

**Scientific report – Raport științific
15.09.2020-14.09.2022**

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 entire financial period all activities of the project have been implemented. During the implementation of *Activity 1.1, 1.2, 1.3* as well as *Activity 2*. no PAL variants with significant D-selectivity have been obtained, reported data from literature found to be irreproducible, causing the appearance of additional risks, for which the corresponding back-up solutions, through a redression plan have been activated. The mentioned redressal activities focused on obtaining a suitable PAL-structure for the identification of D-selectivity modulator residues (modification of *Activity 3.3*) and on the redesign of PAL through site-directed mutagenesis (completing *Activities 1.1, 1.3*) for other challenging substrates of industrial interest (completing *Activities 2.1* and *2.2*), following by the functional/structural characterization of these novel PALs (*Activities 3.1, 3.2*) and their employment within engineered PAL biotechnologies (*Activities 4.1, 4.2*)

Rezumat: conform planului propus, în întreaga perioadă financiară au fost implementate toate activitățile propuse ale proiectului. În timpul implementării *Activităților 1.1, 1.2, 1.3* precum și a *Activității 2*. nu s-au obținut variante mutante ale enzimei PAL cu D-selectivitate semnificativă, iar datele raportate din literatură s-au dovedit ca fiind ireproductibile, provocând apariția unor riscuri suplimentare, astfel au fost activate soluțiile de rezervă corespunzătoare bazându-se pe un plan de remediere. Activitățile de redresare s-au concentrat pe obținerea unei structuri a proteinei PAL, potrivită pentru identificarea resturilor de aminoacizi modulatori a D-selectivității (modificarea *Activității 3.3*) și pe reproiectarea enzimei PAL prin mutagenză situs-direcționată (completarea *Activităților 1.1, 1.3*) în privința acceptării altor substraturi provocatoare de interes industrial (completarea *Activităților 2.1* și *2.2*), urmată de caracterizarea funcțională/structurală a acestor PAL-uri noi (*Activitățile 3.1, 3.2*) și utilizarea lor în noile biotehnologii proiectate bazate pe PAL (*Activitățile 4.1, 4.2*).

Raport integral

Activitate 1. Rational design driven site-directed mutagenesis for identification of D-selectivity modulating residues (Mutagenză situs-direcționată bazată pe proiectare rațională pentru a identifica resturi modulatori a D-selectivității)

Subactivitatea 1.1. Mutagenză situs-direcționată bazată pe concepte de proiectare rațională (luniile 1-3)

Pe baza abordării de proiectare rațională propusă pentru inversarea selectivității enzimei PcPAL, au fost introduse următoarele mutații în gena proteinei: H396K, H396Y, N384A (aminoacizii respectivi fiind implicați în formarea rețelei de legături de H care include și restul R354 responsabil pentru fixarea grupului carboxilic al substratului). Mutațiile respective au fost introduse în combinație sau fără mutațiile resturilor hidrofobe L206, L134, L256 la fenilalanina (F) voluminoasă, astfel încercând restricția acomodării substratului în conformația care favorizează formarea enantiomerului L-fenilalaninei. Aceste mutații vor fi testați în combinație sau fără mutațiile resturilor F137, I460, K456 la aminoacizi mai mici (alanină sau valină), care ar oferi mai mult spațiu pentru acomodarea substratului într-o conformație care rezultă enantiomerul D a fenilalaninei ca și produs de reacție. Resturile de aminoacizi din situsul activ sunt prezentate pe **Figura 1**, iar mutații obținuți sunt enumerați în **Tabelul 1**.

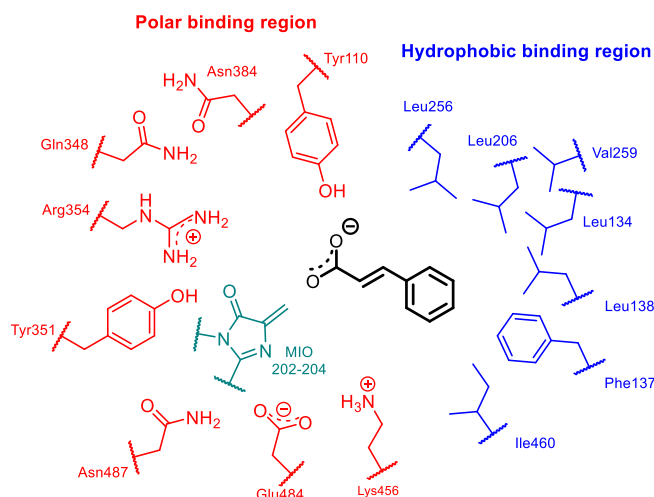


Figura 1. Modelul situsului activ al enzimei PcPAL (PDB ID: 6RGS) cu acidul (*E*)-cinamic ca ligand, reprezentând resturile de amino acizi la 5 Å distanță față de ligand. Culoarea amino acizilor reflectă poziția lor relativă față de planul ligandului: negru – în aceeași plan cu ligandul, roșu – deasupra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

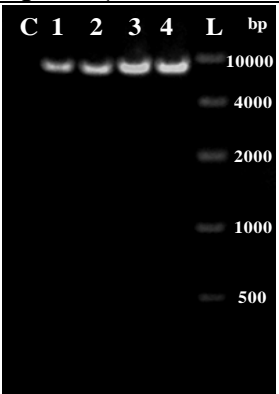
Mutațiile propuse au fost introduse aplicând protocolul de mutageneză situs-direcționată dezvoltat de Naismith și colab.¹ Prin urmare, perechile de amorse (primeri) au fost proiectate astfel încât să conțină o secvență care nu se suprapune și o secvență care se suprapune, adică este complementară pe un segment al secvenței cu perechea ei de primer (complementaritate primer-primer), temperatura de topire a secvenței nesuprapuse ($T_{m\ no}$) fiind cu 5 - 10 °C mai mare decât cea a secvenței suprapuse ($T_{m\ pp}$), astfel încât secvențele care nu se suprapun să poată etanșa discontinuitatea (nick) în secvență și să se lege eficient de ADN-ul nou sintetizat.

În general, reacțiile PCR folosind acești primeri au fost realizate cu succes/s-au desfășurat cu eficiență ridicată (Figura din **Tabelul 1**), doar în unele cazuri a avut loc o amplificare cu eficiență mai scăzută. În aceste cazuri, optimizarea condițiilor de reacție (adăugarea de DMSO, modificarea concentrației de ADN matriță și de primeri) a asigurat efectuare cu succes a reacțiilor de PCR.

Reacțiile PCR au fost realizate într-un volum final de 50 μ l, utilizând 2 ng de ADN matriță (plasmide care codifică gena enzimei *wild-type*, disponibile în cadrul grupului de cercetare), 1 μ M primeri, 200 μ M dNTP și 3 unități de ADN polimeraza Phu Hot-Start. Protocolul reacției de PCR a implicat următorii pași: denaturare inițială la 95 °C timp de 5 minute, urmată de 20 de cicluri de amplificare, fiecare ciclu constând din denaturare la 95 °C timp de 1 minut, alinierea primerilor la $T_{m\ no}-5$ °C timp de 1 minut și extensia la 72 °C timp de 10 minute (500 pb/min). Ciclurile au fost finalizate cu o etapă de aliniere finală la $T_{m\ pp}-5$ °C timp de 1 minut și de extensie finală la 72 °C timp de 30 de minute. Producții de PCR au fost digestați, în continuare, cu 5 unități de enzimă de restricție DpnI la 37 °C timp de 2 ore, după care 10 μ l din fiecare produs de PCR a fost analizat prin electroforeză în gel de agaroză. 3 μ l din fiecare produs de PCR a fost transformat prin șoc termic în celule competente *E.coli* XL-1 Blue. Celulele transformate au fost dispersate pe plăci Luria-Bertani (LB) suplimentate cu antibioticele corespunzătoare, iar plăcile au fost incubate la 37 °C peste noapte. Două dintre coloniile de pe fiecare placă au fost crescute și ADN-ul plasmidic a fost izolat. Pentru a verifica prezența mutațiilor dorite, 300 ng de ADN plasmidic a fost amestecat cu 50 pmol primer T7, sau primeri de secvențiere proiectați către grupul de cercetare, într-un volum final de 12 μ l și a fost trimis la secvențiere de ADN, folosind serviciile de secvențiere ale firmei Biomi (Gödöllő, Ungaria).

În continuare, plasmidele conținând genele mutante au fost transformate cu succes în diferite celule gazdă *E.coli* (*E. coli* Rossetta DE3, pLysS) potrivite pentru exprimarea proteinei.

Livrabile: a fost obținută cu succes colecția de mutații a enzimei PcPAL (**Tabelul 1**) care poate fi utilizată mai departe în testarea D-selectivității.

<i>Nr.</i>	<i>Mutații PcPAL propuși</i>	<i>Numărul de mutații introduși</i>	<i>Stadiul experimentului</i>	<i>Electroforeză în gel de agaroză reprezentativă a produșilor de PCR</i>
1	H396K	1	Mutații introduse cu succes	 <p>C 1 2 3 4 L bp 10000 4000 2000 1000 500</p> <p>C. Control negativ, amestecul de PCR înainte de efectuare a reacției de PCR, 1. Mutantul PcPAL L134FV, 2. Mutantul PcPAL H396K, 3. Mutantul PcPAL N384A, 4. Mutantul PcPAL Q488N, L. Marker ADN</p>
2	H396Y	1		
3	N384A	1		
4	Q488N	1		
5	E484D	1		
6	K457S	1		
7	K457A	1		
8	H396K/F137V	2		
9	H396Y/F137V	2		
10	H396K/F137A	2		
11	H396Y/F137A	2		
12	L134F	1		
13	L206F	1		
14	L256F	1		
15	L134F/F136A	2		
16	E484D/H396K	2		
17	E484D/L134F	2		
18	E484D/L256F	2		
19	E484D/K456S	2		

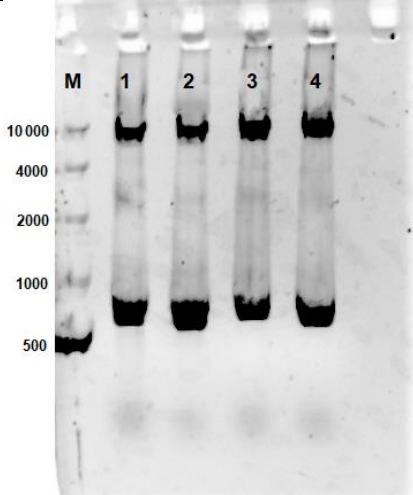
Tabelul 1. Produsii reacțiilor de PCR efectuate pentru obținerea mutațiilor PcPAL, prin mutageneza situs-direcționată a resturilor de aminoacizi din situsul catalitic al enzimei, selectate prin proiectare rațională. Plasmidele cu genele PAL mutante, obținute în urma amplificării, migrează conform mărimii lor de 8700 pb.

Subactivitate 1.2. Testul de alanină (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 ADN 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). Mutațiile resturilor R354, F440, Y110, Y354 nu au fost realizate, aceste resturi fiind cunoscute a fi esențiale activității enzimatice, mutațiile lor la alanină inactivând enzima.²

Mutațiile au fost realizate prin metoda megaprimerilor³ obținându-se colecția de mutații din **Tabelul 2.** În cadrul planului inițial am propus și folosirea mutantului N384A ca ADN matriță pentru introducerea unor mutații adiționale, însă această variantă a enzimei s-a dovedit a fi inactivă pe parcursul măsurătorilor de activitate din cadrul *Activității 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 mărită⁴, astfel ca o etapă adițională am propus obținerea acestui mutant folosind clona enzimei AvPAL disponibilă în cadrul centrului de cercetare gazdă.

