

**Scientific report – Raport științific
2021.01.01-31.12.2021**

PN-III-P1-1.1-TE-2019-2118

**Acronym/Titlu: RARE-PAL / Rational redesign of phenylalanine ammonia-
lyases for reversing their natural selectivity - Reproiectarea rationala a fenilalanina
amoniac-liazelor pentru inversarea selectivitatii lor naturale**

Abstract: according to the proposed plan, during the second financial period *Activity 1.2*, the Ala-scan of *PcPAL* active site residues and *Subactivity 1.3. D-selectivity measurements* has been performed, as well as *Activity 2, Iterative saturation mutagenesis -CASTing at D-selectivity modulation sites* have been implemented. Due to the occurrence of risk factors, the corresponding back-up solutions have been activated.

Rezumat: conform planului propus în aplicația de proiect, în a doua perioadă financiară a fost implementată cu succes *Activitatea 1.2*, testul de "Ala-scan" ale resturilor din situsul activ al enzime *PcPAL*, *Activitatea 1.3. Determinări D-selectivității* și totodată fiind implementată *Activitatea 2., Mutageneza de saturație iterativă -CASTing la resturi modulatorie a D-selectivității*. Datorită apariției unor riscurilor estimate, au fost activate metode/căi alternative pentru soluționarea acestora.

Raport integral

Activitate 1. Rational design driven site-directed mutagenesis for identification of D-selectivity modulating residues

Subactivitate 1.1. Site-directed mutagenesis driven by rational design concepts (months 1-3) – îndeplinită în cadrul primului an de decont, descrisă în raportul științific anterior.

Subactivitate 1.2. Testul de alanina (Ala-scan) al resturilor din situsul activ combinat cu fixarea monodentală (Ala-scan of active site residues combined with monodental substrate fixation)

Folosind variantele mutante H396K, H396Y ca matriță în reacțiile de PCR au fost introduse mutații adiționale ale celorlalte resturi din situsul activ al enzimei *PcPAL* (**Fig.1.** – situsul activ al enzimei *PcPAL*).

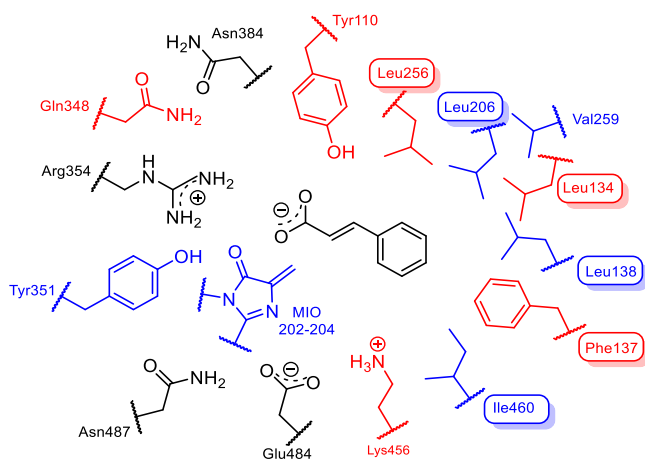
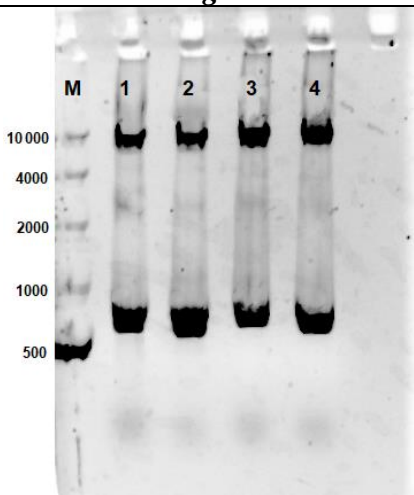


Figura 1. Modelul situsului activ al enzimei *PcPAL* (PDB ID: 6RGS) cu acidul (*E*)-cinamic ca ligand, reprezentând resturile de amino acizi la 5 Å distanță față de ligand. Culoarea amino acizilor reflectă poziția lor relativă față de planul ligandului: negru – în aceeași plan cu ligandul, roșu – deasupra planului ligandului, albastru – dedesubt planului ligandului.

Mutațiile resturilor R354, F440, Y110, Y354 nu au fost realizate, aceste resturi fiind cunoscute a fi esențiale activității enzimice, mutațiile lor la alanină inactivând enzima.¹

Mutațiile au fost realizate prin metoda megaprimerilor² obținându-se colecția de mutații din **Tabelul 1**. În cadrul planului inițial am propus și folosirea mutantului N384A ca și matriță pentru introducerea unor mutații adiționale, însă această variantă a enzimei s-a dovedit a fi inactivă pe parcursul măsurătorilor de activitate din cadrul *ctivității 1.3*. Interesant datele din literatură arată acest rest ca fiind unul conservat, iar mutantul echivalent N347A din AvPAL este raportat ca fiind unul activ, cu selectivitate D mărită³, astfel ca o etapă adițională am propus obținerea acestui mutant folosind clona enzimei AvPAL disponibilă în cadrul centrului de cercetare gazdă.

Nr.	Mutanti PcPAL	Numărul mutațiilor	Stagiul experimentelor	Gel de agaroză reprezentativă care arată mărimea corectă a de 8700 pb a plasmidelor mutagenici
1	H396K/L256A	2	Mutations successfully performed	 <p>C. DNA control after PCR, 1. PcPAL H396K/L256A mutant 2. PcPAL H396K/K456A mutant. 3. PcPAL H396Y/I460V 4. PcPAL H396Y/E484A mutant M. DNA Ladder</p>
2	H396K/L206A	2		
3	H396K/L134A	2		
4	H396K/L138A	2		
5	H396K/F137A	2		
6	H396K/I460A	2		
7	H396K/I460V	2		
8	H396K/E484A	2		
9	H396K/K456A	2		
10	H396Y/L256A	2		
11	H396Y/L206A	2		
12	H396Y/L134A	2		
13	H396Y/L138A	2		
14	H396Y/F137A	2		
15	H396Y/I460A	2		
16	H396Y/I460V	2		
17	H396Y/E484A	2		
18	H396Y/K456A	2		
19	AvPAL N347A	1		
20	AvPAL H359K	1		
21	AvPAL H359K	1		

Tabel 1. Variantele mutante de PcPAL și AvPAL obținute în cadrul *Activității 1.2*.

Prezența mutațiilor a fost confirmată prin secvențiere (**Figura 2.**), folosind serviciile de secvențiere Sanger ale firmei Biomi (Godollo, Ungaria).

