp ce fragmentul imidazol este orientat spre His83) în acord cu rezultatele obținute prin optimizările MM. Ținând cont de orientarea produsului în situsul activ, rezultatele de docking corespund doar coordonatei **A-1**.

3.2.3 Rolul ionului de Zn(II) în reacția catalizată de HAL

S-a observat ca ionul Zn^{2+} și câțiva alți cationi divalenți, cum ar fi Cd^{2+} sau Mn^{2+} , cresc activitatea enzimei HAL.⁴² Pe de altă parte, nu există nicio structură cristalină a enzimei HAL^{2,5,30} în care să apară Zn^{2+} . Această contradicție este doar aparentă, și poate fi rezolvată presupunând că Zn^{2+} , necesar pentru activitatea catalitică, interacționează în timpul reacției HAL cu amino acidul His83 și cu gruparea imidazol a substratului.³⁹ De aceea, motivul pentru care nu se cunoaște nicio structură HAL în care să fie prezent Zn^{2+} este că niciun substrat sau produs conținând enzima HAL nu a fost caracterizat structural până acum.^{2,5,30} Interacțiunea unui ion de Zn cu gruparea His83 a enzimei HAL și cu substratul în timpul catalizei³⁹ poate de asemenea să

explice de ce HAL accepta doar L-histidină,²⁶ L-4-fluorohistidină⁴³ or L-4-nitrohistidină^{11,44} ca și substrăți.

Pentru a evalua contribuția ionului Zn^{2+} la activitatea HAL, s-au realizat studii pe conformațiile găsite pentru intermediarul *N*-MIO al situsului catalitic 1GKM_{mod}. Analiza structurilor de raze X^{45,46,47,48,49,50} pentru proteinele care conțin Zn^{2+} și conformațiile calculate ale intermediarului *N*-MIO duc la concluzia că Zn ar putea fi coordonat de către atomul N_{τ} al His83 și de gruparea imidazol a substratului (Figura 25a), similar cu datele obținute pentru Adamalysin II, o endopeptidază cu zinc din veninul speciei *Crotalus adamanteus*⁵¹ (Figura 10b).

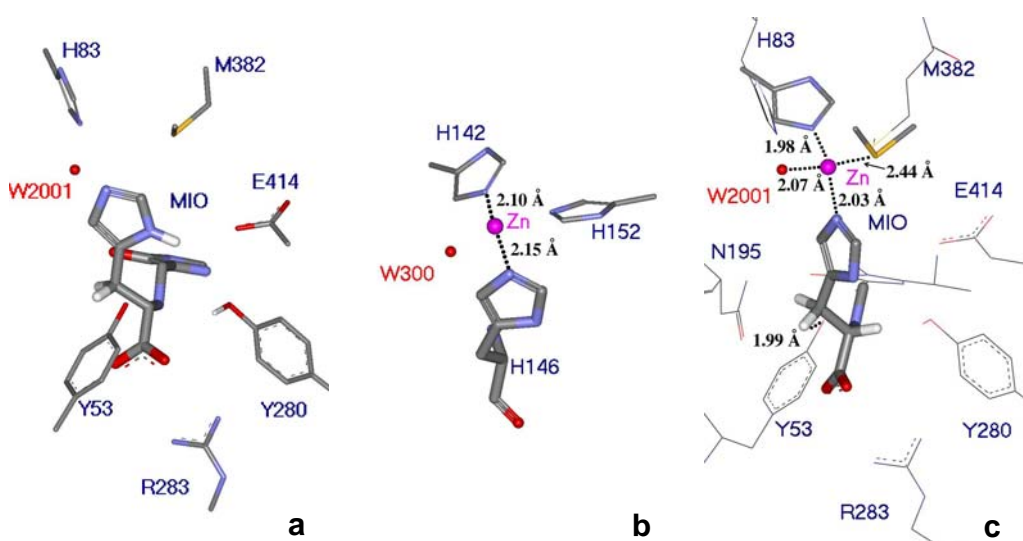


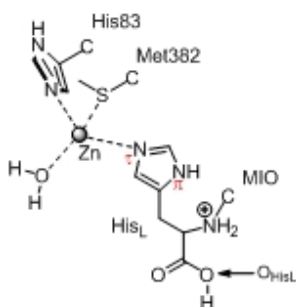
Figura 10 a. Aranjamentul intermediarului covalent *N*-MIO ($N_{\pi H-c4}$) în situsul activ al HAL (1GKM_{mod}). **b.** Coordinarea tetraedrică a Zn (culoare roz) în Adamalysin II, o endopeptidază cu zinc din veninul speciei *Crotalus adamanteus*⁵¹ (PDB code: 1IAG). **c.** Suprapunerea modelului complexului tetraedric de zinc (Modelul 4, calcul DFT) pe situsul activ liber al enzimei HAL (1GKM_{mod}).