<i>Nr.</i>	<i>Mutații PcPAL</i>	<i>Numărul mutațiilor</i>	<i>Stagiul experimentelor</i>	<i>Gel de agaroză reprezentativă care arată mărimea corectă de 8700 pb a plasmidelor mutagenici</i>
1	H396K/L256A	2	Mutations	
2	H396K/L206A	2	successfully	
3	H396K/L134A	2	performed	

4	H396K/L138A	2		 <p>M. Marker ADN, 1. Mutantul <i>PcPAL</i> H396K/L256A, 2. Mutantul <i>PcPAL</i> H396K/K456A, 3. Mutantul <i>PcPAL</i> H396Y/I460V, 4. Mutantul <i>PcPAL</i> H396Y/E484A.</p>
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 2. 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 (Gödöllő, Ungaria).

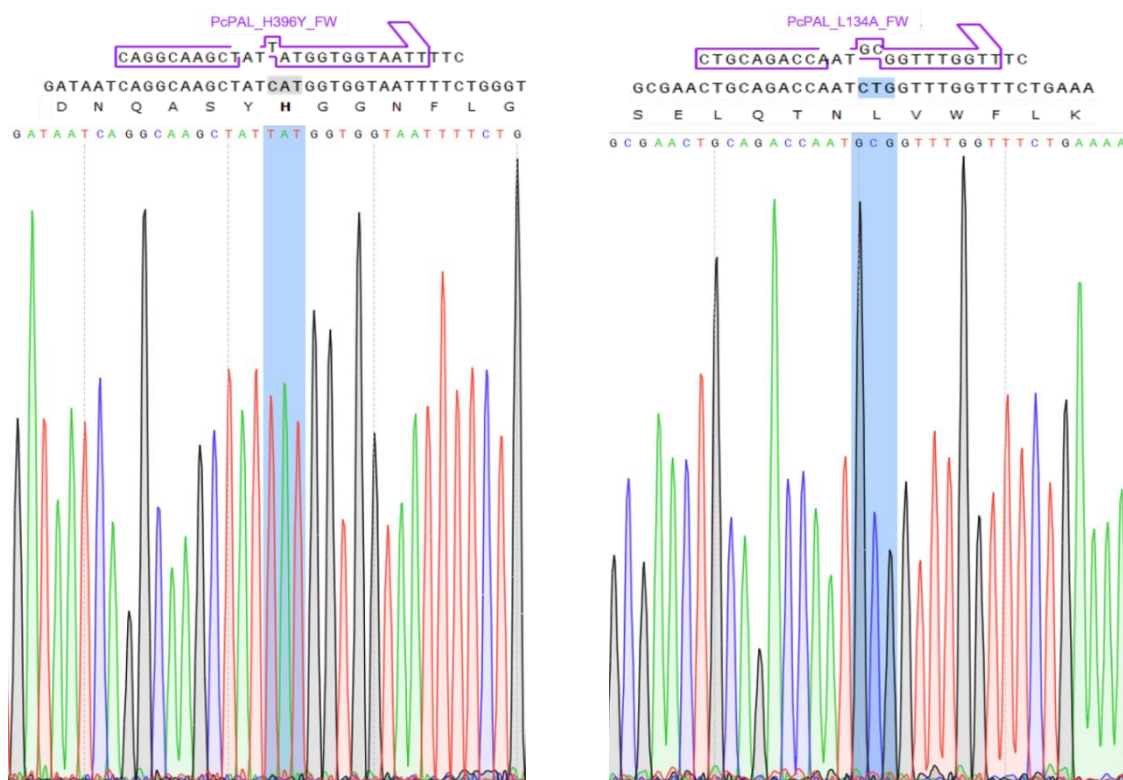


Figura 2. Rezultatul de secvențiere al mutantului *PcPAL* H396Y/L134A, care arată în zonele marcate prezența codonilor mutaționali TAT în loc de CAT (pentru mutația H396Y) și GCG în loc de CTG (pentru mutația L134A).

Livrabile: a fost obținută colecția de mutații propusă, în urmă unui mutageneze tip Alascan, efectuate la nivelul situsului catalitic a enzimei *PcPAL* (Tabelul 1), colecție care poate fi utilizată mai departe în testarea D-selectivității.

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

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

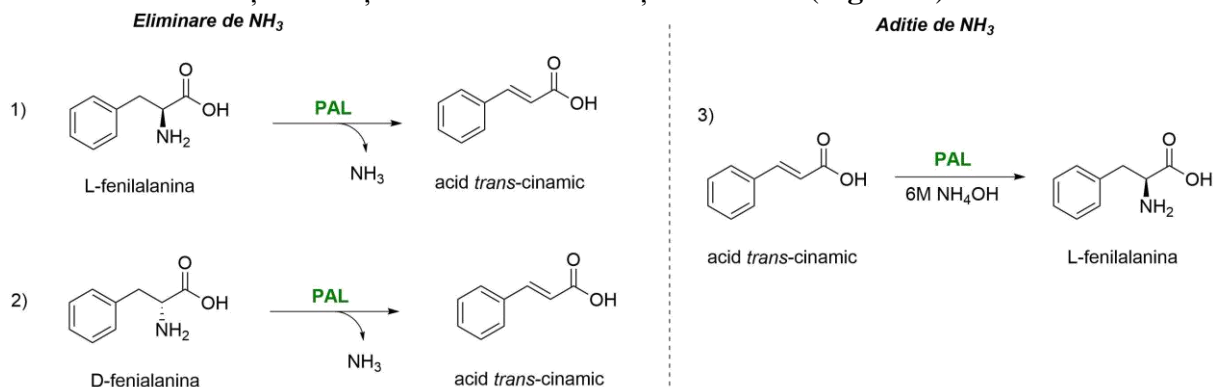


Figura 3. Reacțiile de eliminare și de adiție a amoniacului catalizate de enzimele PAL.

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 adiție la acidul *trans*-cinamic a fost folosit ca 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 reacție corespunzător. Conversiile biotransformărilor au fost determinate prin metode HPLC dezvoltate în prealabil în grupul nostru^{5,6}(**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 au rezultat conversii practice de 38%, respectiv 27%, 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 produs conversii detectabile, rezultat ce indică esențialitatea restului N384 pentru activitatea enzimatică.

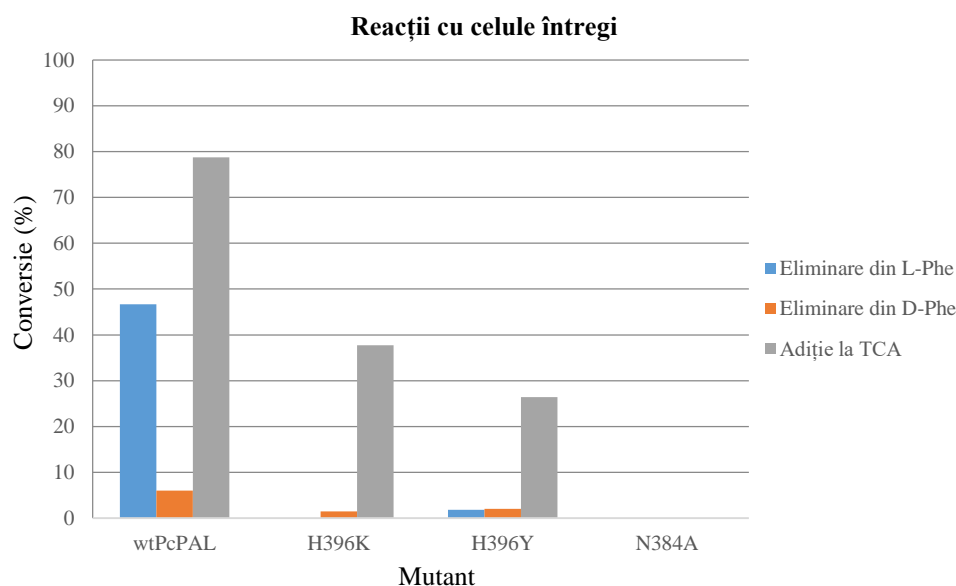


Figura 4. Conversiile reacțiilor de eliminare a amoniacului din L-Phe și D-Phe, și ale reacțiilor de adiție a amoniacului la acidul *trans*-cinamic (TCA), folosind variantele *PcPAL* H396K, H396Y și N384A, respectiv *wild-type* (variantea originală) sub formă de biocatalizatori de tip celule întregi.

Variantele mutante H396K, H396Y și N384A au fost de asemenea purificate, obținute sub formă de enzimă izolată în cadrul *Activității 3.1*, 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 5**).

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 5**).

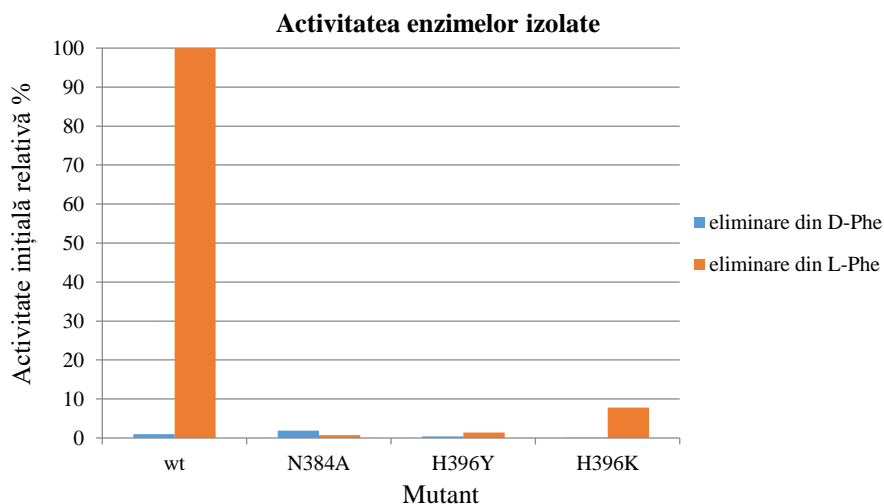


Figura 5. Activitatea inițială relativă a variantelor mutante, măsurată în reacția de eliminare a amoniacului din L-Phe și D-Phe, folosind ca și biocatalizator variantele *PcPAL* H396K, H396Y și N384A, respectiv *wild-type* (variantea originală) sub formă de enzime izolate.

În lipsa unei îmbunătățiri ale D-selectivității în cazul *PcPAL*, a fost testată efectul celor trei mutații aduse direct enzimei *AvPAL*. Menționăm că Turner și colab⁷ 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 și colab.⁴ 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 (**Figura 6**), 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.

