

Ivica Đilović

**STRUCTURAL STUDIES OF BOVINE
3-HYDROXYANTHRANILATE 3,4-DIOXYGENASE**

Doctoral Thesis

submitted to the Department of Chemistry,
Faculty of Science, University of Zagreb,
for the academic degree of
Doctor of Natural Sciences (Chemistry)

Zagreb, 2011.

This Doctoral Thesis was done in the Laboratory of General and Inorganic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Croatia under the supervision of Prof. Dubravka Matković-Čalogović.

Acknowledgments

This work certainly could not have been written without the people who have always provided me help, support and guidance - so is my pleasant duty and an honor to thank them for everything they have done.

It is really hard to find words to describe my gratitude to my supervisor Prof. Dubravka Matković-Čalogović for her enthusiasm, inspiration, kindness, help, support and professional guidance during all these years. It has been an honor to be her student.

My acknowledgments also go to members of the evaluation committee Prof. Jasmina Rokov Plavec and Prof. Giuseppe Zanotti whose helpful suggestions and comments increased readability and reduced ambiguity.

Dr. Rodolpho Berni, Dr. Francesca Gliubich and Dr. Giorgio Malpeli are gratefully acknowledged for their previous research on 3HAO purification and crystallization.

I am especially grateful to my colleagues and friends from the Laboratory of General and Inorganic Chemistry for giving me support and creating a pleasant and stimulating working environment.

Finally, I thank members of my family for their unconditional love and indefinite support throughout my life.

Ivica

*For Ivana who lives with me every day and Roko who
makes it all worthwhile.*

Contents

Acknowledgments	iii
Abstract	vii
Sažetak (<i>in Croatian</i>)	viii
Prošireni sažetak (<i>in Croatian</i>)	ix
1 Introduction	1
2 Literature review	4
2.1 Non-heme iron-dependent dioxygenases	4
2.2 Occurrence within catabolic pathways	7
2.2.1 Aromatic amino acid degradation pathways in bacteria .	7
2.2.2 Mammalian aromatic amino acid degradation pathways .	7
2.3 Classification of ring-cleaving dioxygenases	12
2.3.1 Vicinal Oxygen Chelate superfamily	12
2.3.2 Cupin superfamily	15
2.4 Recent X-ray structures of dioxygenases	19
2.4.1 Intradiol dioxygenases	19
2.4.2 Extradiol dioxygenases	20
2.4.3 What controls intradiol versus extradiol specificity? . . .	27
2.5 3-Hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	29
2.5.1 Structural aspects	30
2.5.2 The mechanism of inactivation of 3-hydroxyanthranilate- 3,4-dioxygenase by 4-chloro-3-hydroxyanthranilate	37

3	Materials and methods	43
3.1	Purification	43
3.2	Crystallization	44
3.2.1	Native protein	44
3.2.2	Heavy atom derivatives	44
3.3	Data Collection	44
3.4	Structure Determination, Refinement and Evaluation	45
3.4.1	Trials using the isomorphous replacement method	45
3.4.2	Trials using the molecular replacement method with an unchanged model	46
3.4.3	Trials using the molecular replacement with models al- tered by pruning of the non-conserved residues	47
3.4.4	The solution. Refinement and evaluation.	48
4	Results and discussion	66
4.1	Overall structure of bovine 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	66
4.2	The enzyme active site	74
4.3	Comment on proposed mechanisms	79
4.4	Other metal ion partially occupied locations	81
5	Conclusion	83
	Bibliography	84
	List of Figures	xiii
	List of Tables	xxii
	Curriculum vitae	xxiv