În structurile proteinelor conținând ioni de Zn, se pot întâlni două tipuri de complecși ai zincului.^{45,46,47,48,49,50} Centrul metalic poate prezenta coordinare tetraedrică (Th)^{45,46,47,48,49,50} au trigonal bipiramidală (Tbp).^{45,48} În timpul reacției HAL, cei mai îndepărtați liganzi ai Zn coordinați la His83 și gruparea imidazol a L-histidinei pot fi, Met382 (prin atomul de S), care este un reziduu conservat al histidin amoniu-liazelor, și o moleculă (pentru coordonarea Th) sau două (pentru coordonarea Tbp) de apă.

Au fost rulate calcule DFT pe două tipuri de structuri conținând Zn complexat (Th și Tbp), incluzând toate grupările relevante din situsul activ al HAL (componente ale MIO, His83, Met382 și una sau două molecule de apă). Calculele DFT arată că reacția enzimei HAL ar trebui

să implice un complex tetraedric al zincului, deoarece doar complecșii de simetrie tetraedrică au condus la structuri acceptabile (Tabelul 2). Optimizările geometriilor posibile pentru aranjamentele de tip Tbp nu au putut fi finalizate sau au condus la structuri tetraedrice prin eliminarea din sfera de coordinare a zincului a unei molecule de apă. Comparând complexul de Zn tetraedric (Figura 10c) cu cel găsit în *Adamalysin II*⁵¹ cu aranjamentul posibil al intermediarului covalent substrat-MIO obținut printr-o analiză conformațională a situsului activ fara Zn (Figura 10a) se observă o asemănare pronunțată între aranjările spațiale ale structurii.

Tabelul 2 Lungimi de legătură și energii pentru modelele complexului Zn-ligand, calculate prin metode DFT.



Model	Energii relative (kcal/mol) ^a	Distanțe (Å) ^b			
		Zn-N _{His83}	Zn-N _{HisL}	Zn-O _{HOH}	Zn-S _{Met382}
1	1.00(0.44)	1.97(1.96)	2.02(2.01)	2.07(2.05)	2.42(2.50)
2	0.00(0.00)	1.96(1.96)	2.03(2.01)	2.06(2.05)	2.42(2.51)
3	2.32(1.57)	1.96(1.96)	2.02(2.01)	2.08(2.05)	2.41(2.49)
4	1.84(0.19)	1.98(1.96)	2.03(2.02)	2.07(2.05)	2.44(2.51)

^a obținute prin calcule SP la nivelul QM/QM B3LYP/6-311+G(d,p):B3LYP/6-31G(d) după optimizarea structurilor la nivelul B3LYP/6-31G(d,p); valorile în paranteze sunt obținute din calcule SP QM/QM B3LYP/6-311+G(d,p):B3LYP/6-31G(d) după optimizări la nivel B3LYP/6-31G. ^b Lungimi de legătura în complecși de Zn optimizați la nivelul B3LYP/6-31G(d,p); valorile în paranteze sunt obținute prin optimizări cu B3LYP/6-31G.

Suprapunerea complexului cu zinc tetraedric și a structurii HAL fără liganzi (Figura 10c) a arătat că atomul N_τ al grupării imidazol de pe ligand este implicat în coordonarea la zinc, iar atomul de hidrogen din poziția N_τ ar fi la o distanță corespunzătoare unei legături de hidrogen cu Glu414 (Figura 10a și Figura 10c). Legarea ligandului prin coordonarea ciclului imidazolic al grupării His83 la zinc și printr-o legătură de hidrogen prin intermediul Glu414 este în acord cu datele obținute în urma mutațiilor, indicând că mutațiile Glu414Ala ($k_{cat}/k_{cat-mut} = 20930$) și ale His83Leu ($k_{cat}/k_{cat-mut} = 18000$)³⁹ au efectul cel mai însemnat asupra catalizei. De asemenea, acest mod de legare al substratului explică și specificitatea foarte ridicată a enzimei HAL (în afară de L-histidină, doar L-4-fluorohistidina⁴³ și L-4-nitrohistidina^{11,44} sunt acceptate ca și substrat²⁶).