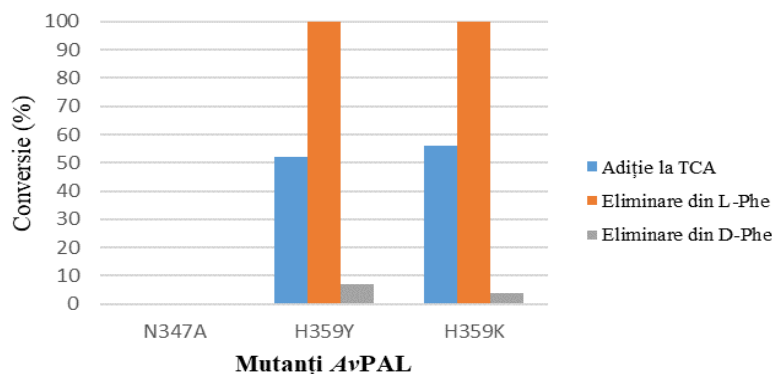


Figura 6. Activitatea mutanților AvPAL în reacțiile de eliminare și adiție a amoniacului. Conversii determinate prin HPLC după 20 h, coloană Gemini NX-C18 (150 × 4.5 mm; 5 μm), faza mobilă A: NH₄OH (0.1 M, pH 9.0) / B: MeOH, debit: 1 mL / min. Reacțiile au fost realizate la 30 °C, 800 rpm, utilizând 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^{4,7} 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 7**), nici în acest caz nu s-a observat creștere a D-selectivității, ambii mutanți ducând la producerea exclusivă a enantiomerului L. (**Figura 8**, **Figura 9**) Totodată în testele pentru D-selectivitatea dublu mutanților 1-18 din **Tabelul 2**, 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.

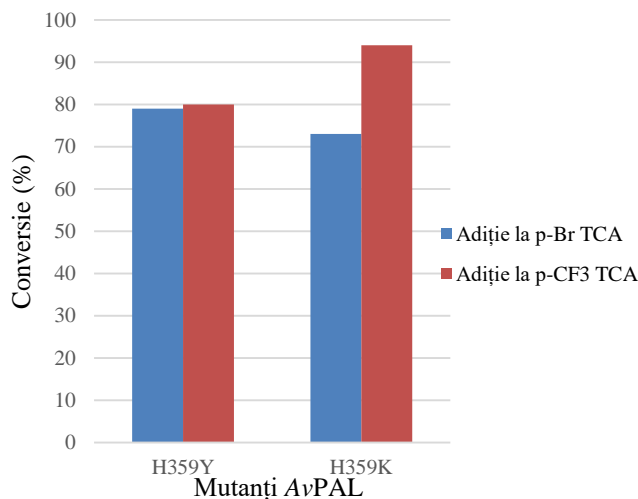


Figura 7. Mutanții AvPAL în reacția de adiție, utilizând substraturi nenaturale. Conversii determinate prin HPLC după 20 h timp de reacție, coloană Gemini NX-C18 (150 × 4.5 mm; 5 μm), faza mobilă A: NH₄OH (0.1 M, pH 9.0) / B: MeOH, debit: 1 mL / min. Reacțiile au fost realizate la 30 °C, 800 rpm, utilizând 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.

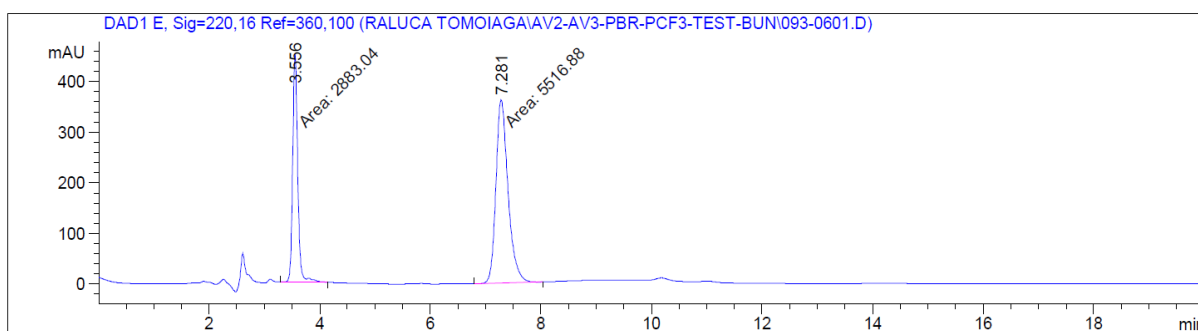


Figura 8. Cromatogramă reprezentativă, care arată semnalele ambelor enantiomeri L și D a amestecului racemic *rac-p*-CF₃-Phe, obținută pe coloana chirală Crownpak CR-I (+) (faza mobilă: A: HClO₄ pH 1.5 / B: ACN, măsurători realizate la 25 C), cu enantiomerul D la timp de retenție de 3,5 min, respectiv enantiomerul L la timp de retenție de 7,2 min.

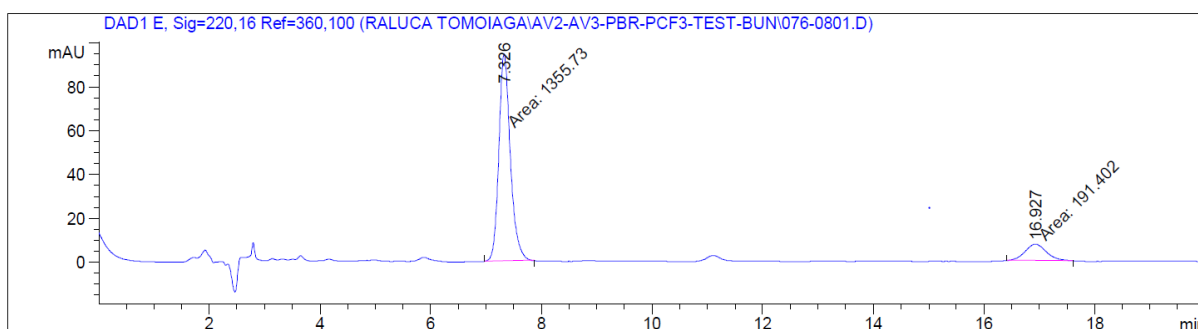


Figura 9. Cromatograma HPLC reprezentativă obținută pe coloana chirală Crownpak CR-I (+) pentru reacția de adiție a amoniacului la *p*-CF₃ TCA, utilizând celule întregi H396Y-AvPAL, după 20 ore, cu semnale specifice pentru enantiomerul L-*p*-CF₃-TCA ($t_R=7,3$ min) și pentru *p*-CF₃ TCA netransformat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

Livrabile: În testele pentru D-selectivitatea a colecțiilor de mutații obținute în cadrul *activităților A1.1 și A1.2 (Tabelul 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.

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 testele de activitate ale transformanților obținuți prin mutageneză 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 (**Figura 10**).

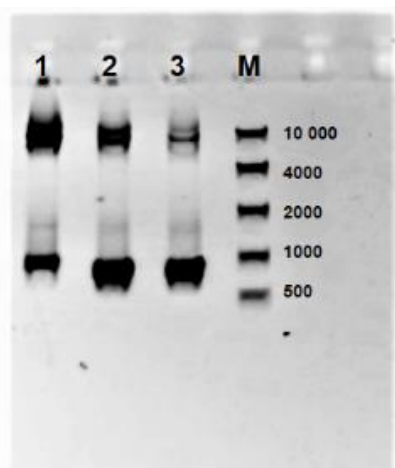


Figura 10. Verificarea produșilor de PCR prin electroforeză în gel de agaroză. (M - marker, numerele 1-3 - produși de PCR: 1 - *PcPAL* N384NNK, 2 - *PcPAL* H396NNK, 3 - *PcPAL* N260NNK).

Coloniile crescute după transformarea colecțiilor de ADN au fost verificate folosind metoda de screening cu randament ridicat dezvoltat în prealabil³. Mediul de cultură lichid 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 NH_3 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 absorbanta maximă specifică. S-au identificat 4 colonii cu activitate enzimatică mai mare decât a controlului negativ, 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 11.**). 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.

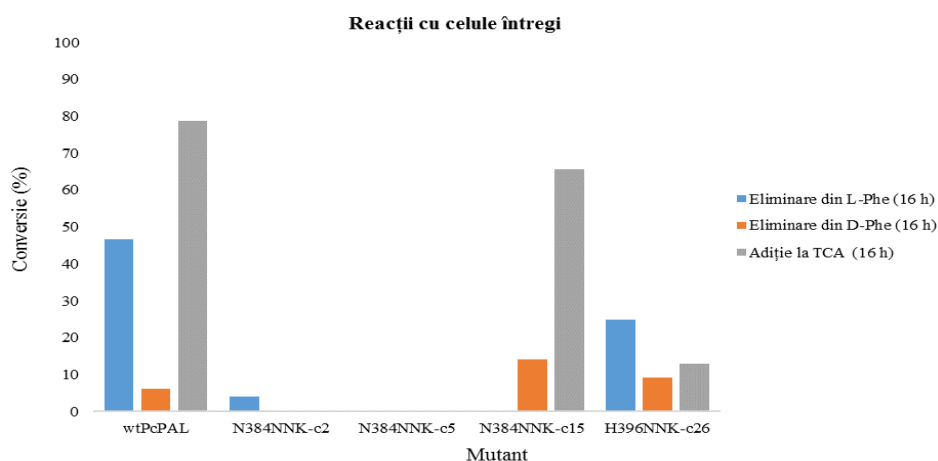


Figura 11. Conversiile reacțiilor de eliminare a amoniacului din L- Phe sau D-Phe, și ale reacțiilor de adiție a amoniacului la acidul *trans*-cinamic (TCA), folosind coloniile c2, c5, c15, c26, identificate prin testarea inițiale a colecțiilor de mutații obținuți prin mutageneza de saturație N384NNK, 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 protocolului⁸ 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 12**). În cazul reacțiilor de eliminare a amoniacului, ale amestecurilor racemice, pe lângă conversiile prezentate în **Figura 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

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.

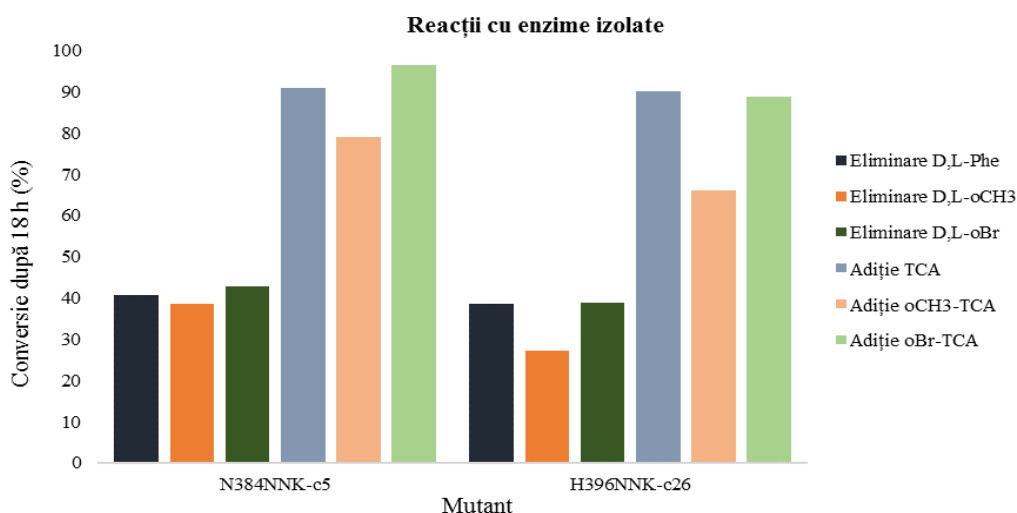


Figura 12. Conversiile reacțiilor de eliminare a amoniacului din amestecurile racemice L,D -Phe, L,D-*o*-CH₃-Phe, și L,D -*o*-Br-Phe și ale reacțiilor de adiție a amoniacului la acidul *trans*-cinamic (TCA), respectivi analogii *o*-CH₃ și *o*-Br substituiți, folosind ca și biocatalizator variantele c2, c26 sub formă de enzimă izolată.

