



**Helene Bustad Johannessen**

Spesialbioingeniør og ph.d. ved Nasjonalt kompetansesenter for porfyrisykdommer (NAPOS), Haukeland universitetssjukehus (HUS)  
E-post: helene.bustad.johannessen@helse-bergen.no

# Ei brikke her og ei brikke der – til saman gir dei auka kunnskap om akutt intermitterende porfyri

**Kvar brikke er viktig i eit puslespel, for å sjå heilskapen. Gjennom funksjonell og strukturell karakterisering av variantar av hydroksymetylbilan syntase, eit enzym som er assosiert med ein porfyrisjukdom, har vi funne nye brikker som gir meir kunnskap om sjukdomsmekanismen.**

Hem er bygd opp av fire pyrrolringer og blir danna i hemsyntesen av åtte forskjellige enzym. Hydroksymetylbilan syntase (HMBS; også kjent som porfobilinogen deaminase) er det tredje enzymet i hemsyntesen, og koplar saman porfobilinogen (PBG) i fire trinn til ei lineær pyrrolkjede, via kofaktoren dipyrrometan. I denne samankoplinga oppstår det mellomprodukt av enzymet (E) og PBG substratet (S): ES, ES<sub>2</sub>, ES<sub>3</sub> og ES<sub>4</sub>.

## **Akutt intermitterende porfyri (AIP)**

Variantar av HMBS-genet kan gi HMBS som ikkje er i stand til å omsetje PBG eller å frigjere produktet hydroksymetylbilan (HMB). Desse genfeila er assosiert med akutt intermitterende porfyri (AIP), ein sjeldan og arveleg stoffskiftesjukdom som kan gi alvorlege akutte åtak. Symptoma er i regelen sterke magesmerter som ofte krevjar opioidbehandling, kvalme, taky-

kardi og hypertensjon. Mentale symptom som depresjon og andre psykiske forstyrringar er òg vanleg. Individ med sjukdomsassosierte HMBS-variantar vil ha HMBS med nedsett enzymaktivitet, og hastigheita vil vere avgrensa i dette trinnet i hemsyntesen. Endogene, hormonelle og metabolske faktorar som aukar behovet for hem, vil indusere hemsyntesen i levra. For dei med lågare HMBS-aktivitet enn normalt vil PBG og pyrrolforløparen delta-aminolevulinsyre (ALA) akkumulere. ALA er kjent nevrotoksisk og vil i høge konsentrasjonar kunne utløyse åtak.