Toate rezultatele obținute până în momentul de față au sugerat că baza enzimatică care extrage atomul de hidrogen din poziția *pro*-(*S*) β în cursul reacției HAL este Tyr53. Acest lucru a fost indicat de distanța dintre atomul de oxigen al Tyr53 și hidrogenul din poziția *pro*-(*S*) β din complexul de zinc, de 1.99Å (Figura 10c). Pentru a estima aciditatea acestui atom în conformațiile permise ale situsului catalitic închis al HAL, s-au calculat sarcinile Mülliken ale atomilor de hidrogen din poziția β a L-histidinei, L-4-nitrohistidinei și a modelelor parțiale pentru intermediari fără Zn sau conținând centrul metalic *N*-MIO coordinat (Tabelul 3). Pentru că este cunoscut faptul că gruparea nitro determină creșterea acidității atomului de hidrogen din poziția *pro*-(*S*) β a L-4-nitrohistidinei,⁴⁴ și este un substrat acceptat chiar și de mutații ale HAL fără gruparea MIO, a fost inclusă și analiza L-4-nitrohistidinei.

Tabelul 3 Sarcini atomice Mülliken ale atomului de hidrogen din poziția *pro*-(*S*) β a L-histidinei, și L-4-nitrohistidinei zwitterionice, într-un model parțial al intermediarului *N*-MIO și în modele ale complexelor cu Zn.

Linie	Structură ^a	H _S	H _R
1	<i>N</i> -MIO (model parțial)	0.176 (0.221)	0.133 (0.173)
2	L-Histidina	0.180 (0.222)	0.102 (0.166)
3	L-4-Nitrohistidina	0.199 (0.245)	0.135 (0.201)
4	complex Zn, Model 1	0.220(0.267)	0.172 (0.206)
5	complex Zn, Model 2	0.220 (0.265)	0.173 (0.208)
6	complex Zn, Model 3	0.220 (0.263)	0.174 (0.208)
7	complex Zn, Model 4	0.215 (0.261)	0.177 (0.210)

^a Calculele pe conformațiile permise pentru situsul activ HAL au fost rulate la nivelul B3LYP/6-31G(d,p) (valorile din paranteze sunt obținute din calcule B3LYP/6-31G)

Sarcinile Mülliken calculate pentru hidrogenul din poziția *pro*-(*S*) β a geometriilor optimizate ale L-histidinei, L-4-nitrohistidinei (forma *N*_{TH}) și modelelor complexelor cu Zn (Table 3) arată că aciditatea atomului de hidrogen este semnificativ mai pronunțată în cazul L-4-nitrohistidinei (linia 3) decât al L-histidinei (linia 2) sau al modelului *N*-MIO fără Zn (linia 1). Atomii de hidrogen cu sarcina cea mai pronunțată au fost găsiți pentru modelele complexelor cu Zn (liniile 4-7).

Aceste rezultate sugerează că formarea unui complex intermediar cu Zn în cursul reacției HAL ar contribui nu doar la legarea specifică a substratului, dar și la accentuarea reactivității sale.

Concluzii

I. Structura modificată, închisă a PAL (construită prin modelarea, pe baza structurii *RsTAL*, a buclelor 83-141, 321-351 conținând Tyr53 esențial) a prezentat mai puține deviații a conformațiilor lanțurilor laterale în plotul Ramachandran decât structura experimentală.

II. Rezultatele obținute în urma dockingului liganzilor și în urma analizei conformaționale a fenilalaninei legată covalent de gruparea prostetică MIO a reacției PAL într-o porțiune importantă a fenilalaninei amoniu-liazei (*PcPAL*) din *Petroselinum crispum*, prezentând situsul catalitic în formă închis, arată că reacția catalizată de PAL decurge *via* intermediarul *N*-MIO în care ligandul L-fenilalanină este legat covalent de gruparea prostetică MIO prin atomul de azot (*N*-MIO).