Livrabile: Aceste rezultate arată că mutanții identificați N384Q și H396C nu posedă D-selectivitate în cazul reacției de adiție a amoniacului (direcția de reacția care este de interes industrial^{9,10} pentru sinteza analogilor de fenilalanină optic puri).

Totodată, rezultatele obținute cu variantele AvPAL mutante H359Y, H359Y, N347A în cadrul Activității 1 nu se corelează cu datele din literatură, rezultatele raportate^{4,7} 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, trebuie reconsiderată, re proiectată, Activitățile 1.1, 1.2, și 2.1. fiind modificate. Deoarece prin activitățile propuse nu au fost identificate resturi modulatorie ale D-selectivității enzimei PAL, totodată datele referitoare la existența unor asemenea resturi fiind ireproductibile, a fost activată următorul plan de redresare, în care scopul este folosirea strategiilor de mutageneză dezvoltate pentru obținerea unor variante PAL, respectiv biotehnologii PAL eficiente în sinteza unor analogi de fenilalanină de interes industrial.

- **Plan de redresare, completarea/modificarea subactivităților propuse:**

Activitate 1. Mutageneză situs-direcționată bazată pe concepte de proiectare rațională pentru substraturi care nu sunt acceptate de enzimele PAL

Activitate 2. Mutageneză de saturație iterativă – CASTing la resturi modulatorie de selectivitate cu scopul obținerii unor PAL-uri cu activitate față de aminoacizi de interes industrial

Subactivitate 3. Caracterizarea funcțională a noilor variante PAL și obținerea unei structuri cristaline potrivite pentru predicția D-selectivității

Sub-activitate 1.1 și sub-activitate 1.3 Mutageneză situs-direcționată bazată pe concepte de proiectare rațională pentru alte substraturi care nu sunt acceptate de enzimele PAL (1.1) combinată cu testele de activitate PAL (1.3)

Ca produse dorite/țintite am selectat doi analogi disubstituiți ai fenilalaninei, 3,4-dimetoxi-L-fenilalanina, un element cheie în sinteza medicamentului anti-Parkinson L-DOPA și L- sau D-3-bromo-4-metoxi-fenilalanina, intermediar important în sinteza Symplocamidei A (**Figura 13**). De remarcă, PAL-urile cunoscute sunt inactice în transformarea substraturilor corespunzătoare.

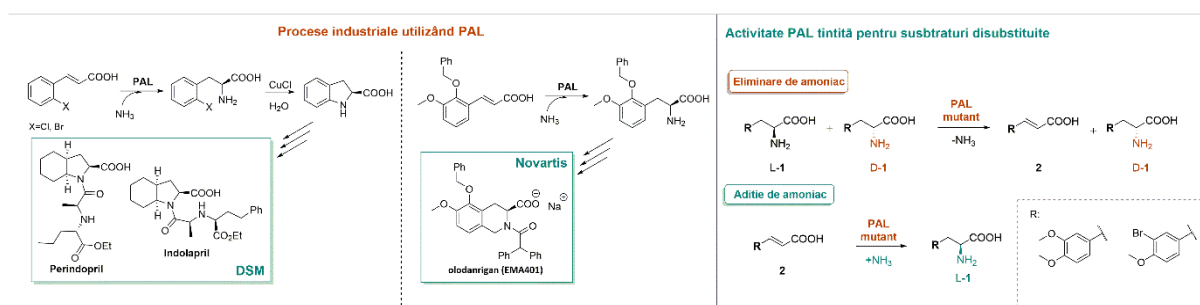


Figura 13. Exemple de procese industriale bazate pe PAL și produsele vizate în cadrul procesului de inginerie proteică.

Prin urmare, am încercat să aplicăm metoda rațională de inginerie proteică dezvoltată de grupul nostru, eficientă în cazul substraturilor monosubstituite^{6,11}, pentru a genera activitate PAL față de cele două substraturi disubstituite menționate mai sus (**Figura 13**). În primul rând, variantele L134A și I460V, cu activitate catalitică ridicată față de analogii *meta*- și *para*-monosubstituiți ai substratului natural, au fost combinate în varianta L134A/I460V, a cărei activitate a fost evaluată în eliminarea amoniacului din **1a**, **1b** și în adiția amoniacului la **2a**, **2b**. A fost observat un efect ușor sinergic al mutațiilor L134A cu I460V în ceea ce privește creșterea activității către substraturile **1a** și **2a**, cu conversii de 14%, respectiv 6% înregistrate în comparație cu lipsa de activitate a variantelor cu o singură mutație L134A, I460V, respectiv a variantei originale, *wild-type* PcPAL. În schimb, folosind dublu mutații sub formă de enzimă izolată, în condițiile de reacție PAL optimizate anterior de către noi¹², adiția amoniacului la **2a** a atins o conversie de 17%, în timp ce în reacția de eliminare valoarea conversiei a ajuns la aproximativ 50%, valoarea maximă teoretică pornind de la amestecul racemic *rac-1a*. Mai departe, a fost testată varianta PcPAL F137V/I460V, cu mutații combinate la celelalte resturi de aminoacizi care împiedică steric substituția în pozițiile *meta* și *para*, dezvoltând astfel activitate față de **1b** și **2b**, reflectată în conversii de 25%, respectiv 6%, care poate fi crescută până la o valoare ridicată a conversiei de 76%, respectiv una moderată de 15% folosind biocatalizatorii sub formă de enzimă purificată, în condiții optime de reacții.

Este de remarcă faptul, că modelul restrâns al mutațiilor benefice în pozițiile L134 și I460, dezvoltat prin strategiile de mutageneză, este în conformitate cu natura foarte conservată a acestor resturi în rândul PAL-urilor, în timp ce în pozițiile F137 și L138 (PcPAL) se poate observa un grad ridicat de evoluție (**Table 3**), aceste resturi fiind cunoscute a fi implicate și în

schimbarea selectivității între amoniac-liaze aromatice, familie care include pe lângă enzimele PAL și, tirozină- și histidină-amoniac liazele (TAL-uri și HAL-uri). Recent grupul nostru a extins cu succes strategia mutațională aplicată la *PcPAL* pentru mai multe enzime PAL de origine diferită, față de substraturi monosubstituite,¹¹ observând întrucât eficiența catalitică față de un anumit substrat variază chiar și între PAL-urile cu situs-catalitic identic/similar, fapt care ilustrează că activitatea PAL este influențată și de alți factori în afară de diferențele la nivelul structurii situsului catalitic. Acest studiu a evidențiat că testarea activității a PAL-urilor de origine/proveniență diferită este recomandat a fi inclusă în procesul de dezvoltare de noi biocatalizatori PAL eficienți. Astfel, am pregătit omoloagele celor mai performante variante L134A/I460V (pentru substraturi **1a**, **2a**) și F137V/I460V (pentru **1b**, **2b**) *PcPAL* în cazul mai multor enzime PAL cunoscute și disponibile în cadrul grupului de cercetare, atât de origine eucariotă, precum plante (*Arabidopsis thaliana*) și ciuperci (*Rhodosporidium toruloides*, *Pseudozyma antarctica*), cât și de origine procariotă (*Anabaena variabilis*, *Kangiella koreensis*). Dintre proteinele selectate, *AtPAL* are același situs-catalitic și cea mai mare identitate cu *PcPAL*, în timp ce PAL-urile bacteriene și cele provenite din fungi prezintă o identitate mai mică de 40% cu *PcPAL* și o varietate mai mare la resturile modulate a selectivității (**Tabelul 3.**).

Tabel 3. Alinierea resturilor din regiune hidrofobă de legare a substratului din situsul catalitic a enzimelor PAL.

Cod Uniprot	Tip	Origine	Familie	Resturi din situsul catalitic					Identitate cu <i>PcPAL</i>	Identitate cu AL-11
P24481	E	<i>Petroselinum crispum</i>	PAL	L134	F137	L138	V259	I461	100	30
P45724	E	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PAL	L133	F136	L137	V260	I460	81	30.5
P11544	E	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	TAL / PAL	L134	H137	Q138	V268	I472	38	33
M9M0D4	E	<i>Pseudozyma antarctica</i>	PAL	L115	M118	Q119	L265	I472	37	30
Q3M523	P	<i>Anaba variabilis</i>	PAL	L104	F107	L108	M222	I423	36	49.5
C7R9W9	P	<i>Kangiella koreensis</i>	PAL	L86	F89	H90	M201	I390	32	32
F0S1S6	P	<i>Planctomyces brasiliensis</i>	PAL	L111	F113	L114	V208	I401	33	40
A0A1M4XLJ3	P	<i>Loktanella atrilutea</i>	AAL	A81	Q84	H85	N199	I400	30	97.5
QOV09174	P	Uncultured bacteria AL-11	PAL	A81	Q84	H85	N199	I400	29.5	100

Dublu mutații de *AtPAL*, *RtPAL*, *PzaPAL*, *AvPAL* și *KkPAL* obținuți, omologi al mutațiilor *PcPAL* L134A/I460V și F137V/I460V, au fost testați în eliminarea amoniacului pornind de la **1a**, **1b** și în reacția de adiție a amoniacului la **2a**, **2b** (**Figura 14**). Dintre aceste PAL-uri, mutații de *AtPAL* au prezentat cele mai semnificative îmbunătățiri ale conversiilor în toate reacțiile testate (**Figura 14.**), depășind inclusiv variantele *PcPAL* corespunzătoare. Prin urmare, biocatalizatorii L133A/I461V-*AtPAL* sub formă de celule întregi au prezentat conversii ridicate de 78%, respectiv 74% în reacția de eliminare a amoniacului pornind de la **1a** și **1b**, în comparație cu conversia de 15%, respectiv 50% obținută cu variantele *PcPAL* corespunzătoare. Conversiile obținute în cazul reacțiilor de adiție a amoniacului au arătat îmbunătățiri doar pentru **2a**, conversia ajungând la valoarea moderată de 18% după 20 de ore timp de reacție, în timp ce în cazul **2b** conversia a rămas la o valoare similară cu cea înregistrată utilizând L134A/I460V-*PcPAL* (**Figura 14.**).

În ceea ce privește PAL-urile de origine fungică, variantele L115A/I472V-*PzaPAL* și M118V/I472V-*PzaPAL* nu au prezentat activitate catalitică nici în reacția de eliminare a

amoniacului pornind de la **1a**, **1b** și nici în reacțiile de adiție la **2a**, **2b**. Mutațiile responsabile pentru posibila transformare a derivaților dimetoxi **1a**, **2a** au fost introduse în varianta originală de *RtPAL* (*wild-type*), precum și în varianta *RtTAL* care "arată" ca *PcPAL* (*PcPAL*-like, cu aminoacizii din situsul catalitic identic cu cele din *PcPAL*), generând variantele L134A/I472V-*RtPAL* și L134A/H137F/Q138L/I472V-*RtPAL*. Niciunul dintre mutanți nu a prezentat o eficiență catalitică îmbunătățită față de *rac-1a* sau **2a**, susținând cele observate în studiul nostru anterior¹¹, mai exact activitatea scăzută *RtPAL*-ului în urma mutației I472V de *RtPAL*. Când biocatalizatorii au fost folosiți sub formă de celule întregi în reacția cu *rac-1b*, F107V/I423V-*AvPAL* a prezentat o conversie <5%, în timp ce nu s-a obținut L-**1b** în reacția de adiție de amoniac la **2b**. Mutantul L104A/I423V-*AvPAL* a furnizat conversii de 54% și 6% în cazul *rac-1a*, respectiv **2a**, cu toate acestea valorile conversiilor în toate cazurile au fost mai mici în comparație cu cele furnizate de variante omoloage de *AtPAL*. Variantele L86A/I390V-*KkPAL* și F89V/I390V-*KkPAL* ale enzimei *KkPAL* (descrisă recent¹³, provenită din bacteria extremofilă marină *Kangiella koreensis*, cu substratul natural încă neexplorat), nu au prezentat activitate catalitică față de substraturile disubstituite testate (**Figura 14**).