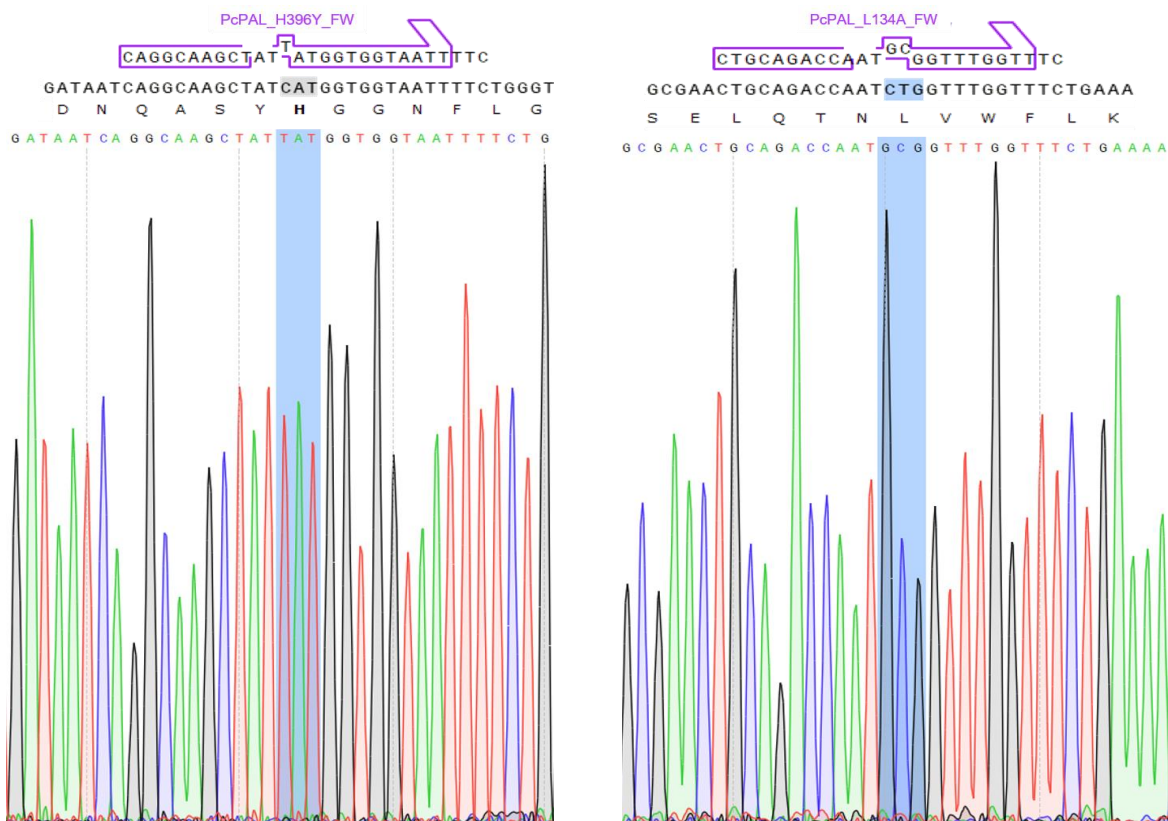


Figura 2. Rezultatul de secvențiere a mutantului *PcPAL* H396Y/L134A, care arată în zonele marcate prezența codonilor mutații TAT în loc de CAT (pentru mutația H396Y) și GCG în loc de CTG (pentru mutația L134A)

Subactivitatea 1.3. Determinarea D-selectivității (D-selectivity measurements)

Variantele mutante ale enzimei au fost testate atât în reacția de adădire a amoniacului la acidul cinamic cât și în reacția de eliminare a D - și/sau L -Phe.(**Figura 3.**)

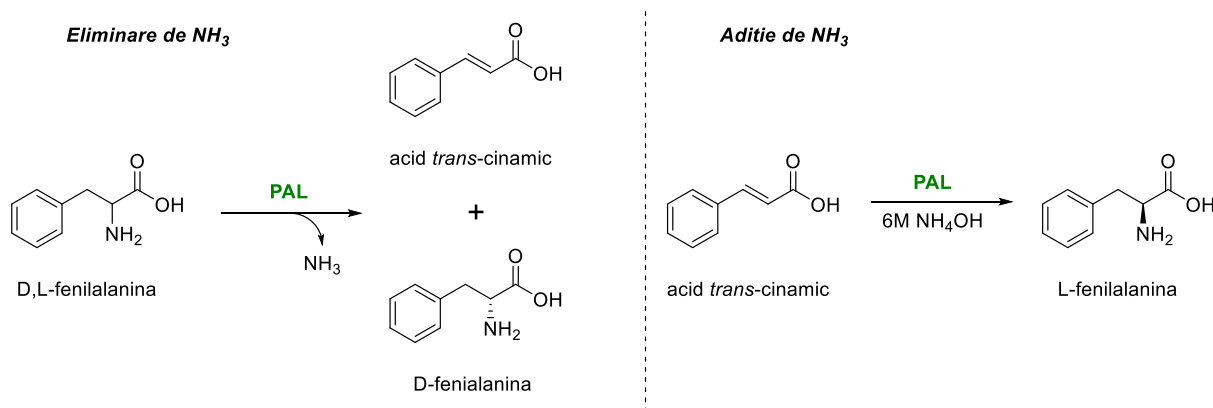


Figura 3. Reacțiile de eliminare și de adădire a amoniacului catalizate de enzimele PAL.

În primul rând, am urmărit activitatea și selectivitatea variantelor mutante obținute în biotransformări, folosindu-le sub formă de biocatalizatori de tip celule întregi. Reacția de eliminare a amoniacului a fost realizată pornind de la D-, respectiv L-fenilalanină (D-Phe, L-Phe); în cazul reacțiilor de adădire acidul *trans*-cinamic a fost folosit ca și substrat într-o soluție

amoniacală de 6 M, în timp ce peletul celular bacterian care conținea plasmidele variantelor mutante, a fost resuspendat în amestecul de reacția corespunzător. Conversiile biotransformărilor au fost determinate prin metode HPLC dezvoltate în prealabil în grupul nostru^{7,8} (**Figura 4**). Interesant variantele mutante H396K și H396Y, folosind celule întregi ca și biocatalizatori, prezintă conversii slabe (<5%) în reacția de eliminare din substratul natural L-Phe, conversii similare fiind obținute și cu D-Phe, ceea ce ar indica o selectivitate D crescută al enzimei, dar datorită conversiilor mici, acesta nu este folosibil pentru scopuri sintetice. Totuși în reacțiile de adiție a amoniacului variantele H396K și H396Y rezultă în conversii practice de 38% și 27%, respectiv, însă în toate cazurile s-a obținut enantiomerul L a fenilalaninei cu un exces enantiomeric de > 99%. Celulele întregi cu gena variantei mutante N384A *PcPAL* nu au rezultat conversii detectabile, rezultat ce indică esențialitatea restului N384 pentru activitatea enzimatică.

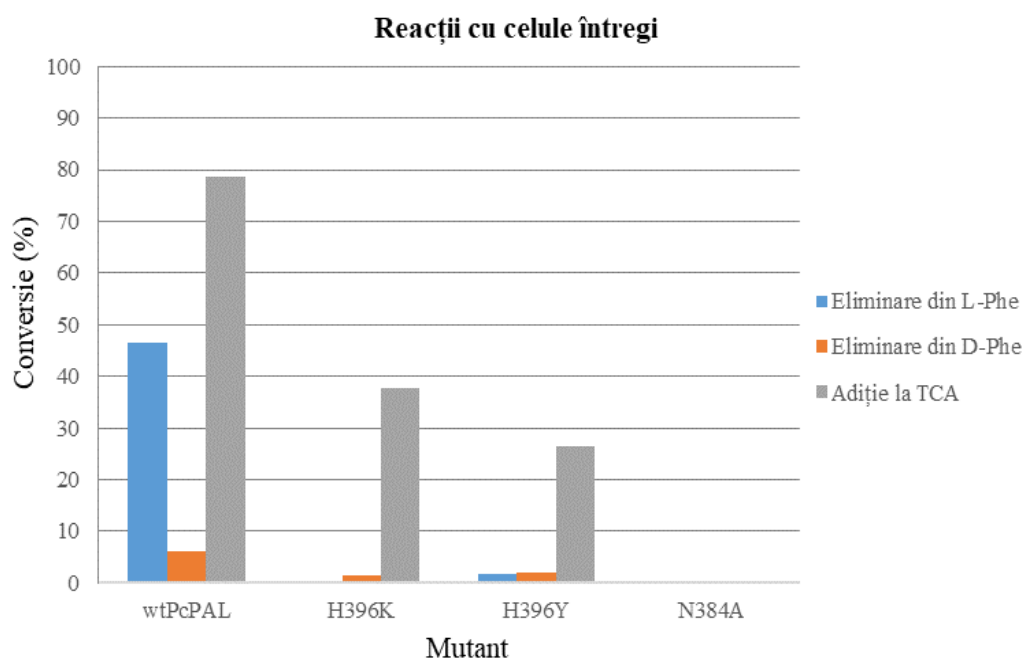


Figura 4. Conversiile reacțiilor de eliminare a amoniacului din L-Phe și D-Phe, și ale reacțiilor de adiție a amoniacului la acidul *trans*-cinamic (TCA), folosind variantele *PcPAL* H396K, H396Y și N384A, respectiv *wild-type* - varianta originală- sub formă de biocatalizatori de tip celule întregi.