University of Zagreb

Faculty of Sciences and Mathematics

Doctoral Thesis

Department of Chemistry

**STRUCTURAL STUDIES OF BOVINE 3-HYDROXYANTHRANILATE
3,4-DIOXYGENASE**

IVICA ĐILOVIĆ

Laboratory of General and Inorganic Chemistry, Department of Chemistry,

Faculty of Science, University of Zagreb

Horvatovac 102a, HR-10 000 Zagreb, Croatia

3-Hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase (3HAO) is responsible for the conversion of 3-hydroxyanthranilic acid (2-amino-3-hydroxybenzoic acid, 3HA) to quinolinic acid (2,3-pyridinedicarboxylic acid, QUIN). It acts in the final step of the kynurenine pathway, where it catalyzes the opening of the benzene ring with the incorporation of both atoms of molecular oxygen. The enzyme is of special interest because the product of reaction which it catalyses is related with several neurological disorders. For these reasons, the kynurenine pathway is considered to be a possible pharmacological target for such disorders. The bovine enzyme is a monomer consisting of 286 amino acids. Its crystal structure was determined at 2.5 Å resolution. The core motif is a jellyroll β -barrel formed by two antiparallel β -sheets with a topology which is characteristic of the cupin barrel fold. The iron-coordinating residues, two histidines and a glutamate, are highly conserved, as they are structurally similar to those found in other organisms. The pentacoordinated iron ion is in the active site and is bound deep inside the N-terminal cupin barrel. The enzyme 3HAO is an excellent example of the molecular evolution of a protein: from bacteria and simple eukaryotes, where it is a dimer, its structure has transformed in higher eukaryotes into a monomer that includes components of the dimer, suggesting that the mammalian enzyme could have originated by a gene-duplication event, followed by a divergent evolution.

(91 + xxxiii pages, 43 figures, 16 tables, 80 references, original in English)

Thesis is deposited in the National and University Library (Zagreb, Croatia) and the Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb (Zagreb, Croatia).

Key words: dioxygenation / enzyme / protein crystallography / extradiol dioxygenase / cupin superfamily

Supervisor: Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Professor, University of Zagreb

Reviewers: Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor, University of Zagreb

Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Professor, University of Zagreb

Dr. Giuseppe Zanotti, Professor, University of Padua

Thesis accepted: June 29, 2011

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

**STRUKTURNA ISTRAŽIVANJA GOVEĐE 3,4-DIOKSIGENAZE
3-HIDROKSIANTRANILNE KISELINE**

IVICA ĐILOVIĆ

Zavod za opću i anorgansku kemiju, Kemijski odsjek,
Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Horvatovac 102a, HR-10 000 Zagreb, Hrvatska

3,4-Dioksigenaza 3-hidroksiantranilne kiseline je enzim koji je odgovoran za pretvorbu 3-hidroksiantranilne kiseline (2-amino-3-hidroksibenzojeva kiselina, 3HA) u kvinolinsku kiselinu (2,3-piridinikarboksilnu kiselinu, QUIN). Sudjeluje u završnom koraku kinureninskog puta, gdje katalizira otvaranje benzenskog prstena i ugradnju obaju atoma iz molekule kisika. Enzim je od posebnog značaja jer je produkt reakcije koju katalizira povezan s brojnim neurološkim poremećajima pa se zbog toga kinureninski put smatra mogućom farmakološkom metom. Goveđi enzim je monomer koji je izgrađen od 286 aminokiselina. Njegova kristalna struktura određena je pri rezoluciji od 2,5 Å. Osnovni motiv je nalik na β -bačvu koja je izgrađena od dvije antiparalelne β -ploče. Bočni ogranci dvaju histidina i jednog glutamata koordiniraju željezov ion. Te su aminokiseline prisutne u svim poznatim dioksigenazama. U aktivnom mjestu željezov ion je pentakoordiniran. Ovaj enzim je izvanredan primjer evolucije proteina: od bakterija i jednostavnih eukariota, gdje je dimer, struktura se kod viših eukariota mijenja u monomer koji sadrži sve komponente dimeranaslućujući da je enzim iz sisavaca nastao kopiranjem gena poslije čega je uslijedila divergentna evolucija.

(92 +xxxiii stranica, 43 slike, 16 tablica, 80 literaturnih navoda, jezik izvornika engleski)

Rad je pohranjen u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici (Zagreb, Hrvatska) i u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu (Zagreb, Hrvatska).

Ključne riječi: dioksigenacija / enzim / proteinska kristalografija / ekstradiolna dioksigenaza / cupa-superporodica

Mentor: Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, red. prof. (Sveučilište u Zagrebu)

Ocjenjivači: Dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, doc. (Sveučilište u Zagrebu)

Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, red. prof. (Sveučilište u Zagrebu)

Dr. sc. Giuseppe Zanotti, red. prof. (Sveučilište u Padovi)

Rad prihvaćen: 29. lipnja 2011.