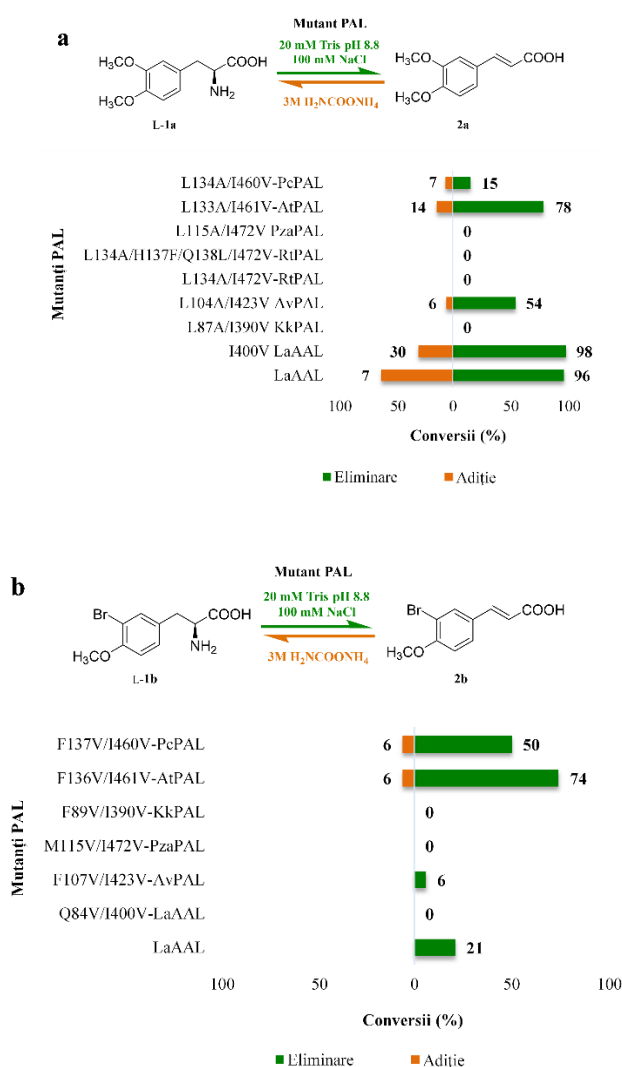


Figura 14. Conversiile obținute în reacțiile de eliminare a amoniacului (albastru) și de adiție a amoniacului (roșu) în cazul substraturilor a) **1a**, **2a** și b) **1b**, **2b**, folosind PAL-uri mutante de origine diferită.

În timp ce se desfășurau experimentele noastre, în literatură a apărut o nouă amoniac-liază aromatică (AL-11)¹⁴, provenită dintr-o bacterie necultivată, care prezintă activitate remarcabilă față de acizii cinamici di- sau trimetoxi-substituiți, ajungând la o conversie excelentă de 92% în cazul transformării acidului 3,4-dimetoxicinamic **2a**. În ceea ce privește situsul catalitic, particularitatea enzimei AL-11 constă în diferențele observate la nivelul resturilor de aminoacizi din regiunea hidrofobă: leucina din poziția 134 - rest foarte conservat în *PcPAL* - corespunde cu A81 din AL-11, alanina permițând probabil acomodarea substituentului voluminos de *m*-MeO în situsul catalitic al acestuia. Fapt similar cu ceea ce am observat în prealabil/deja la introducerea unei mutații punctuale prin care leucina din poziția menționată este schimbată la alanină în structura *PcPAL*-ului/*AtPAL*-ului^{6,11}. Cu toate acestea, AL-11, având resturile de aminoacizi Q84, H85 și N199 polare (omoloage cu resturile F137, L138 și V259 din structura *PcPAL*-ului), prezintă un model unic și polar în ceea ce privește regiunea de legare a inelului aromatic al substratului, care este în mare măsură hidrofobă în structura altor PAL-uri (**Tabel 3**). Bazându-se pe aceste date, am încercat să ”imprimăm” situsul hidrofob al enzimei AL-11 în structura PAL-urilor disponibile în grupul de cercetare, selectând ca matriță genele enzimelor *PcPAL*, *AtPAL* și *AvPAL*, pe baza rezultatelor anterioare privind activitatea ridicată față de **2a** a variantelor acestora, obținute prin proiectare rațională. *RtPAL* a fost, de asemenea, luat în considerare datorită polarității similare cu AL-11, dar poziționării deplasate a resturilor modulatorie de selectivitate, H137 și Q138, în comparație cu omologul Q84 și H85 din AL-11 (**Tabel 3**). Prin urmare, au fost obținute patru variante noi: L134A/F137Q/L138H/V259N-*PcPAL*, L133A/F136Q/L137H/V260N-*AtPAL*, L104A/F107Q/L108H/M222N-*AvPAL* și L134A/H137Q/Q138H/V269N-*RtPAL*, însă toate cele patru ”AL-11-like” PAL-uri erau complet inactive față de ambele substraturi disubstituite.

Având în vedere eficiența catalitică impresionantă a AL-11 și eforturile inefficiente de a transfera activitatea catalitică a acestuia la alte PAL-uri, ne-am direcționat spre identificarea noilor enzime PAL, omoloage cu AL-11. Căutând în baza de date secvențe de protein omoloage cu AL-11, am selectat amoniac-liaza aromatică provenită din *Loktanella atrilutea*, având cea mai mare identitate de secvență, de 97,5%, cu AL-11 și resturi identice din situsul catalytic. În timp ce Uniprot clasifică enzima ca fiind o histidină-amoniac liază, particularitatea sa catalitică arată/expune diferențe importante față de toți reprezentanții PAL/TAL/HAL, având o amprentă unică a situsului catalitic format din resturile A81, O84, H85 și N199 (**Tabel 3**). Astfel, în absența oricăror informații suplimentare cu privire la rolul natural a enzimei, o vom considera o amoniac-liază aromatică, denumit în continuare ca *LaAAL*. Enzima recombinată *LaAAL* a satisfăcut așteptările în reacția de adiție a amoniacului la **2a**, ajungând la conversii de 68% folosind celule întregi și 82% utilizând enzimă izolată (**Figura 15**).

Activitatea slabă, respectiv inactivitatea *LaAAL*-ului față de **1b** și **2b** poate să fie asociat cu existența posibilelor impedimente sterice între substituentul bromo mai voluminos și resturile din regiunea hidrofobă sau cu probleme derivate/provenite din proprietățile electronice diferite ale substituentului bromo față de cele ale grupării metoxi din **2a**. Pentru a clarifica/lămuri problema, s-a ales un substituent electronoatrăgător mai puțin voluminos, F în loc de Br. Faptul că *LaAAL* a asigurat o conversie de 83% în transformarea acidului 3-F,4-MeO-cinamic **2f**, similar cu conversiile obținute în cazul substratului **2a**, a susținut ipoteza impedimentului steric existent în timpul acomodării substratului **2b** în situsul catalitic. Este de remarcat faptul că, folosind varianta originală a *Pc/At/AvPAL*-ului s-au obținut conversii foarte slabe sau deloc detectabile în reacția de adiție a amoniacului la **2f**, în timp ce variantele mutante de *PcPAL* și *AtPAL* au prezentat conversii apropiate de 63%, cea furnizată de *LaAAL* (**Figura 15**), susținând totodată faptul că abordarea de proiectare rațională poate fi folosită cu succes la aceste PAL-uri, cu excepția substraturilor cu substituenți electrondonor.

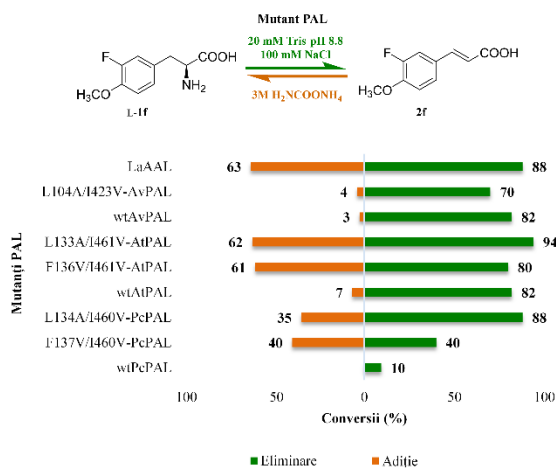


Figura 15. Conversii obținute în reacțiile de eliminare a amoniacului (albastru) și aditia amoniacului (roșu) în cazul substraturilor 3-fluor-4-metoxi-substituite **1f**, respectiv **2f**.

Completare Activitate 2 (include subactivitățile 2.1 și 2.2): Mutageneza de saturatie iterativă – CASTing la resturi modulatorie de selectivitate cu scopul obținerii unor PAL-uri cu activitate pentru aminoacizi de interes industrială și teste de activitate

În continuare, am aplicat metoda saturației combinatoriale a situsului activ (combinatorial active-site saturation test - CAST)¹⁵ efectuând mutageneză de saturație iterativă (ISM)¹⁶ la resturile modulatorie ale specificității de substrat, identificate prin abordarea de proiectare rațională menționată mai sus, mai exact L134, F137 și I460 din regiunea hidrofobă a situsului activ din PcPAL, împreună cu restul L138 învecinat. Acesta din urmă a fost inclus în procesul de randomizare în ciuda faptului că în urma cartografierii/mapării situsului activ al enzimei PcPAL poziția L138 nu a fost printre resturile identificate a fi modulatorie a specificității de substrat⁶, însă mutantul F113Y/L114I al enzimei PAL din *Planctomyces brasiliensis* (analog cu varianta F137Y/L138I - PcPAL) a asigurat cea mai mare îmbunătățire de activitate față de **2a**, asigurând o conversie de 18% în reacția de aditie a amoniacului¹⁷.

Similar cu abordarea de proiectare rațională, a fost aplicat o strategie de mutageneză de saturație secvențială/în trepte, identificând mai întâi hit-uri pentru fiecare substrat monosubstituit (*m*-bromo-, *m*-metoxi- și *p*-metoxi fenilalanină **1c**, **1d**, **1e**) din colecțiile obținute, care în a doua etapă au fost utilizate ca matriță pentru runde iterative de mutageneză de saturație la pozițiile rămase, evaluând activitate față de substraturile disubstituite vizate (**Figura 16**).