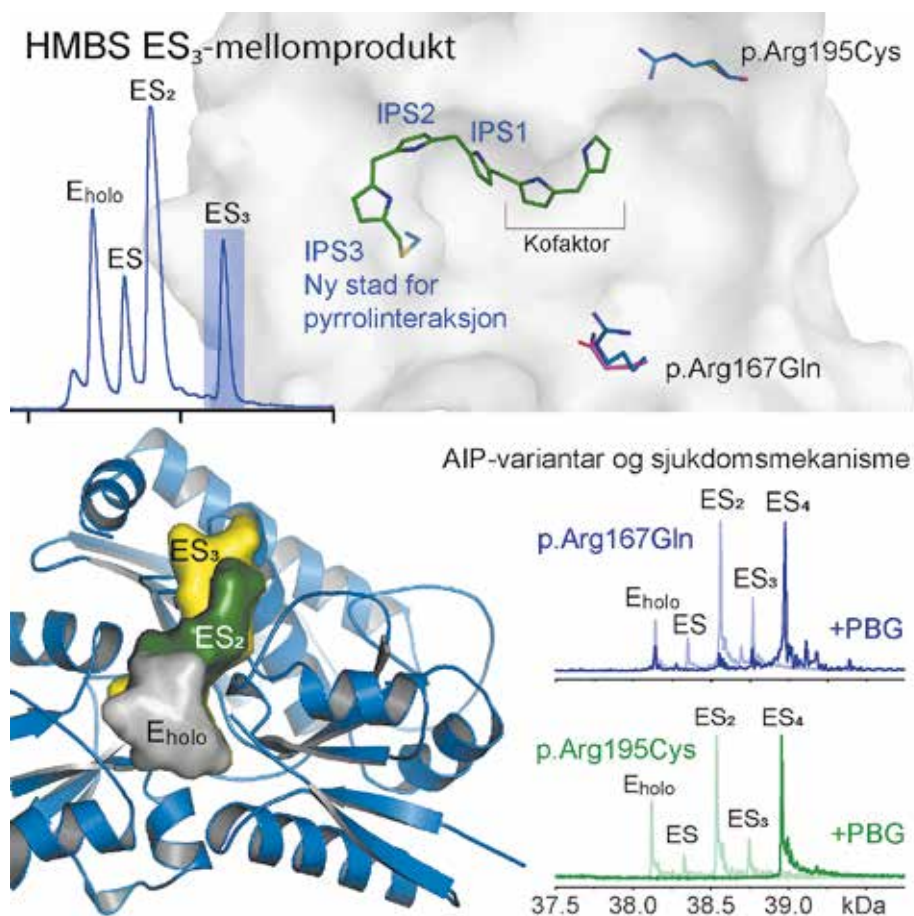
To HMBS-variantar som er kjent for å vere assosierte med AIP, er p.Arg167Gln og p.Arg195Cys. Arg167 er ei konservert aminosyre som sit i det aktive setet i enzymet, men utan direkte interaksjonar med kofaktoren. Arg195 er òg ei konservert aminosyre, og denne interagerer med kofaktoren. Både Arg167 og Arg195 er truleg involvert i pyrrolforlenginga til HMBS, og aminosyresubstitusjonar her vil påverke funksjonen.

I dette arbeidet har vi studert p.Arg167Gln og p.Arg195Cys, og enzymmellomprodukta som oppstår under samankoplinga av PBG (1). Mellomprodukta kan målast og identifiserast med ulike biokjemiske metodar. Vi har uttrykt rekombinant villtype HMBS og variantar, og nytta

## Om artikkelen

Studien ble utført av spesialbioingeniør og ph.d. Helene Bustad Johannessen ved Nasjonalt kompetansesenter for porfyrisykdommer (NAPOS), Haukeland universitetssjukehus (HUS), i samarbeid med flere fra NAPOS, University of Eastern Finland og Universitetet i Bergen. Den resulterte i artikkelen «One ring closer to a closure: the crystal structure of the ES3 hydroxymethylbilane synthase intermediate», publisert i tidsskriftet The

FEBS Journal i oktober 2023 (1). Studien er en del av forskingsprosjektet Prediktorer for sykdomsaktivitet og langtidskomplikasjoner ved akutt intermitterende porfyri (PredPor), ledet av overlege og ph.d. Aasne K. Aarsand, leder ved NAPOS, med finansiering fra Helse Vest, Nasjonal kompetansetjeneste for sjeldne diagnoser (NKSD), Laboratorieklinikken (HUS) og Avdeling for medisinsk biokjemi og farmakologi (HUS).