Variantele mutante H396K, H396Y și N384A au fost deasemenea purificate, obținute sub formă de enzimă izolată (**Figura 5**), iar activitatea lor relativă a fost comparată cu activitatea prezentată de enzima nativă (wt-*PcPAL*) în reacția de eliminare a amoniacului din D- și L-fenilalanină în faza inițială a reacției (**Figura 6**).

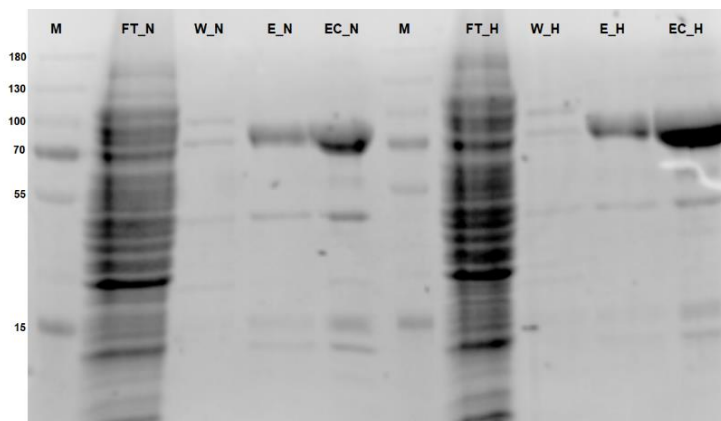


Figura 5: Electroforeză în gel de poliacrilamidă (SDS-PAGE) conținând probe din etapele de purificare ale proteinelor mutante *PcPAL* N384A (probele notate cu N) și *PcPAL* H396Y (probele notate cu H). (M-marker proteic; FT (flow through) – proba după trecerea supernatantului prin coloana de afinitate Ni-NTA; W (washing) – fracția eluată cu soluția de 25 mM imidazol, E – fracția de eluție cu 250 mM imidazol a proteinelor legate în mod specific, EC – fracția de eluție dializată și concentrată)

Rezultatele au fost asemănătoare cu cele obținute folosind celule întregi: *PcPAL* N384A și *PcPAL* H396Y nu au fost eficiente în reacțiile de eliminare, *PcPAL* H396K a rezultat conversie detectabilă, dar numai în reacția enantiomerului L, prezentând astfel L-selectivitate, asemănător enzimei *wild-type* (**Figura 6**).

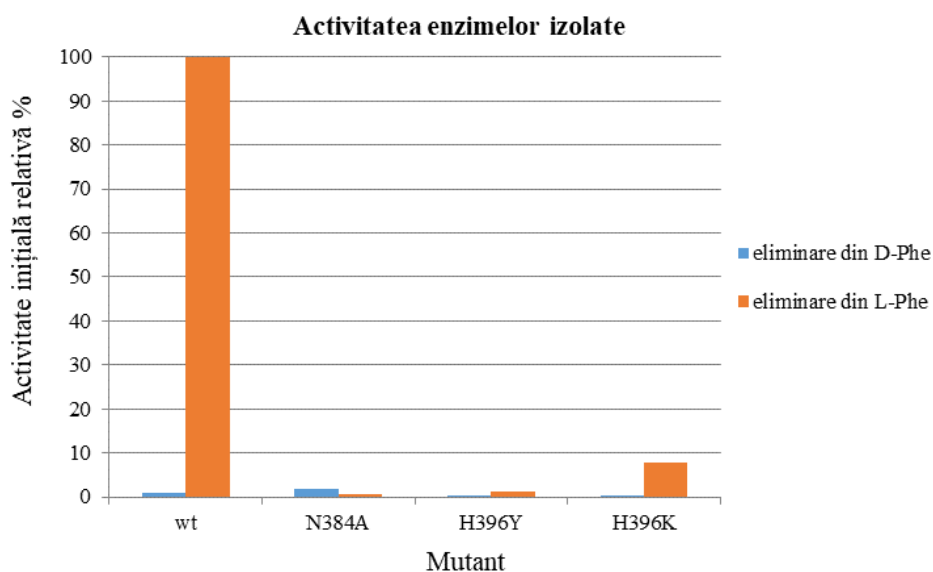


Figura 6. Conversiile reacțiilor de eliminare a amoniacului din L-Phe și D-Phe, folosind ca și biocatalizator variantele *PcPAL* H396K, H396Y și N384A, respectiv *wild-type* - varianta originală- sub formă de enzime izolate.

În lipsa unei îmbunătățiri ale D-selectivității în cazul *PcPAL*, a fost testat efectul celor trei mutații aduse direct enzimei *AvPAL*. Menționăm că Turner *et. al.*⁴ prin evoluția direcționată a *AvPAL* au identificat mutații H359K, respectiv H359Y (analogii mutațiilor H396K și H396Y *PcPAL*), cu activitate îmbunătățită față de o serie de analogi ai D-Phe, *totodată* Zhu *et al.* prin introducerea mutației N347A (analog cu mutația N384A) au produs o creștere adițională a D-selectivității enzimei *AvPAL*. În obținerea acestor mutații *AvPAL*, mutațiile am introdus prin aceeași metodă a megaprimerilor folosit anterior. Într-o primă instanță, enzimele

mutante N347A, H359Y și H359K au fost utilizate sub formă de celule întregi în reacțiile de eliminare ale amoniacului din cei doi enantiomeri L și D ai fenilalaninei, respectiv în reacția de hidroaminare a acidului *trans*-cinamic. Similar *PcPAL*, N347A a dus la inactivarea enzimei *AvPAL* (nefiind detectate conversii în nici una dintre biotransformările realizate în prezența acestei variante), în timp ce mutațiile din poziția H359 au permis obținerea de conversii semnificative pentru eliminarea din L-Phe, însă nici pentru H359Y, dar nici pentru H359K nu au fost observate îmbunătățiri majore ale enantioselectivității (**Fig. 7**), reacțiile de eliminare din D-Phe au decurs cu conversii mici, în timp ce enantiomerul produs prin reacția de adiție la acidul cinamic este exclusiv L-Phe.

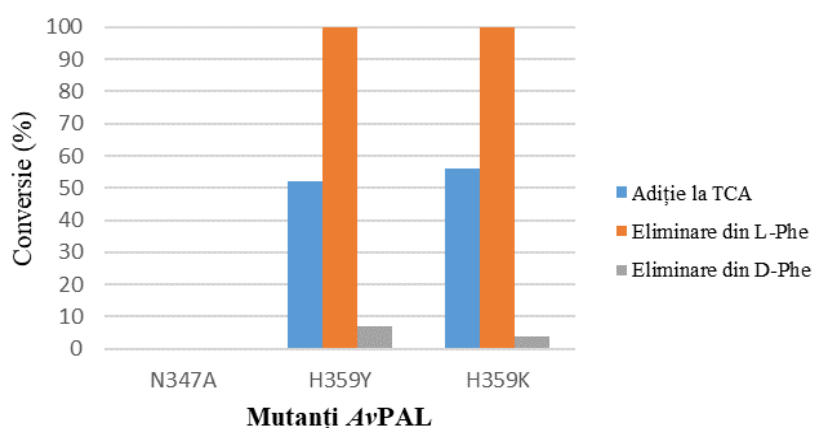


Figura 7. Activitatea mutanților *AvPAL* în reacțiile de eliminare și adiție a amoniacului. Conversii determinate prin HPLC după 20 h, coloană Gemini NX-C18 (150 × 4.5 mm; 5 μm), faza mobilă A: NH₄OH (0.1 M, pH 9.0) / B: MeOH, debit: 1 mL / min. Reacțiile au fost realizate la 30 °C, 800 rpm, utilizând celule întregi (OD₆₀₀=2) în volum final de 200 μL cu 20 mM Tris.HCl, pH 8.8, 2 mM L/D-Phe, respectiv cu 6 M NH₄OH pH 9,5, 2 mM TCA.