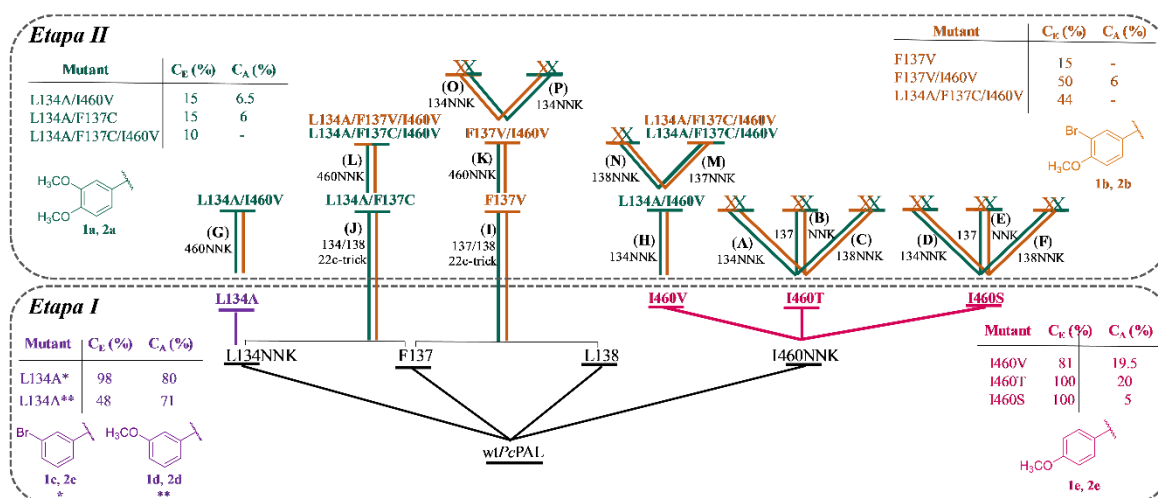


Figura 16. Strategia de mutageneză de saturație aplicată pentru a genera activitate PAL față de 3,4-dimetoxi-fenilalanină și 3-metoxi-4-bromo-fenilalanină.

Dat fiind faptul că, randomizarea anterioară aplicată în poziția I460 a dezvăluit deja mutații I460T, I460S, I460V ca variante cu activitate crescută față de *p*-metoxifenilalanină³, am continuat cu efectuarea mutagenezei de saturație la restul L134, aplicând degenerarea de tip NNK. Evaluând activitatea colecțiilor de mutagenză față de *m*-bromo-fenilalanină și *m*-metoxi-fenilalanină nu a fost evidențiat nicio variantă cu activitate mai ridicată decât mutantul L134A, obținut în urma proiectării raționale, susținând încă odată eficiența abordării raționale, analog cu rezultatele obținute în cazul randomizării în poziția I460³.

Mai departe, în al doilea ciclu de mutagenză, folosind ca matriță variantele cu cea mai mare activitate față de *p*-metoxi-Phe, I460V, I460T și I460S (deși în cazul celui din urmă s-au evințiat problemele de stabilitate în prealabil⁵), degenerarea NNK a fost aplicată în celelalte trei poziții de secvență, 134, 137 și 138 din structura *PcPAL*. Cele șase colecții **A**, **B**, **C**, **D**, **E**, **F** (**Figura 16**) derivate din variantele I460T și I460S nu au furnizat "hit"-uri în cadrul testelor de activitate folosind ca substrat fenilalaninele disubstituite **1a** sau **1b**. Colecția **H**, cărei punct de pornire a fost varianta I460V, a livrat hit-uri numai cu activitate față de **1a**, dintre care toate s-a dovedit ca fiind mutantul L134A/I460V, aceeași variantă obținută și prin abordarea rațională. În mod similar, colecția **G**, obținută din degenerarea NNK în poziția I460 folosind varianta L134A ca matriță, a furnizat hit-uri pentru substratul **1a**, identificate în urmă ca L134A/I460V. În mod surprinzător, în cazul ambelor colecții **G** și **H** nu s-a identificat alte variante având activitate față de **1a**, iar în cea ce privește scanarea activității pornind de la substratul **1b** nu s-au găsit niciun hit în cadrul acestor biblioteci. În mod neașteptat, în timp ce singura variantă cu activitate față de **1a**, L134A/I460V, identificată în colecțiile **H** și **G**, coincide cu varianta care s-ar obține aplicând abordarea permutațională, variantele L134A/I460T sau L134A/I460S obținute într-o manieră similară nu au fost identificate ca fiind hit-uri din colecția **A** sau **D**, în ciuda faptului că variantele I460T, respectiv I460S prezintă o eficiență catalitică îmbunătățită, similară cu cea a mutantului I460V în reacția *p*-metoxi-fenilalaninei.

În continuare, am încercat randomizarea simultană a pozițiilor omoloage F137 și L138 din *PcPAL* prin mutagenză de saturație (colecția **I**, **Figura 16**). Datorită faptului că, mutageneza de saturație bazată pe degenerarea NNK în două poziții necesită un efort semnificativ de scanare (fiind necesar scanarea a 3065 de colonii pentru o acoperire de 95%, în comparație cu cele 96 de colonii scanate în cazul SM-ului într-o singură poziție), am folosit degenerarea de tip 22c-trick¹⁸, care pe lângă diminuarea efortului de scanare (1450 de colonii pentru o acoperire de 95%) oferă o distribuție mai echilibrată a codonilor pentru toți aminoacizii naturali, reducând caracterul redundant în comparație cu degenerarea NNK. Prin scanarea colecției **I**, pentru activitatea față de substraturile **1a** și **1b**, a fost evidențiat un singur mutant F137V cu o conversie ușor crescută de 7,5% în cazul substratului **1b**, conversie care este mai mică decât cele obținute cu varianta F137V/I460V proiectată rațional.

O nouă abordare a constat în aplicarea mutagenezei de saturație în pozițiile combinate L134-F137 și L134-I460. În ciuda numeroaselor încercări de a optimiza reacția PCR, nu s-a obținut nicio colecție în cazul combinației L134-I460 folosind metoda 22c-trick. Randomizarea simultană în pozițiile L134-F137 (colecția **J**) a fost cu succes, dezvăluind din nou același mutant, F137V în cadrul scanării de activitate față de **1b**, în timp ce pentru substratul **1a** singurul hit descoperit a fost L134A/F137C, care a avut o activitate similară cu cea a mutantului proiectat rațional, L134A/I460V (**Figura 16**). Hit-urile, F137V și L134A/F137C, descoperite în colecțiile **I** și **J**, au fost folosite ca matriță în al doilea ciclu de mutagenză de saturație, aplicată în poziția I460, rezultând astfel colecțiile **K** și **L**, cărei activitate a fost evaluată pornind de la substraturile **1a** și **1b**. În mod surprinzător, toate hit-urile din colecția **K** s-au dovedit ca fiind varianta F137V/I460V, care coincide cu varianta obținută prin abordarea rațională, similar cu cele cazuri menționate mai sus. Prin scanarea colecției **L**, folosind **1a** sau **1b** ca substrat, a fost identificat triplu mutantul L134A/F137C/I460V ca o variantă activă, cu toate acestea valorile de conversie atinse cu această variantă (5 % pentru **1a** și 20% pentru **1b**) au fost similare cu

valorile de conversii obținute folosind variantele L134A/I460V și F137V/I460V, obținute prin modelul proiectării raționale. Toate aceste rezultate sugerează faptul că mutația suplimentară F137C nu oferă un efect benefic suplimentar asupra activității enzimelor PAL. Ca o ultimă încercare, mutageneza de saturație a fost combinată cu abordarea proiectării raționale, astfel variantele L134A/I460V și F137V/I460, cu cea mai mare activitate față de **1a** și **1b**, obținute atât prin proiectare rațională, cât și prin mutageneza de saturație, au fost utilizate ca punct de pornire în ciclurile SM ulterioare la celelalte două resturi (L134 și L138, respectiv F137 și L138). Cu toate acestea, colecțiile **M**, **N**, **O**, **P** generate (**Figura 16.**) nu au furnizat variante cu activitate îmbunătățită.

Rezultatele obținute aplicând mutageneza de saturație sugerează că mutațiile proiectate rațional, pentru înlocuirea resturilor modulatorie de specificitate L134, F137 și I460 cu resturi mai mici de alanină și valină, sunt alegerea potrivită, susținut și de faptul că nicio altă mutație nu oferă o eficiență catalitică similară în ceea ce privește biotransformările substraturilor **1a** și **1b**. În timp ce rezultatele validează eficiența abordării de proiectare rațională, pe de altă parte, ilustrează și o eficiență redusă a abordării mutagenezei de saturație în ceea ce privește modularea/schimbarea specificității de substrat a enzimei *PcPAL*. Modelul de substituție al resturilor cheie din situsul activ este puternic limitat și determinat în principal de probleme sterice.

Activitatea 3. Caracterizarea funcțională și structurală a noilor variante de PAL

Sub-activitatea 3.1. Exprimarea, izolarea și purificarea enzimelor recombinat

Proteinele recombinat L134A/I460V, F137V/I460V-*PcPAL*, respectiv L133A/I460V F136V/I461V-*AtPAL*, L107A/I400V *AvPAL*, variantele tip wild-type și *LaAAL*, toate cu etichetă His_{6x} N-terminală au fost supraexprimate în celulele gazdă *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS. Izolarea enzimelor a fost efectuată prin cromatografie de afinitate Ni-NTA, urmărind pașii descriși în lucrarea noastră anterioară⁸. Puritatea fracțiilor de enzimă izolată a fost evaluată prin metoda SDS-PAGE (**Figura 17.**).

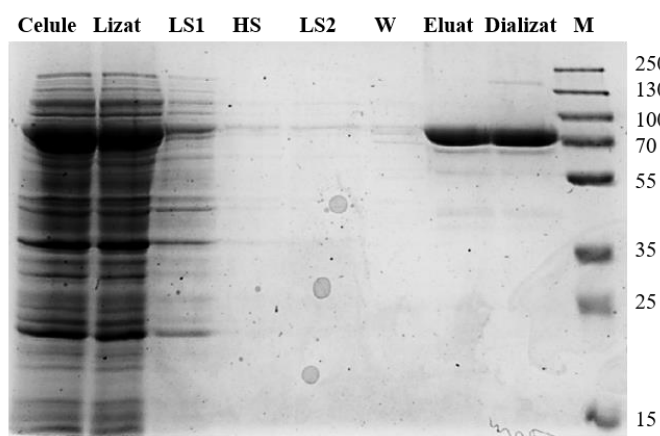


Figura 17: Rezultat de electroforeză reprezentativ, gelul de poliacrilamidă (SDS-PAGE) obținut conținând probe din etapele de purificare a proteinei mutante *PcPAL* F137V/I460V; Celule – proba de celule întregi (16 ore după inducție); Lizat – supernatantul obținut după liza celulară; LS1, LS2 și HS – fracțiile obținute după spălarea coloanei Ni-NTA cu soluții tampon conținând 30 mM sare (LS), respectiv 300 mM sare (HS); W (washing) – fracția eluată cu soluția de 25 mM imidazol, E – fracția de eluție cu 250 mM imidazol a proteinelor legate în mod specific; Dializat – fracția obținută după dializă, M – marker proteic.

Sub-activitatea 3.2. Caracterizarea funcțională a noilor variante de PAL

Variantele mutante ale enzimei au fost purificate și testate în reacții la scară analitică, în ambele direcții al reacției catalizată de PAL. Activitatea operațională a diferitelor variante a fost evaluată atât prin monitorizarea valorilor de conversie, cât și prin determinarea parametrilor cinetici ale acestora în reacția de eliminare a amoniacului (**Tabelul 4**).