Prošireni sažetak

Aromatski spojevi se zbog svoje stabilnosti mogu pronaći diljem biosfere. Njihova relativna nereaktivnost čini ih otpornima na biorazgradnju, a kako su neki od tih spojeva izrazito opasni za većinu životinja, potreba za njihovom razgradnjom je uvelike prisutna. Priroda je na taj izazov odgovorila specifičnim procesima razgradnje u kojima specijalizirani enzimi, oksigenaze, cijepaju polikličke aromatske spojeve u jednostavnije supstrate. Oksigenaze su sposobne aktivirati molekulu kisika i ugraditi njezin(e) atom(e) u produkt(e) čime obično dolazi do cijepanja aromatskog spoja. Za djelovanje većine dioksigenaza potreban je metalni faktor, koji je najčešće željezov(II) ili željezov(III) ion [T. H. D. Bugg, *Comprehensive Natural Products II* **8** (2010) 583—623; T. D. H. Bugg and S. Ramaswamy, *Curr. Opin. in Chem. Biol.* **12** (2008) 134—140; F. H. Vaillancourt, J. T. Bolin, L. D. Eltis, *Crit. Rev. in Biochem. and Mol. Biol.* **41** (2006) 241—267].

Dioksigenaze su prema načinu cijepanja aromatskog prstena podijeljene u dvije osnovne skupine: intradiolne oksigenaze koriste nehemski ion željeza(III) kao kofaktor kako bi prekinule kovalentnu vezu u aromatskom prstenu koja se nalazi na *orto* položaju u odnosu na hidroksilne skupine; i ekstradiolne oksigenaze koje koriste nehemski ion željeza(II) (ili neki drugi metalni ion) kako bi prekinule kovalentnu vezu u aromatskom prstenu koja se nalazi u *meta* položaju u odnosu na hidroksilne skupine. U intradiolnim oksigenazama željezov(III) ion je koordiniran dvama bočnim ograncima histidina i dvama bočnim ograncima tirozina, a u ekstradiolnim oksigenazama željezov(II) ion je koordiniran dvama bočnim ograncima histidina i bočnim ogrankom glutamata. Kod obaju enzima, ostatak koordinacijske sfere je popunjen molekulama vode koje disociraju prilikom vezanja supstrata [T. D. H. Bugg and S. Ramaswamy, *Curr. Opin. in Chem. Biol.* **12** (2008) 134—140; J. D. Lipscomb, *Curr. Opin. in Chem. Biol.*

18 (2008) 644—649]. Prisutnost mononuklearnog metalnog kofaktora povoljno utječe na problem koji se javlja prilikom spajanja dvaju supstrata koji se nalaze u različitim spinskim stanjima tako da se oba tipa reakcije zbivaju bez prisustva reducirajućih kofaktora. U novije vrijeme, dioksigenaze se koriste i za razgradnju spojeva koji su trajni zagađivači okoliša [F. H. Vaillancourt, M.-A. Haro, N. M. Drouin, Z. Karim, H. Maaroufi, L. D. Eltis, *Jour. of Bacteriology* **185** (2003) 1253—1260].

Spomenute skupine dioksigenaza pripadaju dvjema evolucijski različitim superporodicama proteina. Intradiolne dioksigenaze pripadaju jednoj skupini, dok ekstradiolne dioksigenaze pripadaju trima različitim skupinama. Dioksigenaze tipa I pripadaju VOC-superporodici, tipa II pripadaju nepoznatoj skupini proteina, a dioksigenaze tipa III pripadaju cupa-superporodici (cupa *lat.* mala bačva). Pripadnici te porodice posjeduju strukturu koja nalikuje na bačvu izgrađenu od β nabranih ploča. 3,4-Dioksigenaza 3-hidroksiantranilne kiseline (3HAO, EC 1.13.11.6) pripada upravo toj porodici [J. M. Dunwell, S. Khuri, P. J. Gane, *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* **64** (2000) 153—179; G. Agarwal, M. Rajavel, B. Gopal, N. Srinivasan, *PLoS ONE* **4** (2009) e5736].