Conform literaturii^{3,4} cei doi mutanți au fost testați și în reacțiile de adiție a amoniacului utilizând derivați nenaturali ai acidului *trans*-cinamic, cu grupări electron-atrăgătoare grefate pe inelul aromatic și anume acidul *p*-bromo-*trans*-cinamic (*p*-Br TCA) și *p*-trifluorometil-*trans*-cinamic (*p*-CF₃ TCA). În ciuda faptului că reacțiile au decurs cu o conversie ridicată (**Figura 8**), nici în acest caz nu s-a observat creștere a D-selectivității, ambii mutanți ducând la producerea exclusivă a enantiomerului L. (**Figura 9,10.**) Totodată în testele pentru D-selectivitatea dublu mutanților 1-18 din **Tabelul 1**, obținute în *Activitatea 1.2*, nici un mutant bazat pe templații H396Y sau H396K nu a prezentat o activitate D- crescută, toate operând la conversii/activități mai scăzute decât varianta nativă, wild-type *PcPAL*, cu selectivitate exclusivă pentru producția enantiomerului L-Phe.

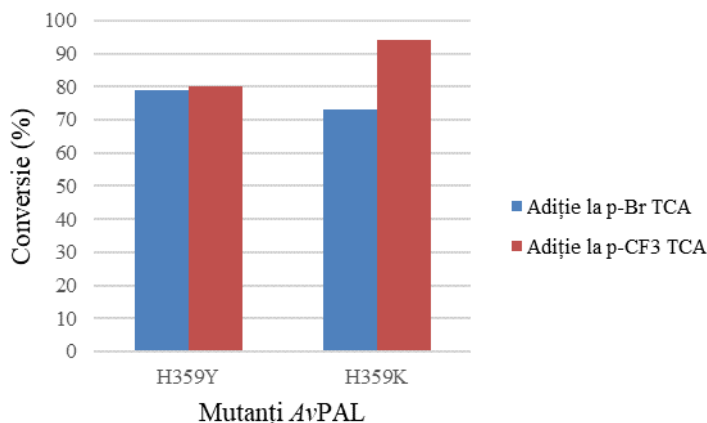


Figura 8. Mutanți AvPAL în reacția de adiție, utilizând substraturi nenaturale. Conversii determinate prin HPLC după 20 h timp de reacție, coloană Gemini NX-C18 (150 × 4.5 mm; 5 μm), faza mobilă A: NH₄OH (0.1 M, pH 9.0) / B: MeOH, debit: 1 mL / min. Reacțiile au fost realizate la 30 °C, 800 rpm, utilizând celule întregi (OD₆₀₀=2) în volum final de 200 μL cu 6 M NH₄OH pH 9,5 și 2 mM p-Br TCA, respectiv p-CF₃ TCA

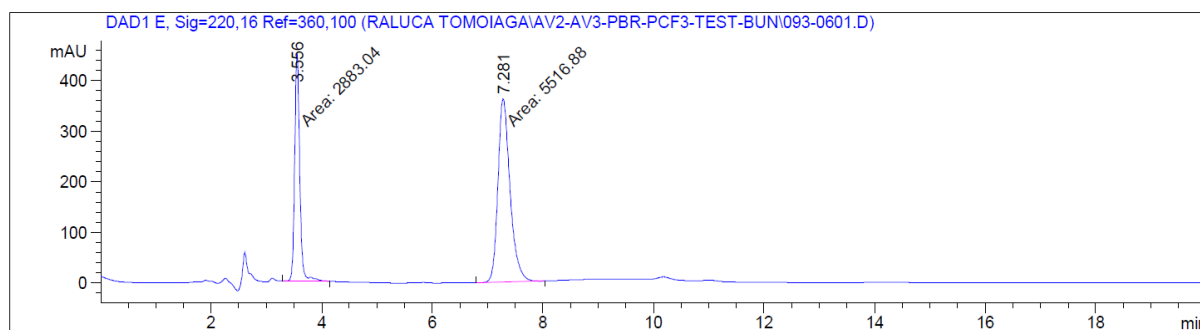


Figura 9. Cromatogramă reprezentativă, care arată semnalele ambelor enantiomeri L- și D-a amestecului racemic *rac-p*-CF₃-Phe, obținută pe coloana chirală Crownpak CR-I (+) (faza mobilă: A: HClO₄ pH 1.5 / B: ACN, măsurători realizate la 25 C), cu enantiomerul D la timp de retenție de 3,5 min, respectiv enantiomerul L la timp de retenție de 7,2 min.

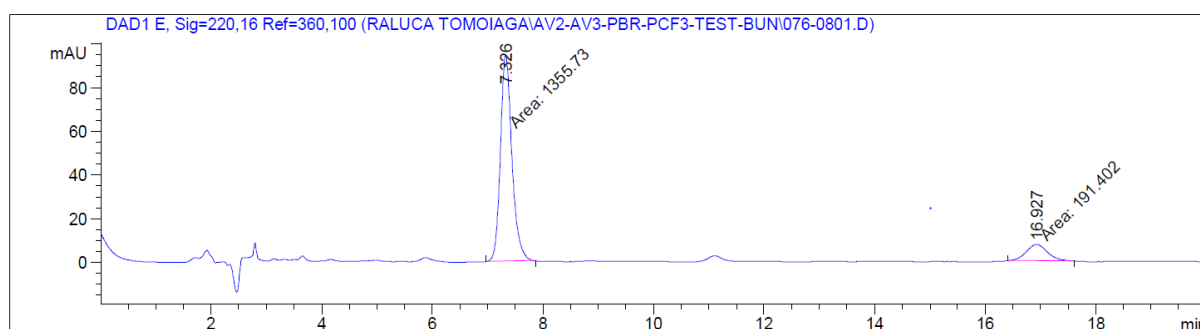


Figura 10. Cromatograma HPLC reprezentativă obținută pe coloana chirală Crownpak CR-I (+) pentru reacția de adiție a amoniacului la *p*-CF₃ TCA, utilizând celule întregi H396Y-AvPAL, după 20 ore, cu semnale specifice pentru enantiomerul L-*p*-CF₃-TCA (t_R=7,3 min) și pentru *p*-CF₃ TCA netransformat (t_R=16,9 min)

Rezultatele obținute cu variantele AvPAL mutante H359Y, H359Y, N347A nu se corelează cu datele din literatură, rezultatele raportate^{3,4} fiind ireproductibile după numeroasele noastre încercări. Bazându-ne pe expertiza vastă a echipei proiectului în enzimele PAL, excludem varianta lipsei de competență a echipei proiectului ca și motiv al acestei necorelări. Astfel abordarea proiectului, care parțial s-a bazat pe aceste date din literatură, trebuia reconsiderată, reproiectată, activitatea 1.1 și activitatea 1.2, fiind cele mai afectate.

Activitatea 2. Mutageneză de saturație iterativă – CASTing la pozițiile modulatorie ale D-selectivității

Sub-activitatea 2.1. Mutageneză de saturație și Sub-activitatea 2.2 teste de activitate ale transformanților obținuți prin mutageneza de saturație.