Pe lângă acestea, stabilitatea termică/profilul de denaturare a PAL-urilor purificate a fost, de asemenea, evaluată (**Figura 18a**) dezvăluind o temperatură de topire ridicată de 82 °C în cazul *LaAAL*-ului, în comparație cu *AvPAL* de origine procariotă similar. T_M-ul măsurat pentru *LaAAL* a depășit și pe T_M-urile enzimelor *Pc/AtPAL*, de origine eucariotă, care posedă un

domeniu de extensie C-terminal, reducându-le stabilitatea termică. În mod surprinzător, în cazul variantelor L133A/I460V *PcPAL* proiectată și omologul ei L133A/I461V *AtPAL*, se poate observa, pe lângă temperatura de topire de 81 °C și 80 °C, modificări conformaționale la 45 °C, respectiv 52 °C. Cu toate acestea, evaluarea activității lor la diferite temperaturi între 30-65 °C a susținut faptul că nu are loc inactivarea enzimei la aceste temperaturi.

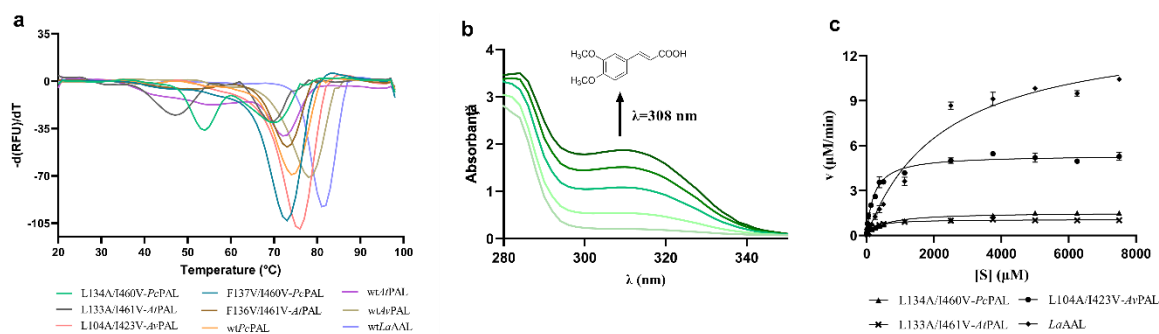


Figura 18. (A) profilul de denaturare termică a variantelor PAL cele mai eficiente, în comparație cu varianta lor original (wild-type) și *LaAAL*. (B) Monitorizarea absorbantăi specifice (λ_{spec}) la 310 nm a **2a** în cadrul reacției de eliminare a amoniacului pornind de la **1a**; (C) Curbele Michaelis-Menten pentru reacția de eliminare a amoniacului pornind de la **1a**, utilizând variantele proiectate *Pc/At/AvPAL* și *LaAAL*.

În timp ce formele izolate ale variantelor proiectate de *PcPAL*, *AtPAL*, *AvPAL* au atins conversii la fel de mari ca *LaAAL* în reacția de eliminare a amoniacului (Tabelul 4), în cazul reacției de adiție a amoniacului la **2a**, conversia de 82% atins de *LaAAL* a fost mult peste nivelul conversiilor moderate/reduce de 18%, obținute cu cele mai performante variante proiectate L133A/I461V-*AtPAL*.

Referitor la cinetica enzimatică, valoarea K_M a *LaAAL*-ului, în reacția de eliminare pornind de la **1a**, a fost semnificativ, de ~13 ori, mai mare decât K_M -ul obținut folosind L133A/I461V-*AtPAL* (Tabelul 4). În cazul reacției de adiție de amoniac la **2a**, valoare de K_M pentru *LaAAL* a fost chiar și mai mare, ajungând la valoarea de 4,74 mM, de ~22 de ori mai mare față de cea obținută folosind *PcPAL* în reacția de adiție a amoniacului la acidul *trans*-cinamic. Aceste valori K_M ridicate, prezentate de *LaAAL* sugerează o afinitate mai scăzută a enzimei față de aceste substraturi, care împreună cu valorile ridicate de k_{cat} (Tabelul 4) sugerează o orientare mai relaxată a substraturilor **1a** și **2a** în situsul catalitic al *LaAAL*-ului în comparație cu *Pc/At/AvPAL*. Este de remarcat faptul că, valorile numerelor de turnover (k_{cat}) în cazul substratului **1a** sunt de 7-11 ori mai mari comparativ cu variantele *Pc/AtPAL*, iar mutantul L104A/I472V-*AvPAL* de asemenea prezintă o creștere de ~2,6-4 ori a valorilor de k_{cat} în comparație cu omologii lui eucarioți *Pc/AtPAL*. Totodată important de evidențiat că, valorile k_{cat} de 0,64 s⁻¹ și 0,82 s⁻¹ atinse de *LaAAL* în cazul **1a** și **2a**, se apropie de eficiența catalitică a wt-PAL-urilor, în cadrul reacției lor naturale.

Inactivitatea *LaAAL*-ului în reacțiile substraturilor substituie cu 3-bromo-4-metoxi **1b**, **2b**, a fost confirmată și în cadrul măsurătorilor cinetice, care în acord cu conversiile obținute a susținut eficiența catalitică superioară a celui mai performant mutant, F136V/I461V-*AtPAL* (c_{1b} = 82%, c_{2b} = 30%, k_{cat} = 0,178 s⁻¹) față de omologul său *PcPAL* (c_{1b} = 76%, c_{2b} = 15%, k_{cat} = 0,049 s⁻¹).

Pentru a dobândi mai multe informații despre comportamentul cinetic atipic al *LaAAL*-ului, evaluările/testele de activitate folosind enzime izolate au fost, de asemenea, extinse către substraturile substituie cu 3-fluor-4-metoxi **1f**, **2f**, substraturi pentru care biocatalizatorii *LaAAL* sub formă de celule întregi au prezentat activitate. Valoarea de K_M ridicată, de ~3,4 mM, prezentată de *LaAAL* în reacția cu **1f**, a relevat din nou o afinitate scăzută față de substratul

respectiv, cu toate acestea numărul de turnover, k_{cat} , în acest caz a fost mult mai mic, de 0,022 s^{-1} , decât cel obținut în cazul reacției **1a** (0,64) și **2a** (0,81). Această valoare este, de asemenea, de ~12 ori mai mică decât cea obținută folosind cea mai performantă variantă F136V/I461V-*At*PAL, care având o afinitate ridicată față de acest substrat (valoarea K_M fiind de 25 de ori mai mică în cazul reacției cu **1f**), prezintă o constantă de specificitate de ~333 de ori mai mare, fapt care nu se reflectă în valorile de conversie similare furnizate de cele două enzime în reacțiile cu **1f** sau **2f**. Printre PAL-urile proiectate de proveniență/origine diferită, F137A/I460V *Pc*PAL și variantele omologi corespunzători de *At*PAL au depășit mutantul L134A/I460V *Pc*PAL și variantele sale omoloage de *At*/*Av*PAL în ceea ce privește eficiența catalitică bazată pe conversiile obținute (în cazul **1f**, **2f**) și pe numerele de turnover în cazul **1f** (Tabelul 4).

Valorile de K_M atipic ridicate ale *La*AAL-ului, obținute în toate reacțiile testate, pot fi asociate în cazul substituenților electronodonori - cu numere de turnover mari, în timp ce prezența unui substituent aromatic electronoatrăgător în poziția *meta*- afectează aparent în sens invers numărul de turnover al enzimei *La*AAL, observat în cazul derivaților 3,4-dimetoxi. Deși sunt necesare studii suplimentare cu accent mărit pe caracterizarea cinetică a *La*AAL-ului sau/și a PAL-urilor asemănătoare cu AL-11 în reacții cu alte substraturi, rezultatele noastre sugerează că aceste enzime s-ar putea să reprezintă o subclasă distinctă a amoniac-liazelor aromatice cu reacție naturală și domeniu de substrat modificat prin procese evolutive.

Substrat	Enzimă PAL	K_M (μM)	v_{max} ($\mu M/min$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($s^{-1} \times mM^{-1}$)	Conversie*		ee (%)
						L-1 (%)	2 (%)	
1a	L133A/I461V- <i>At</i> PAL	201.4	1.071	0.057	0.286	92	18	>99
	L134A/I460V- <i>Pc</i> PAL	560.1	1.621	0.086	0.154	96	17	>99
	L104A/I472V- <i>Av</i> PAL	216.0	5.372	0.228	1.056	96	15	>99
	<i>La</i> AAL	2548.0	15.080	0.638	0.250	98	82	>99
	<i>La</i> AAL 2a	4740	2.43 mM/h	0.8 s^{-1}				
1b	F136V/I461V- <i>At</i> PAL	102.4	3.318	0.178	1.751	82	30	>99
	F137V/I460V- <i>Pc</i> PAL	100.8	0.935	0.049	0.497	76	15	>99
	<i>La</i> AAL	3396.0	0.566	0.022	0.006	94	83	>99
1f	F136V/I461V- <i>At</i> PAL	134.5	4.994	0.268	1.999	100	86	>99
	L133A/I461V- <i>At</i> PAL	126.8	2.086	0.113	0.894	96	62	>99
	F137V/I460V- <i>Pc</i> PAL	95.8	3.007	0.166	1.739	90	49	>99
	L134A/I460V- <i>Pc</i> PAL	278.1	1.084	0.058	0.195	40	35	>99
	L104A/I472V- <i>Av</i> PAL	540.8	3.930	0.165	0.310	70	4	>99
	AL-11 like <i>Av</i> PAL	47.1	3.298	0.140	2.932	96	52	>99

Tabelul 4: Valoriile parametrilor cinetici și conversiile obținute în reacțiile catalizate de noile biocatalizatori.

Subactivitate 3.3. Caracterizarea structurală a noilor variante de PAL/ Obținerea unei structuri cristaline potrivite pentru predicția resturilor de aminoacizi modulatori 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 *Pc*PAL, 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 anterioare⁵ 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 adiție 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 de adiție a amoniacului. Menționăm că toate structurile *PcPAL* existente (PDB ID: 6RGS, 1W27, 6HQP, 6F6T) au fost obținute în absența de amoniac, iar numai structura 6RGS, obținută recent de către noi⁶, 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 amoniacizi 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 **Figura 19**. 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 20**). 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 20**), ceea ce indică prezența unei inhibiții a activității enzimatice.

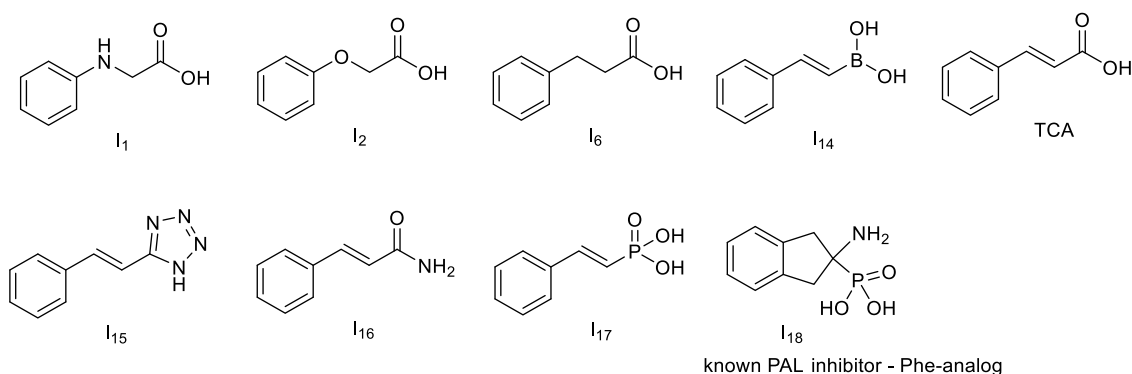
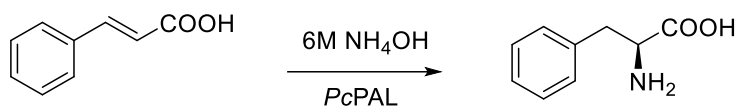


Figura 19. Analogi ai acidului cinamic aleși testați ca și inhibitori al enzimei *PcPAL*, folosind ca și compuși de referință TCA și acidul fosfonic aminoindan (I18), un analog de Phe, cunoscut cu efect de inhibiție puternică asupra activității PAL.