III. Structurile cristaline determinate pentru HAL, PAL, TAL, respectiv compararea secvențelor de amino acizi din situsul catalitic al enzimelor conținând MIO, au indicat că în afară de gruparea electrofilă prostetică MIO, doi amino acizi Tyr, Arg și doi amino acizi Asn (cu excepția HAL, în care un amino acid Asn este diferit) aparțin de aranjamentul enzimelor-MIO cunoscute.

IV. Structura nouă parțial modificată 1B8F_{mod} HAL bazată pe TAL este un model mult mai sigur. Acest model HAL a arătat că amino acidul Tyr53 important din punct de vedere catalitic este localizat în situsul catalitic într-o poziție înalt izosterică. Structura nouă a *PpHAL* poate fi considerată ca fiind un model mai util al formei active a enzimei decât structurile experimentale HAL existente.

V. Studiul prezent arată totodată că structurile experimentale determinate pentru histidin amoniu-liază din *Pseudomonas putida* (*PpHAL*) conține bucla Tyr53 în conformație parțial deschisă. Structura modificată, închisă 1GKM_{mod} HAL (construită prin modelarea buclei 39-80 Tyr53 bazată pe structura *AvPAL*) a prezentat mai puține deviații ale conformațiilor lanțurilor laterale în plotul Ramachandran decât structura experimentală.

VI. Investigarea valorilor de distanță între hidrogenul *pro*-(*S*) β aflat la C₂ a ligandului și atomii de oxigen ai bazelor enzimactice posibile Tyr53, Ty280 și Glu414 din apropiere, în conformațiile

calculate ale celor trei structuri propuse [*N*-MIO, (*R,S*)-FC, (*S,S*)-FC] a intermediarului de reacție legat covalent în situsul catalitic al HAL, a arătat că reacția poate avea loc *via* structura intermediarului *N*-MIO, care a permis ca Tyr53 să fie destul de aproape de hidrogenul *pro*-(*S*) β. Această concluzie a fost susținută totodată și de către rezultatele obținute în urma dockingului (*E*)-urocanatului.

VII. Calculele DFT utilizate la investigarea rolului ionului de Zn^{2+} în reacția catalizată de HAL, folosind un model parțial al intermediarului *N*-MIO, au indicat formarea unui complex tetraedric cu ion de Zn^{2+} către care coordonează inelul imidazolic al ligandului și al His83, amino acidul Met382 al enzimei și o moleculă de apă. Formarea unui astfel de complex de Zn poate explica specificitatea substratului în cazul HAL. Calculele DFT au prezentat totodată că formarea unui complex de Zn contribuie la creșterea reactivității hidrogenului *pro*-(*S*) β în intermediarul *N*-MIO.

VIII. Buna concordanță dintre structura obținută și cea experimentală a confirmat că metoda de docking poate da informații asupra interacțiunii substratului/produsului cu enzima, dar rezultatele optimizării geometrice a L-histidinei/acidului (*E*)-urocanic coincid cu datele experimentale găsite pentru liganzii aflați în structurile cristaline ale altor amoniu-liaze. Aceleași interacții apar în cazul substratului L-histidină împreună cu o altă interacțiune, cea dintre gruparea amino și partea metilenică a grupării MIO.

Lista de publicații

Publicații pe tema subiectului de doctorat

Articole

1. **Seff A.L.**, Pilbák S., Silaghi-Dumitrescu I.[†], Poppe L., Computational Investigation of the Histidine Ammonia-Lyase Reaction: a Modified Loop Conformation and the Role of the Zinc(II) Ion, *Journal of Molecular Modeling*, **2010**, submitted.
2. **Seff A.L.**, Pilbák S., Silaghi-Dumitrescu I.[†], Poppe L., Computational Investigation of a Bacterial Histidine Ammonia-Lyase (HAL) Model with a Completely Closed Active Center, *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Seria Chimia*, **2010**, XLV, 2, TOM I, p. 37-45.
3. **Seff A.L.**, Pilbák S., Poppe L., Ligand Docking and Systematic Conformational Analysis in Loop Modified Parsley Phenylalanine Ammonia-Lyase Structure, *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Seria Chimia*, **2008**, LIII, 2, p 67-71.
4. **Seff A.L.**, Pilbák S., Silaghi-Dumitrescu I.[†], Poppe L., Ligand Docking and Systematic Conformational Analysis in Loop Modified Phenylalanine Ammonia-Lyase Structure, *XIIIth International Chemistry Conference*, Hungarian Technical Scientific Society from Transylvania, Cluj-Napoca, Romania, November 8-11, **2007**, ISSN 1843-6293, Book of Works, p 106-109.