În cadrul acestei activități au fost generate colecții de mutații folosind codonii degenerați NNK (codifică toți cei 20 aminoacizi naturali și codonul STOP) la nivelul resturilor N260, Q348, N384, H396 și combinația lor, rezultând colecțiile de variante mutante: N260NNK, Q348NNK, N384NNK, H396NNK, respectiv Q348NNK/N384NNK.

Metoda de introducere a degenerării de codoni s-a bazat pe utilizarea de megaprimeri în reacția de PCR, conform metodei² dezvoltat în grupul nostru.

Obținerea unei degenerări reușite necesită optimizarea reacției de PCR în majoritatea cazurilor. Până la momentul actual a fost confirmată generarea următoarelor librării: N384NNK, H396NNK, N260NNK (Fig. 11).

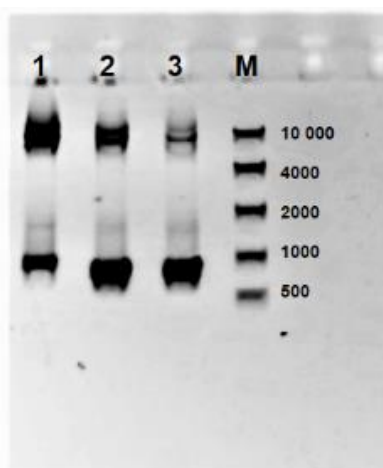


Figura 11. Verificarea produșilor de PCR prin electroforeză în gel de agaroză. (M - marker, numerele 1-3 - produși de PCR: 1 - PcPAL N384NNK, 2 - PcPAL H396NNK, 3 - PcPAL N260NNK)

Coloniile crescute după transformarea colecțiilor de ADN au fost verificate folosind metoda de screening cu randament ridicat dezvoltat în prealabil². Mediul de cultură lichidă a fost inoculată cu celule din coloniile obținute, iar după creștere, inducere și exprimare, distrugerea membranelor celulare s-a realizat chimic, folosind detergentul PMBS. Reacția de eliminare a NH₃ din D-Phe a fost inițiată prin adăugarea lizatului celular cu conținut enzimatic în mediul de reacție, după care activitatea inițială enzimei a fost urmărită spectrofotometric la 280 nm, unde produsul, acidul cinamic are absorbanța maximă specifică. S-au identificat 4 colonii cu activitate enzimatică mai mare decât a controlului, colonia cu plasmida enzimei originale wt-*PcPAL*. Aceste hit-uri, colonii pozitive, au fost mai departe testate sub formă de celule întregi, în reacțiile de adiție și eliminare a amoniacului, desfășurarea reacțiilor fiind monitorizată prin HPLC, determinând valorile conversiilor (**Figura 12.**). După 16 ore timp de reacție, raportul conversiilor enantiomerului D- și L- Phe în reacția de eliminare a amoniacului a fost cel mai mare în cazul coloniei C26 (derivă din colecția de mutații generată prin mutageneza de saturație H396NNK), urmată de colonia C15 (din colecția de mutații generată prin mutageneza de saturație N384NNK). Produsul reacțiilor de adiție a fost analizat pe o coloană chirală (Crownpak CR-I(+)) și a revelat faptul că și în aceste cazuri s-a format exclusiv enantiomerul L- al fenilalaninei.

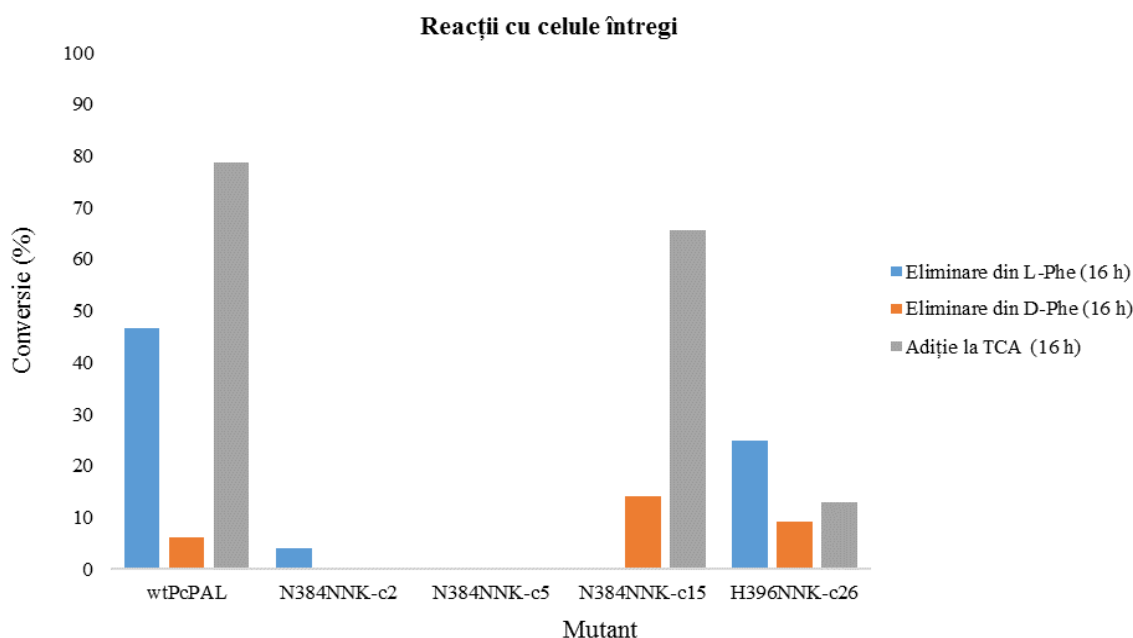


Figura 12. Conversiile reacțiilor de eliminare a amoniacului din L- Phe sau D-Phe, și ale reacțiilor de adiție a amoniacului la acidul *trans*-cinamic (TCA), folosind coloniile c2, c5, c15, c26, identificate prin testarea inițială a colecțiilor de mutații obținuți prin mutageneza de saturație N384NNK, H396NNK. Enzima *wild-type* - varianta originală- este folosită ca și termen de comparație, toate variantele de biocatalizatori fiind folosite sub formă de celule întregi.

Cele două variante mutante C26 și C5 au fost exprimate, izolate și purificate conform protocolului⁷ optimizat al grupului de cercetare, iar biotransformările au fost investigate și cu folosirea enzimelor purificate ca biocatalizatori. Pe lângă reacțiile de eliminare a amestecului racemic D,L-Phe, și reacția de adiție a acidului *trans*-cinamic, au fost testați și reacții ale substraturilor nenaturale substituiți pe scheletul aromatic, derivații *orto*-bromo și *orto*-metoxi corespunzători (**Figura 13**). În cazul reacțiilor de eliminare a amoniacului, ale amestecurile racemice, pe lângă conversiile prezentate în **Fig.13**, au fost monitorizate și excesele enantiomerice a produșilor de reacție. În cazul celor trei substraturi investigate, acesta a indicat transformarea enantiomerului L, și îmbogățirea amestecului de reacție cu enantiomerul D, netransformat prin reacție, ceea ce indică selectivitatea L- a proceselor. Reacțiile de adiție în cazul celor trei substraturi au decurs cu conversii ridicate (> 60%), analiza pe coloană chirală a produșilor rezultând într-un exces enantiomeric >99% pentru enantiomerul L.

Prin secvențierea plasmidelor extrase din coloniile N384NNK-c5 și H396NNK-c26 au fost identificate: mutantul N384Q în cazul c5 din colecția N384NNK, respectiv mutantul PcPAL H396C în cazul c26 din colecția H396NNK.