3HAO je enzim koji je odgovoran za pretvorbu 3-hidroksiantranilne kiseline (2-amino-3-hidroksibenzojeva kiselina, 3HA) u kvinolinsku kiselinu (2,3-piridindikarboksilnu kiselinu, QUIN). Sudjeluje u posljednjem koraku kinureninskog puta, gdje katalizira otvaranje benzenskog prstena supstrata. U tom se koraku u supstrat ugrađuju oba atoma iz molekule kisika pri čemu nastaje nestabilni međuprodukt, semialdehid 2-amino-3-karboksimukonske kiseline, koji se dalje spontano raspada na QUIN (koji se poslije dekarboksilacije može prevesti u pikolinsku kiselinu) [P. Malherbe, C. Kohler, M. Da Prada, G. Lang, V. Kiefer, R. Schwarcz, H. W. Lahm, A. M. Cesura, *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 13792—13797; K. L. Colabroy and T. P. Begley, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 840—841]. QUIN je aminokiselina koja se pojavljuje u prirodi, prekursor je piridinskog prstena u nikotinamidnim kofaktorima i strukturni analog neurotransmitera, poput L-glutamata i L-aspartata. QUIN je i potentan ekscitoksin koji selektivno aktivira receptore *N*-metil-D-aspartata i povezana je s mnogim neurološkim poremećajima (epilepsija, Huntingtonova bolest, encefalopatija, demencija, imunodeficijencija kod osoba koje boluju od AIDS-a) [M. P. Heyes,

Biochem. Soc. Trans. **21** (1993) 83–89; R. Schwarcz, C. A. Tamminga, R. Kurlan, I. Shoulson, *Ann. Neurol.* **24** (1988) 580–582; C. L. Achim, M. P. Heyes, C. A. Wiley, *J. Clin. Invest.* **91** (1993) 2769–2775]. Iz navedenih razloga, kinureinski put se smatra mogućom farmakološkom metom za razvoj novih lijekova [M. P. Heyes, *Adv. Exp. Med. Biol.* **398** (1996) 125–129; T. W. Stone and L. G. Darlington, *Nature Reviews Drug Discovery* **1** (2002) 609–620].

Dugo se smatralo da se biosinteza QUIN iz triptofana zbiva samo u eukariotskim organizmima, dok se kod prokariota QUIN proizvodi iz aspartata i dihidroksiaceton fosfata. S vremenom, uloge triptofana u biosintezi QUIN i aktivnost 3HAO potvrđene su i u nekoliko bakterijskih sustava (npr. *Ralstonia metallidurans*) kao i kod kvasca [O. Kurnasov, V. Goral, K. L. Colabroy, S. Gerdes, S. Anantha, A. Osterman, T. P. Begley, *Chem. Biol.* **10** (2003) 1195–1204; W. A. Koontz, R. Shiman, *J. Biol. Chem.* **251** (1976) 368–377]. Zbog svoje nestabilnosti i velikih problema koji se pojavljuju kod ekspresije, 3HAO iz mnogih eukariotskih sustava je bila slabo istražena [V. Calderone, M. Trabucco, V. Menin, A. Negro, G. Zanotti, *Biochim. Biophys. Acta* **1596** (2002) 283–292; K. L. Colabroy, H. Zhai, T. Li, Y. Ge, Y. Zhang, A. Liu, S. E. Ealick, F. W. McLafferty, T. P. Begley, *Biochemistry* **44** (2005) 7623–7631]. Identifikacija i ekspresija bakterijske 3HAO iz *R. metallidurans* učinila je ovaj enzim dostupnim u većim količinama, jer je relativno stabilan čime su se olakšala istraživanja strukture enzima i mehanizma djelovanja. 3HAO je ekstradiolna dioksigenaza čija aktivnost ovisi o prisutnosti nehemskog željeza, Fe(II), kao kofaktora u aktivnom mjestu. Enzim 3HAO iz *R. metallidurans* je homodimer koji je izgrađen od dvije jednake podjedinice koje se sastoje od 174 aminokiselinkse podjedinice. Primijećeno je da je neaktivan nakon pročišćavanja, ali aktivnost se može vratiti inkubacijom s Fe(II) i DTT-om [Y. Zhang, K. L. Colabroy, T. P. Begley, S. E. Ealick, *Biochemistry* **44** (2005) 7632–7643; X. Li, M. Guo, J. Fan, W. Tang, D. Wang, H. Ge, H. Rong, M. Teng, L. Niu, Q. Liu, Q. Hao, *Protein Sci.* **15** (2006) 761–773]. 4-Halo-hidroksiantranilati su prepoznati kao selektivni i potentni inhibitori mehanizma 3HAO. To svojstvo čini ih poželjnim (farmakološkim) kandidatima koji će kontrolirati koncentraciju QUIN u međustaničnoj tekućini. U istraživanjima inhibicije 3HAO iz *R. met-*