Prezentări orale

5. **Seff A.L.**, Pilbák S., Poppe L., Silaghi-Dumitrescu I.[†], DFT Studies on the Formation of an Intermediate Tetrahedral Zn²⁺ Complex in a Closed Active Center of HAL, *Molecular Modeling in Chemistry and Biochemistry MOLMOD*, Special Edition, Cluj-Napoca, Romania, **Plenary Lecture**, May 28, **2010**.
6. **Seff A.L.**, Pilbák S., Silaghi-Dumitrescu I.[†], Poppe L., Zinc-Containing Active Site in a Partially Modified 1GKM Crystal Structure of Histidine Ammonia-Lyase: A Computational Investigation., *Molecular Modeling in Chemistry and Biochemistry MOLMOD*, Cluj-Napoca, Romania, **Plenary Lecture**, April 2-4, **2009**, Book of Abstracts, p 17.
7. **Seff A.L.**, Pilbák S., Silaghi-Dumitrescu I.[†], Poppe L., Ligand Docking and Systematic Conformational Analysis in Loop Modified Phenylalanine Ammonia-Lyase Structure, *XIIIth International Chemistry Conference*, Hungarian Technical Scientific Society from Transylvania, Cluj-Napoca, Romania, **Plenary Lecture**, November 8-11, **2007**, ISSN 1843-6293, Book of Works, p 106-109.
8. **Seff A.L.**, Pilbák S., Poppe L., Ligand Docking and Systematic Conformational Analysis in Loop Modified Parsley Phenylalanine Ammonia-Lyase Structure, *Molecular Modeling in Chemistry and Biochemistry MOLMOD*, Arcalia, Romania, **Plenary Lecture**, July 5-8, **2007**, ISBN 978-973-7973-46-7, Book of Abstracts, p 15.

Postere

9. **Seff A.L.**, Pilbák S., Silaghi-Dumitrescu I.[†], Poppe L., Computational Investigation of a Bacterial Histidine Ammonia-Lyase (HAL) Model with a Completely Closed Active Center, *4th Central European Conference: Chemistry towards Biology*, Dobogókő, Hungary, **poster**, September 8-11, **2008**, Book of Abstracts, p124.

10. **Seff A.L.**, Pilbák S., Silaghi-Dumitrescu I.[†], Poppe L., A new Bacterial Histidine Ammonia-Lyase (HAL) Model with a Completely Closed Active Center Investigated by Computation, *23rd International Conference on Organometallic Chemistry*, Rennes, France, **poster**, July 13-18, **2008**, Book of Abstracts, *P473*.
11. **Seff A.L.**, Pilbák S., Silaghi-Dumitrescu I.[†], Poppe L., Comparison of Ligand Docking and Conformational Analysis Results in Loop Modified Parsley Phenylalanine Ammonia-Lyase Structure, *Humboldt Conference on Noncovalent Interactions*, Vrsac, Serbia, **poster**, November 15-18, **2007**, Book of Abstract, *p 40-41*.

Alte publicații

12. **Seff A.L.**, Darvasi J., Kékedy-Nagy L., Borszéki J., Halmos P., Determination of Element Containing in Chicken Bone and Comparison of Different Decomposition Methods, *XIth International Chemistry Conference*, Hungarian Technical Scientific Society from Transylvania, Cluj-Napoca, Romania, **Plenary Lecture**, November 11-13, **2005**, MKE (Society of Hungarian Chemists) **prize**, ISBN 973-7840-07-0, Book of Works, *p 55-58*.
13. **Seff A.L.**, Darvasi J., Comparisons of Decomposition and Determination Methods for Quantification of Some Heavy Metal from Domestic Birds Bones, *Students for students" Session of Scientific Student Communication*, 2nd Edition, Cluj-Napoca, Romania, **Oral Presentation**, April 8-10, **2005**, Book of Abstracts, *p. 72*.
14. **Seff A.L.**, Darvasi J., Analysis of Metatarsus Bones of Fowls, *Scientific National Conference for Students, Chemistry Section*, XXVIIth Edition, Budapest, Hungary, **Oral Presentation**, March 23, **2005**, **Honorable mention**, Work of 30 pages.
15. **Seff A.L.**, Darvasi J., Determination by ICP of Heavy Metals Containing in Metatarsus Chicken Bone Samples Decomposited with Open- and Closed Type Microwave Oven, *Scientific Conference for Students in Spring 2004, Chemistry Section*, Szeged, Hungary, **Oral Presentation**, April 29-30, **2004**, **Honorable mention**, Work of 29 pages.
16. **Seff A.L.**, Silaghi-Dumitrescu I.[†], Calcule DFT asupra interacțiunii acizilor Lewis EX4 din grupa 14 cu baze Lewis, *XXIXth National Chemistry Conference*, Călimănești-Căciulata, Vâlcea, Romania, **poster**, October 4-6, **2006**, Book of Abstracts, *P.S.II. – 41*.