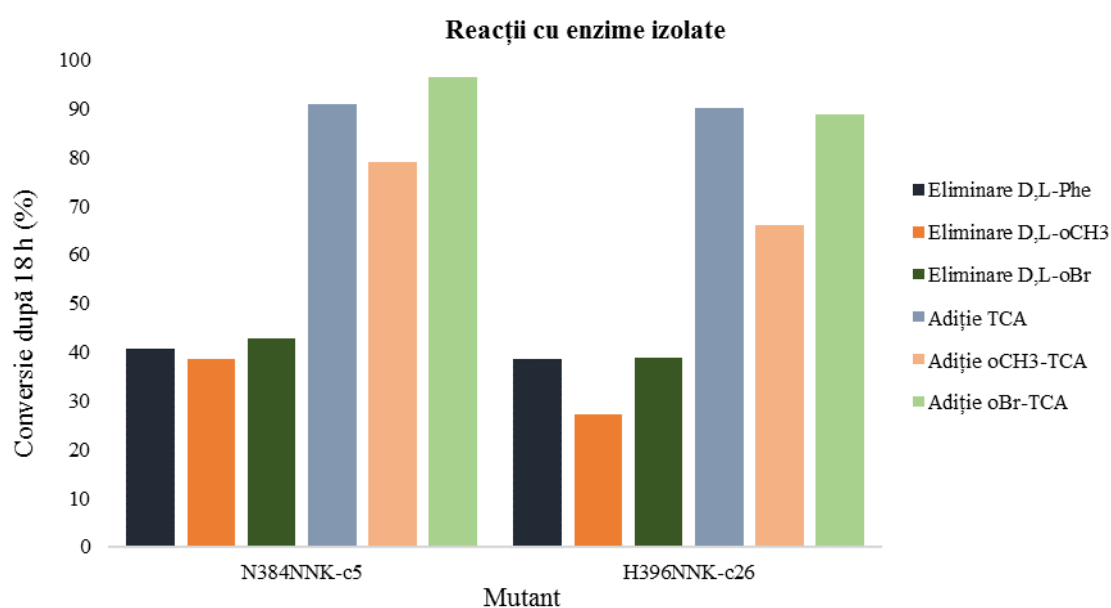


Figura 13. Conversiile reacțiilor de eliminare a amoniacului din amestecurile racemice L,D - Phe, L,D-*o*-CH₃-Phe, și L,D -*o*-Br-Phe și ale reacțiilor de adiție a amoniacului la acidul *trans*-cinamic (TCA), respectivi analogii *o*-CH₃ și *o*-Br substituiți, folosind ca și biocatalizator variantele c2, c26 sub formă de enzimă izolată.

Din colecția de mutanți obținută prin mutageneza de saturație N260NNK nu au fost identificate colonii cu activitate D - PAL îmbunătățită față de varianta originală a enzimei.

Aceste rezultate arată că mutații identificați N384Q și H396C nu posedă D-selectivitate în cazul reacției de adiție a amoniacului (direcția de reacție care este de interes industrial^{5,6} pentru sinteza analogilor de fenilalanină optic puri).

Deoarece în stadiul actual a proiectului prin activitățile propuse nu au fost identificate resturi modulatorie ale D-selectivității enzimei PAL, totodată datele referitoare la existența unor asemenea resturi fiind ireproductibile, proiectarea rațională din Activitatea 1.1. a fost reinițiată.

Sub-activitate 1.1. Mutagenză situs direcționată bazată pe concepte de proiectare rațională

a) Obținerea unei structuri cristaline potrivite pentru predicția D-selectivității.

Având în vedere rezultatele mai puțin pozitive ale experimentelor desfășurate cu scopul de a găsi resturile de aminoacizi prin schimbarea căreia se poate inversa stereoselectivitatea enzimei PcPAL, am ipotezat că modelul/structura cristalină a proteinei, pe care se bazează proiectarea rațională, nu este adecvată scopului. Din punct de vedere al obținerii de D aminoacizi, cu ajutorul enzimelor PAL, reacția de adiție a amoniacului la diferiți acizi cinamici este direcția de reacție de exploatat. Acesta utilizează ca și substrat acizii cinamici și se decurge la concentrații semnificative ale amoniacului. Rezultatele noastre anterioare⁷ indică clar o conformație diferită a enzimei PcPAL într-o soluție de Tris.HCl, în care se decurge reacția de eliminare a amoniacului, față de conformația acesteia în soluții cu conținut ridicat de amoniac, în care se decurge reacția de adiția a amoniacului catalizată de PAL. Astfel, pentru a studia așezarea substratului în situsul catalitic al enzimei în cazul reacției de adiție, este nevoie ca cristalizarea PcPAL-ului să se realizeze din mediu amoniacal, în prezența unui ligand care mimează substratul de tip acid cinamic, corespunzător direcției de reacție corespunzător adiției amoniacului. Menționăm că toate structurile PcPAL existente (PDB ID: 6RGS, 1W27, 6HQF, 6F6T) au fost obținute în absența de amoniac, iar numai structura 6RGS, obținută recent de noi⁸, conține un ligand de tip acid cinamic (*p*-metoxi-acid cinamic în acest caz). Deoarece acidul *trans*-cinamic în prezență de 0.1 M amoniac este transformată în L-Phe de către enzima PcPAL, am propus căutarea unor analogi ai acidului *trans*-cinamic, care sunt inhibitori competitivi ai enzimei PAL și în prezența căreia împreună cu amoniacul, proteina poate fi ”înghețată”, cristalizată într-o conformație, pe care o găsim și în faza lichidă a reacției de adiție a amoniacului. Astfel, structura unui PAL în prezența unui analog de acid cinamic și amoniac ar ajuta identificarea resturilor de aminoacizi care determină stereoselectivitatea

biocatalizatorului în reacțiile de adiție a amoniacului, ruta importantă din punct de vedere sintetic.

Compușii aleși ca și inhibitori potențiali sunt reprezentate în **Fig.14**. Inițial a fost testat efectul de inhibiție în reacția de interes, de adiția a amoniacului la acidul *trans*-cinamic, urmărind conversiile reacțiilor realizate în absența și în prezența inhibitorilor prin HPLC. Deoarece în numeroase cazuri semnalul inhibitorului s-a suprapus cu cel al substratului sau al produsului numai în cazul inhibitorilor I1, I2 și I6 s-au putut determina valorile de conversie prin metode HPLC (**Figura 15**). Rezultatele arată că în cazul compușilor I2 și I6 nu avem o scădere semnificativă a valorilor de conversie față de reacția control (cel realizat în absența potențialilor inhibitori), iar în cazul compusului I2, conversia este de 30% față de 78% a reacției control (**Figura 15**), ceea ce indică prezența unei inhibiții a activității enzimatice.

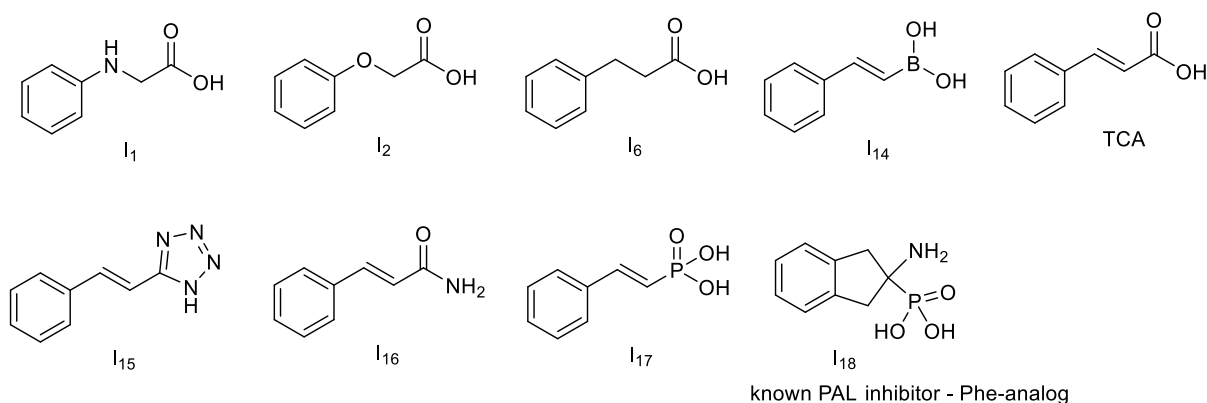


Figura 14. Anali ai acidului cinamic aleși testați ca și inhibitori al enzimei *PcPAL*, folosind ca și compuși de referință TCA și acidul fosfonic aminoindan (I18), un analog de Phe, cunoscut cu efect de inhibiție puternică asupra activității PAL.