allidurans 4-kloro-3-hidroksiantranilat (ClHAA) zaključeno je da enzim i inhibitor stvaraju kovalentni adukt. U kasnijim istraživanjima pokazano je da je inhibicija reverzibilna pri 37 °C te da je 4-kloro-3-hidroksiantranilat čvrsto vezani inhibitor. Istražena je kristalna struktura enzima pri rezoluciji od 1.9 Å, struktura enzima kompleksiranog s ClHAA i molekulom kisika ili dušikovog monoksida pri rezoluciji od 2.0 Å i struktura enzima kompleksiranog s HAA pri rezoluciji od 3.2 Å. Rezultati istraživanja su pokazali da je funkcijska biološka osnova homodimer te da je topologija monomera enzima karakteristična za smatanje koje nalikuje na malu bačvu (eng. *cupin barrel folding*). Svaki monomer posjeduje dva vezna mjesta za ione Fe(II): jedno je katalitičko, a drugo je rubredoksinskog tipa nepoznate funkcije. Udaljenost između dva iona Fe(II) iznosi 24 Å. Ion Fe(II) nalazi se u središtu jednog monomera i koordiniran je s bočnim ograncima His51, His57 i His95. U navedenim kompleksima enzima, 3HA se didentantno veže na Fe(II), a ClHAA se pomoću 3-hidroksi grupe monodentantno veže na Fe(II). Nekoliko aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu je pogodno za vezanje novih liganada ili katalizu. [Y. Zhang, K. L. Colabroy, T. P. Begley, S. E. Ealick, *Biochemistry* **44** (2005) 7632—7643; X. Li, M. Guo, J. Fan, W. Tang, D. Wang, H. Ge, H. Rong, M. Teng, L. Niu, Q. Liu, Q. Hao, *Protein Sci.* **15** (2006) 761—773]. Do početka istraživanja nije publicirana niti jedna kristalna struktura 3HAO iz eukariotskih sustava.

Goveđa 3HAO je monomer koji se sastoji od 286 aminokiselina. Molekulski model (u triklinskoj prostornoj grupi *P1* pri rezoluciji 2,5 Å) sastoji se od dvije domene: A domena uključuje aminokiseline od N-terminusa do 160, a B domena aminokiseline od 178 do C-terminusa. Domene su povezane dugim ostatkom koji se nalazi blizu površine A domene koja je jako slična onima koje su pronađene u *R. metallidurans* i kvascu. Osnovni motiv je β -bačva koja je izgrađena od dvije antiparalelne β -ploče koje su karakteristične za tu porodicu proteina. Ion željeza nalazi se u središtu te β -bačve i koordiniran je dvama bočnim ograncima histidina 47 i 91 i glutamata na položaju 53. Ostatak koordinacijske sfere je modeliran molekulama vode. Aminokiseline koje su značajne za djelovanje ovog enzima i koje se nalaze na ulazu u aktivno mjesto su očuvane kod svih organizama. To je prva struktura 3HAO iz eukariotskih sustava koja sadrži željezov ion u aktivnom mjestu.

Ovaj enzim (3HAO) je izvanredan primjer evolucije proteina: od bakterija i jednostavnih eukariota, gdje je dimer, struktura se kod viših eukariota mijenja u monomer. Podudarnost slijedova strukturno homolognih dijelova dvaju domena iznosi 17,5 %, predlažući mogućnost da je enzim iz sisavaca nastao kopiranjem gena poslije čega je uslijedila divergentna evolucija. Samo A domena posjeduje aktivno mjesto. Bez obzira na to, očuvan je katalitički mehanizam jer su svi aminokiselinski ostatci koji su važni za katalitičku reakciju sačuvani u svim organizmima. Razloge zbog kojih sisavci posjeduju veći enzim za kataliziranje iste reakcije još treba utvrditi.