Bibliografie selectată

- [1] Louie G.V., Bowman M.E., Moffitt M.C., Baiga T.J., Moore B.S., Noel J.P., *Chemistry and Biology*, **2006**, *13*, 1327-1338.
- [2] Schwede T.F., Rétey J., Schulz, G.E., *Biochemistry*, **1999**, *38*, 5355-5361.
- [3] Ritter H., Schulz G.E., *Plant Cell*, 2004, *16*, 3426-3436.
- [4] Calabrese J.C., Jordan D.B., Boodhoo A., Sariaslani S., Vanneli T., *Biochemistry*, **2004**, *43*, 11403-11416.
- [5] Baedeker M., Schulz G.E., *European Journal of Biochemistry*, **2002**, *269*, 1790-1797.
- [6] Poppe L., *Current Opinion in Chemical Biology*, **2001**, *5*, 512-524.
- [7] Rétey J., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2003**, *1647*, 179-184.
- [8] Wang L., Gamez A., Archer H., Abola E.E., Sarkissian C.N., Fitzpatrick P., Wendt D., Zhang J., Vellard M., Bliesath J., Bell S.M., Lemontt J.F., Scriver C.R., Stevens R.C., *Journal of Molecular Biology*, **2008**, *380*, 623-635.
- [9] Hanson K.R., Havir E.A., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1970**, *141*, 1-17.
- [10] Hermes J.D., Weiss P.M., Cleland W.W., *Biochemistry*, **1985**, *24*, 2959-2967.
- [11] Langer M., Pauling A., Rétey J., *Angewandte Chemie International Edition*, **1995**, *34*, 1464-1465.
- [12] Swiss-Model, An automated Comparative Protein Modelling Server, <http://swissmodel.expasy.org/>
- [13] Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T., *Bioinformatics*, **2006**, *22*, 195-201.
- [14] Kopp J., Schwede T., *Nucleic Acids Research*, **2004**, *32*, D230-D234.
- [15] Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M.C., *Nucleic Acids Research*, **2003**, *31*, 3381-3385.
- [16] Guex, N., Peitsch M.C., *Electrophoresis*, **1997**, *18*, 2714-2723.
- [17] Peitsch M.C., *Bio/Technology*, 1995, *13*, 658-660.
- [18] Hyperchem version 7.0 (Hypercube, Inc. <http://www.hyper.com/>).
- [19] Arguslab program (<http://www.arguslab.com>).
- [20] Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G.A., Nakatsuji H., Caricato M., Li X., Hratchian H.P., Izmaylov A.F., Bloino J., Zheng G., Sonnenberg J.L., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Montgomery Jr. J.A., Peralta J.E., Ogliaro F., Bearpark M., Heyd J.J., Brothers E., Kudin K.N., Staroverov V.N., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A., Burant J.C., Iyengar S.S., Tomasi J., Cossi M., Rega N., Millam N.J., Klene M., Knox J.E., Cross J.B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R.E., Yazyev O., Austin A.J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J.W., Martin R.L., Morokuma K., Zakrzewski V.G., Voth G.A., Salvador P., Dannenberg J.J., Dapprich S., Daniels A.D., Farkas Ö., Foresman J.B., Ortiz J.V., Cioslowski J., Fox D.J., *Gaussian 09, Revision A.1*. **2009**, Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- [21] Dennington II Roy, Keith Todd, Millam John, Eppinnett Ken, Hovell W. Lee, and Gilliland Ray, *GaussView, Version 3.09*, **2003**, Semichem, Inc., Shawnee Mission, KS.
- [22] Becke A.D., *Journal of Chemical Physics*, **1993**, *98*, 5648-5652.
- [23] Lee C., Yang W., Parr R.G., *Physical Review B*, **1988**, *37*, 785-789.
- [24] Pilbák S., Tomin A., Rétey J., Poppe L., *The FEBS Journal*, **2006**, *273*, 1004-1019.
- [25] Seff A.L., Pilbák S., Poppe L., *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Seria Chimia*, **2008**, *LIII*, *2*, 67-71.