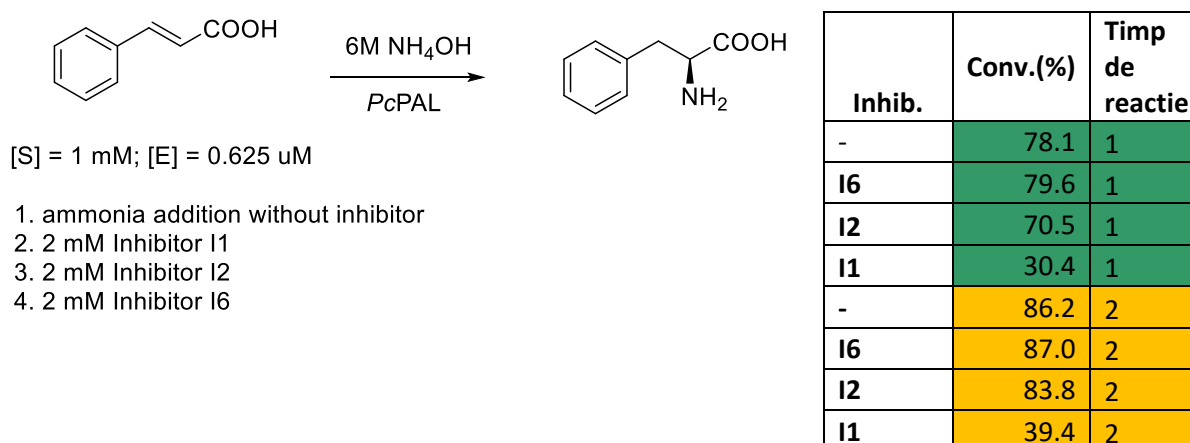


Figura 15. Efectul de inhibiție ale compușilor I1,I2, I6 asupra transformării acidului cinamic în L-Phe catalizate de *PcPAL*.

În celelalte cazuri nu am reușit dezvoltarea unor metode HPLC care ar permite determinarea valorilor de conversii ale acestor reacții, astfel am urmărit efectul de inhibiție ale compușilor în reacția naturală a enzimei *PcPAL*, cel de eliminare a amoniacului din L-Phe. Astfel, am urmărit vitezele inițiale ale activității enzimatice, determinând cinetica Michaelis-Menten în prezența și în absența diferitelor inhibitori (**Figura 16**), folosind metoda spectrofotometrică. Tipul inhibiției a fost determinată folosind reprezentările Lineweaver-Burk a curbelor MM de inhibiție (**Figura 17** – exemplu reprezentativ ilustrat în cazul rezultatelor obținute cu **I1**), după care folosind ecuațiile Michaelis-Menten specifice tipului de inhibiție, au fost determinate parametrii de inhibiție enzimatică (**Tabel 2**).

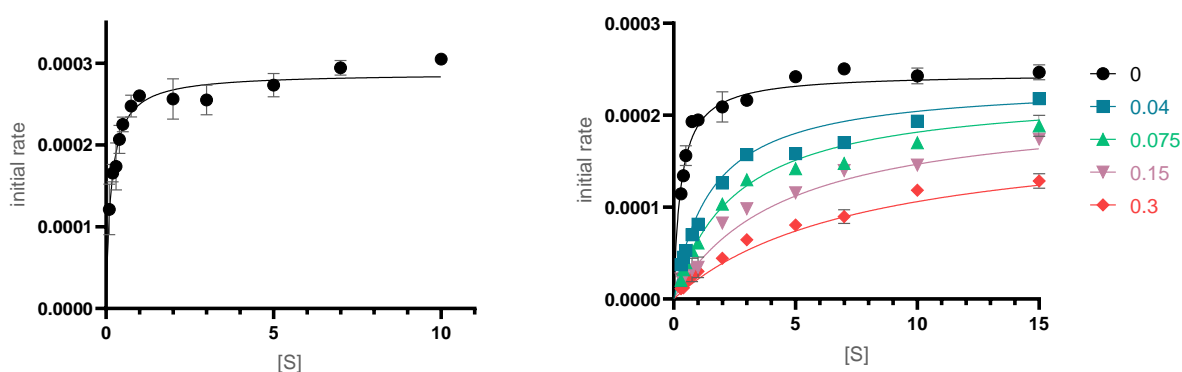


Figura 16. a) Curba Michaelis-Menten a reacției de eliminare a amoniacului din L-Phe catalizată de *wt-PcPAL*

b) curbă Michaelis-Menten de inhibiție în cazul reacției de eliminare a amoniacului din L-Phe catalizată de *wt-PcPAL* în prezența diferitelor concentrații de **I1** (*N*-fenilglicină).

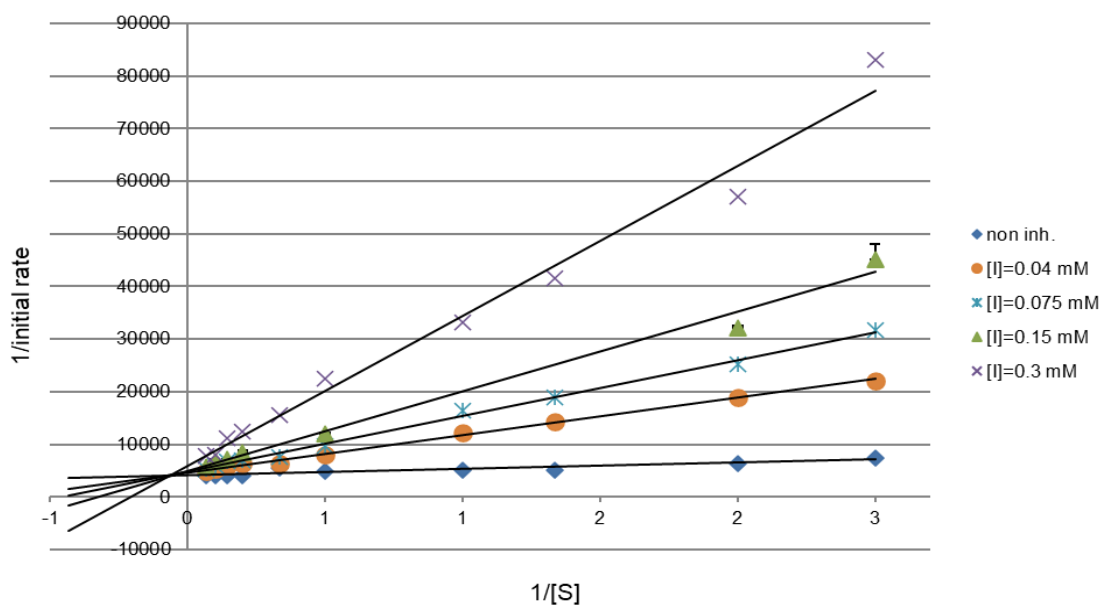


Figura 17. Reprezentarea Lineweaver-Burk în cazul curbelor MM obținute în prezența diferitelor concentrații de **I1**. Profilul reprezentării indică un model de inhibiție *linear mixtă*.