Mellomprodukta som oppstår i samankoplinga mellom HMBS (E) og substrat (S), ES, ES<sub>2</sub>, ES<sub>3</sub> og ES<sub>4</sub>, er stabile og kan isolerast med ionebyttekromatografi (øvtst t.v.) og detekterast med massespektrometri (nedst t.h.). Vi har sett på HMBS-variantane p.Arg167Gln og p.Arg195Cys, som vi veit kan gi sjukdommen akutt intermitterende porfyri (AIP). Aminosyrene Arg167 og Arg195 ligg på kvar si side av det aktive setet (øvtst t.h.) kor substratkoplinga skjer. Vi har studert korleis samankoplinga av substrata blir påverka når desse to aminosyrene blir substituert. Vi isolerte ES<sub>3</sub>-mellomproduktet av sjukdomsvarianten p.Arg167Gln kor enzymet med kofaktor er bunde til tre substrat, og bestemte krystallstrukturen til denne. Frå strukturen kunne vi sjå at enzymet har ein tredje og tidlegare ukjent interaksjonsstad (Intermediate Pyrrole Site 3; IPS3), som gjorde det mogleg å foreslå ei ny hypotese for fjerde og siste trinn i forlengingsmekanismen til HMBS. Begge variantane blei undersøkt med massespektrometri før og etter tilsetjing av substrat (PBG). Vi observerte korleis p.Arg167Gln hadde noko enzymaktivitet til tross for aminosyresubstitusjon, ved at alle mellomprodukta blei danna over tid (nedst t.h. i blått), medan p.Arg195Cys akkumulerte det siste ES<sub>4</sub>-mellomproduktet (nedst t.h. i grønt).

enzymaktivitetsanalysar, nativ gelelektroforese, ultra-høgopløysleg massespektrometri (ESI FT-ICR MS) og røntgenkrystallografi for å få tak i dei små detaljane rundt funksjonen og strukturen av HMBS.

### Ny hypotese

I artikkelen «One ring closer to a closure: the crystal structure of the ES<sub>3</sub> hydroxymethylbilane synthase intermediate», har vi tre hovudfunn:

1) Gjennom biokjemisk karakterise-

ring av HMBS-variantane p.Arg167Gln og p.Arg195Cys har vi fått informasjon om to variantspesifikke sjukdomsmekanismar på molekylært nivå.

2) Vi presenterer krystallstrukturen til mellomproduktet ES<sub>3</sub> (PDB ID: 8PND) og viser korleis pyrrolstrukturen trekkjer seg inn i det aktive setet via ein tredje, tidlegare ukjent interaksjonsstad. Dette gir generell informasjon om enzymmekanismen til HMBS.

3) Gjennom krystallstrukturen har vi fått indikasjonar på at frigjerings- og produktfrigjeringsprosessen kanskje skjer på ein annan stad enn det som ein har trudd til no. Vi presenterer difor ei ny hypotese for kor pyrrolkjeda blir hydrolysert, gjennom å sjå på dei tre aminosyrene Arg255, Glu258 og Arg355, som er i nærleiken av den tredje staden for interaksjon.

### Resultat

Oppsummert viser resultatene våre at Arg167 er med på å bestemme hastigheita for enzymkatalysen i alle trinna for pyrrolforlenging og produktfrigjeringsprosessen, medan Arg195 i hovudsak er involvert i sjølve frigjeringsprosessen av HMB-produktet. Vidare har vi indikasjonar på at HMB-produktet kan kløyvast av ved hydrolyse når hexapyrrolen er fullstendig tilbaketrekt i det aktive setet.

Resultata i denne artikkelen er ein del av det overordna prosjektet PredPor (Prediktorer for sjukdomsaktivitet og langtidskomplikasjonar ved akutt intermitterende porfyri), kor målet er å finne nye markørar og svar på kven i pasientpopulasjonen som treng tettare oppfølging. Funna vi har gjort gir ikkje direkte svar på desse spørsmåla, men er viktige puslespelbrikker som vil nyttast i vidare tolking av pasientprøver og data vi har samla inn i PredPor. PredPor-studien har tidlegare vore omtalt i Bioingeniøren (2). ■

### Referanser

1. Bustad HJ, Christie MS, Laitaoja M, Aarsand AK, Martinez A, Jänis J et al. One ring closer to a closure: the crystal structure of the ES<sub>3</sub> hydroxymethylbilane synthase intermediate. *FEBS J.* 2024; Epub 20.10.2023. DOI: 10.1111/febs.16982
2. Hansen G. Dedikert til porfyri. *Bioingeniøren* 2023; 3:18-20.