-
- [26] Poppe L., Rétey J., *Angewandte Chemie, International Edition English*, **2005**, *44*, 3668-3688.
- [27] Morrison H., Bernasconi C., Pandey G., *Photochemistry and Photobiology*, **1984**, *40*, 549-550.
- [28] Taylor R.G., Levy H.L., McInnes R.R., *Molecular Biology and Medicine*, **1991**, *8*, 101-116.
- [29] Seff A.L., Pilbák S., Silaghi-Dumitrescu I., Poppe L., *4th Central European Conference: Chemistry towards Biology*, September 8-11, **2008**, Book of Abstracts, Dobogókő, Hungary, *p124*.
- [30] Baedeker M., Schulz G.E., *Structure*, **2002**, *10*, 61-67.
- [31] Moffitt M.C., Louie G.V., Bowman M.E., Pence J., Noel J.P., Moore B.S., *Biochemistry*, **2007**, *46*, 1004-1012.
- [32] Klee C.B., *Biochemistry*, **1974**, *13*, 4501-4507.
- [33] Hernandez D., Stroh J.G., Phillips A.T., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1993**, *307*, 126-132.
- [34] Merkel D., Rétey J., *Helvetica Chimica Acta*, **2000**, *83*, 1151-1160.
- [35] Galpin D., Ellis, B.E., Tanner, M.E., *Journal of American Chemical Society*, **1999**, *121*, 10840-10841.
- [36] Peterkofsky A., *Journal of Biological Chemistry*, **1962**, *237*, 787-795.
- [37] Christianson C.V., Montavon T.J., Festin G.M., Cooke H.A., Shen B., Bruner S.D., *Journal of American Chemical Society*, **2007**, *129*, 15744-15745.
- [38] Montavon T.J., Christianson C.V., Festin G.M., Shen B., Bruner S.D., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2008**, *18*, 3099-3102.
- [39] Röther D., Poppe L., Viergutz S., Langer B., Rétey J., *European Journal of Biochemistry*, **2001**, *268*, 6011-6019.
- [40] Hanson K.R., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1981**, *211*, 575-588.
- [41] Rétey J., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2003**, *1647*, 179-184.
- [42] Klee C.B., *The Journal of Biological Chemistry*, **1972**, *247*, 1398-1406.
- [43] Klee C.B., Kirk K.L., Cohen L.A., McPhie P., *Journal of Biological Chemistry*, **1975**, *250*, 5033-5040.
- [44] Klee C.B., Kirk K.L., Cohen L.A., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1979**, *87*, 343-348.
- [45] Nauton L., Kahn R., Garau G., Hernandez J.F., Dideberg O., *Journal of Molecular Biology*, **2008**, *375*, 257-269.
- [46] Bebrone C., *Biochemical Pharmacology*, **2007**, *74*, 1686-1701.
- [47] Martini D., Ranieri-Raggi M., Sabbatini A.R.M., Moir A.J.G., Polizzi E., Mangani S., Raggi A., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2007**, *1774*, 1508-1518.
- [48] Lipscomb W.S., Strater N., *Chemical Reviews*, **1996**, *96*, 2375-2433.
- [49] Gerhardt S., Hassal G., Hawtin P., McCall E., Flavell E., et al., *Journal of Molecular Biology*, **2007**, *373*, 891-902.
- [50] Debela M., Goettic P., Magdolen V., Huber R., Schechter N.M., Bode W., *Journal of Molecular Biology*, **2007**, *373*, 1017-1031.
- [51] Gomis-Rüth F.X., Kress L.F., Bode W., *EMBO Journal*, **1993**, *12*, 4151-4157.