Valorile constantelor de inhibiție determinate (**Tabel 2**) arată că *N*-fenilglicina **I1** este cel mai potent inhibitor cu o constantă de inhibiție de 0,00093, apropiându-se de eficiența de inhibiție a celui mai puternic inhibitor PAL cunoscut la ora actuală, compusul **I18**, și depășind efectul de inhibiție ale acidului cinamic (TCA).

Inhibitor	v_{max} (sec⁻¹)	K_M* (mM)	K_I (mM)
Fără inhibitor	2.88·10 ⁻⁴	0.15	-
I1	2.5·10 ⁻⁴	0.3	0.0093
I2	2.3·10 ⁻⁴	0.51	0.39
I6	2.2·10 ⁻⁴	0.45	0.97
I14	2.3·10 ⁻⁴	0.47	3.50
I15	2.5·10 ⁻⁴	0.41	0.40
I16	2.2·10 ⁻⁴	0.49	0.56
I17	2.2·10 ⁻⁴	0.44	1.08
I18	2.13·10 ⁻⁴	0.52	0.00064
TCA	2.23·10 ⁻⁴	0.43	0.076

Tabel 2. Rezultatele măsurătorilor de cinetică pentru determinare constantelor de inhibiție K_I ale inhibitorilor I1-I18

Astfel dintre analogii de acid cinamic testați, compusul N-fenilglicina I1 s-a dovedit a fi inhibitorul cel mai puternic atât în reacțiile de adiție a amoniacului, cât și în reacțiile de eliminare.

Folosind *N*-fenilglicina **I1** și forma purificată a enzimei PcPAL, obținut de grupul proiectului, în grupul colaborator a Prof. Dr. Christopher Schoefield de la Universitatea Oxford a fost obținută structura cristalină a enzimei PcPAL în prezența *N*-fenilglicinei, soluția enzimei folosită în procesul de cristalizare conținând 0.1 M NH₃. Mai departe, am propus și obținerea unei structuri PAL care conține un analog de D -fenilalanină ca ligand, astfel am avea și o structură care reprezintă stadiului final al reacției de adiție a amoniacului. În aceste experimente cu aceași grup colaborator, a fost deasemenea obținută și structura cristalină a variantei mutante I460V PcPAL cu D-*meta*-trifluorometil-fenilalanină.

Rezolvarea optimă a ambelor structuri încă este în proces, dar situsul activ al enzimei din aceste structuri (**Figura 18**) a fost deja analizat.

Din rezultatele de inhibiție enzimatică și din noile structuri cristaline obținute este în pregătire un manuscris, data de trimire a articolului fiind estimat luna ianuarie 2022, jurnalul vizat fiind Scientific Reports de la editura Nature - Springer.

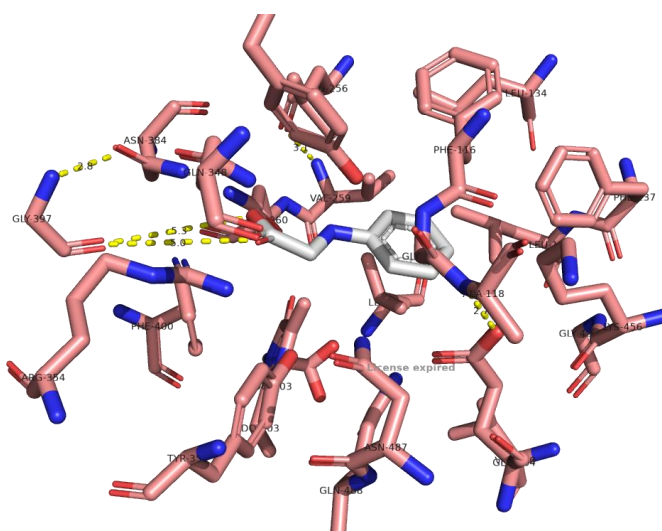


Figura 18. Situsul catalitic al enzimei *PcPAL* cu *N*-fenilglicina **I** ca și ligand.*Structura recent obținută în cadrul proiectului, nefiind publicată încă.

Pe baza analizei comparative a noilor structuri cu alte structuri *PcPAL* deja existente (PDB ID: 6RGS, 1W27, 6HQT, 6F6T) au fost proiectate următoarele amorse pentru a introduce modificările L256M, N260A, N260Q, Q348N, N384Q, Q488N separate și în diferite combinații. Schimbul de codoni s-a realizat folosind metoda de megaprimeri, iar în majoritatea cazurilor a fost și încă este necesară optimizarea condițiilor de reacție în lanț a polimerazei.

Nr. crt	Primer name	Sequence	T _M (min-max; °C)
1	<i>PcPAL</i> _L256M_F	5'-AGCCCAAGGAAGGA A TGGCCTTG-3'	65
2	<i>PcPAL</i> _N260A_F	5'-CCTTGGT AG CCGGAAGTCC-3'	63
3	<i>PcPAL</i> _N260Q_F	5'-GCCTTGGT ACAG GGAAGTCCG-3'	65
4	<i>PcPAL</i> _Q348N_F	5'-AAGCCCAAG AA CGACAGATACGCC-3'	65
5	<i>PcPAL</i> _N384Q_F	5'-AACTCCGTAAACGAC CA GCCCTTGATTG-3'	67
6	<i>PcPAL</i> _Q488N_F	5'-AACAGCATAAC AA CGACGTAAACTCCTTGGG-3'	67

Prezența mutațiilor au fost confirmată prin secvențiere pentru următoarele variante: L256M, N260A, N260Q, L256M/N260Q, L256M/N260A, L256M/N260Q/Q348N, N384Q și Q488N. Genele *pcpal* mutante au fost transformate în celule gazdă BL21 Gold (DE3) și activitatea, respectiv selectivitatea lor urmând a fi testată în reacțiile de adădire și eliminare de amoniacului.

References

- 1 L. Poppe, L., J. Rétey, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 3668–3688.
- 2 Tomoiagă R.B., Tork S.D., Horváth I., Filip A., Nagy L.C., Bencze L.C., *Biomolecules*, **2020**, *10*(6): 838
- 3 Zhu, L., Feng, G., Ge, F. et al. *Appl Biochem Biotechnol*, **2019**, *187*, 75–89
- 4 Parmeggiani, F., Lovelock, S. L., Weise, N. J., Ahmed, S. T., & Turner, N. J. *Angew. Chem.*, **2015**, *127*, 4691-4694.
- 5 F. Parmegiani, N. J. Weise, S. T. Ahmed, N. J. Turner, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 73-118
- 6 L. A. Hardegger, P. Beney, D. Bixel, C. Fleury, F. Gao, A. G.-G. Perrenoud, X. Gu, J. Haber, T. Hong, R. Humair, A. Kaegi, M. Kibiger, F. Kleinbeck, V. T. Luu, L. Padeste, F. A. Rampf, T. Ruch, T. Schlama, E. Sidler, A. Udvarhelyi, B. Wietfeld, Y. Yang, *Org. Process Res. Dev.*, **2020**, *24*, 1763.
- 7 A. Filip, E. Z. A. Nagy, S. D. Tork, G. Bánóczy, I. M. Toşa, F. D. Irimie, L. Poppe, C. Paizs, L. C. Bencze, *ChemCatChem.*, **2018**, *10*, 2627.
- 8 E. Z. A. Nagy, S. D. Tork, P. A. Lang, A. Filip, F. D. Irimie, L. Poppe, I. M. Toşa, C. J. Schofield, J. Brem, C. Paizs, *ACS Catal.*, **2019**, *9*, 8825.

Date: 04.12.2021

Signature: Dr. Laszlo Csaba Bencze