[S] = 1 mM; [E] = 0.625 μ M

1. ammonia addition without inhibitor
2. 2 mM Inhibitor I1
3. 2 mM Inhibitor I2
4. 2 mM Inhibitor I6

Inhib.	Conv.(%)	Timp de reacție (h)
-	78.1	1
I6	79.6	1
I2	70.5	1
I1	30.4	1
-	86.2	2
I6	87.0	2
I2	83.8	2
I1	39.4	2

Figura 20. 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, urmărind vitezele inițiale ale activității enzimice, determinând cinetica Michaelis-Menten în prezența și în absența diferitelor inhibitori (**Figura 21a**). Tipul inhibiției a fost determinată folosind reprezentările Lineweaver-Burk a curbelor MM de inhibiție (**Figura 21b** – 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 5**).

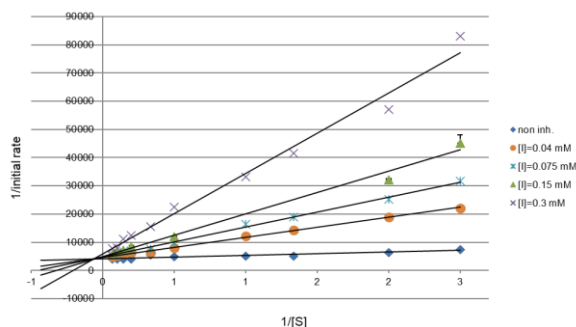
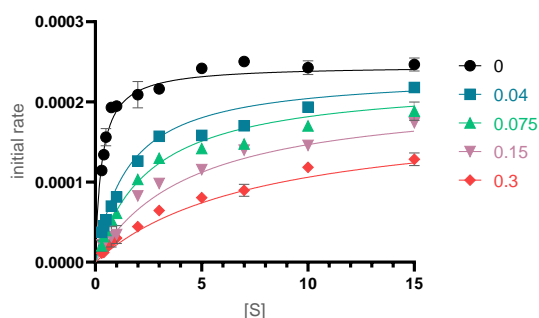


Figura 21. a) curbă Michaelis-Menten de inhibiție în cazul reacției de eliminare a amoniacului din L-Phe catalizată de wt-PcPAL în prezența diferitelor concentrații de I1 (*N*-fenilglicină).

b) 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 5**) 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	$2.88 \cdot 10^{-4}$	0.15	-
I1	$2.5 \cdot 10^{-4}$	0.3	0.0093
I2	$2.3 \cdot 10^{-4}$	0.51	0.39
I6	$2.2 \cdot 10^{-4}$	0.45	0.97
I14	$2.3 \cdot 10^{-4}$	0.47	3.50
I15	$2.5 \cdot 10^{-4}$	0.41	0.40
I16	$2.2 \cdot 10^{-4}$	0.49	0.56
I17	$2.2 \cdot 10^{-4}$	0.44	1.08
I18	$2.13 \cdot 10^{-4}$	0.52	0.00064
TCA	$2.23 \cdot 10^{-4}$	0.43	0.076

Tabel 5. 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 **II** 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 **II** 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 aceeași 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 22**) a fost deja analizată.

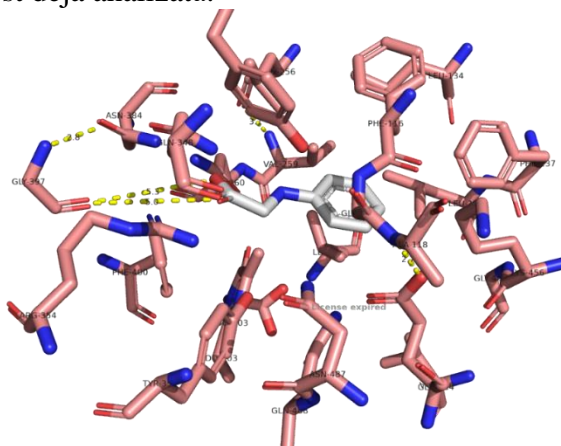


Figura 22. Situsul catalitic al enzimei *PcPAL* cu *N*-fenilglicina **II** ca și ligand.*Structura obținută în cadrul proiectului – manuscris în pregătire

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 A GCCGGAAGTACC-3'	63
3	<i>PcPAL</i> _N260Q_F	5'-GCCTTGGT A CAGGGAAGTACCG-3'	65
4	<i>PcPAL</i> _Q348N_F	5'-AAGCCCAAG A ACGACAGATACGCC-3'	65
5	<i>PcPAL</i> _N384Q_F	5'-AACTCCGTAAACGAC C AGCCCTTGATTG-3'	67
6	<i>PcPAL</i> _Q488N_F	5'-AACAGCATAAC A ACGACGTAAACTCCTTGGG-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), însă în testele pentru selectivitate D-PAL nici una dintre variante nu a arătat selectivitate D-crescută, m ajoritate lor fiind inactivată în urma mutațiilor.

Din rezultatele de inhibiție enzimatică și din noile structuri cristaline obținute este în pregătire un manuscris, data de trimire a articolului fiind estimat luna octombrie 2022, jurnalul vizat fiind Biochimica Biophysica Acta: General Aspects de la editura Springer.

Activitatea 4. Dezvoltarea biotehnologiilor bazate pe enzime PAL pentru obținerea aminoacizilor nenaturali de importanță industrială

În cadrul experimentelor din planul de redresare s-a observat eficiența catalitică superioară a variantelor *At*PAL, depășind inclusiv variantele *Pc*PAL corespunzătoare în ceea ce privește conversiile de reacție obținute. Pe baza acestor rezultate, atenția noastră s-a îndreptat către utilizarea mutanților *At*PAL în proiectarea noilor tehnologii bazate pe PAL, oferind astfel proceduri biocatalitice cu eficiență ridicată și cu impact redus asupra mediului.

Sub-activitatea 4.1. Ingineria reacțiilor folosind noile biocatalizatori sub formă de celule întregi

În etapa inițială am testat eficiența catalitică a variantelor *At*PAL în comparație cu cea a variantelor *Pc*PAL corespunzătoare în biotransformarea mai multor acizi cinamici monosubstituiți (**2a-l**) (**Figura 23**), folosind condițiile optime de reacție determinate pentru procesele catalizate de *Pc*PAL. Pe lângă monitorizarea conversiilor finale și a valorilor excesului enantiomeric (*ee*), s-a investigat, deasemenea, efectul concentrației de substrat asupra conversiilor de reacție, deoarece în cazul mai multor variante corespunzătoare de *Pc*PAL s-a observat apariția inhibiției de substrat. În continuare, s-a studiat efectul mediului de reacție/sursei de amoniac și al temperaturii asupra valorilor de conversie și timpului de reacție. După determinarea condițiilor optime de reacție, acestea au fost aplicate în cadrul biotransformărilor la scară preparativă, concentrându-se și pe reglarea fină a procesului de izolare a produsului.

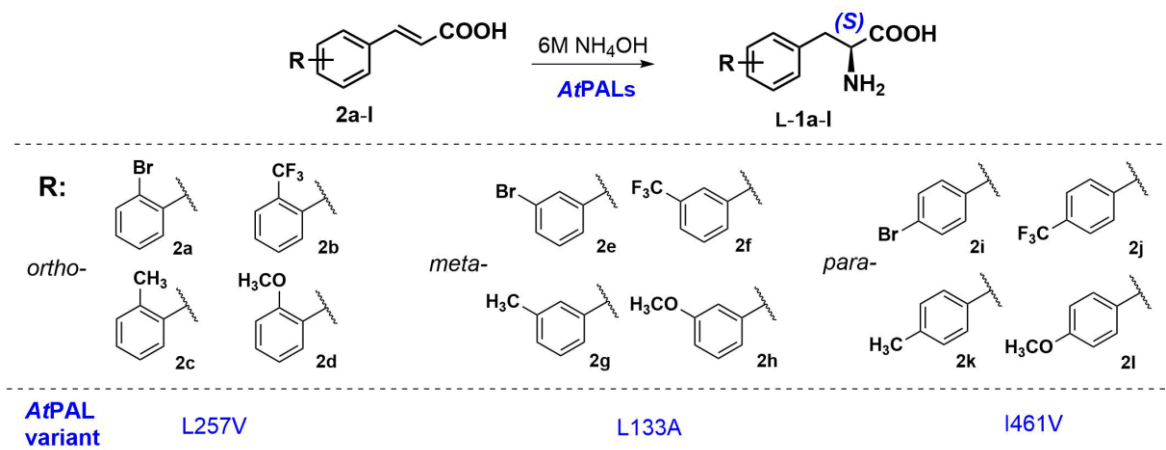


Figura 23. Reacțiile de adiție de amoniac ale acizilor cinamici **2a-l** substituiți în pozițiile *ortho*-, *meta*- și *para*-, catalizat de enzime PAL, supuși ingineriei de reacție.

Efectul concentrației de substrat

S-a monitorizat conversia obținută în urma reacțiilor de adiție a amoniacului pornind din substraturile **2a-l**, folosind condițiile optime determinate în cazul mutanților *Pc*PAL (6 M NH_4OH cu pH 9,5, 30 °C și un raport de biocatalizator:substrat de 1 (OD_{600} :mM)) și variind concentrația substraturilor în limita solubilităților acestora.

Utilizând variantele enzimei *Pc*PAL, reacția s-a încetinit semnificativ odată cu creșterea concentrației de substrat, susținând apariția inhibiției de substrat. Spre deosebire, variantele *At*PAL au furnizat conversii ridicate chiar și la concentrații de substrat apropiate de valoarea de

100 mM (**Figura 24**). Proprietatea biocatalizatorului de a fi activ la concentrații ridicate de substrat este esențială din punct de vedere al aplicabilității industriale a acestuia.

Pe lângă conversiile ridicate și excesele enantiomerice excelente obținute în cazul reacțiilor efectuate folosind mutații *At*PAL, majoritatea acestor reacții s-a desfășurat în timp mai scurt în comparație cu reacțiile catalizate de mutații *Pc*PAL (**Tabelul 6**). Este de remarcat faptul că, reacțiile de adiție de amoniac la substraturile **2g** și **2l** folosind *Pc*PAL L134A și I460V au rezultat în conversii scăzute de 26,4% respectiv 19,1% (**Tabelul 6**), în timp ce utilizarea mutațiilor *At*PAL corespunzătoare a rezultat în conversii ridicate de 86,3% pentru **2g** și 63,4% pentru **2l**. Îmbunătățiri semnificative ($\geq 25\%$) ale conversiei finale la utilizarea mutațiilor *At*PAL au fost observate și în cazul substraturilor **2j**, **2i**, **2d** substituie cu *p*-CF₃-, *p*-Br-, *o*-OCH₃.

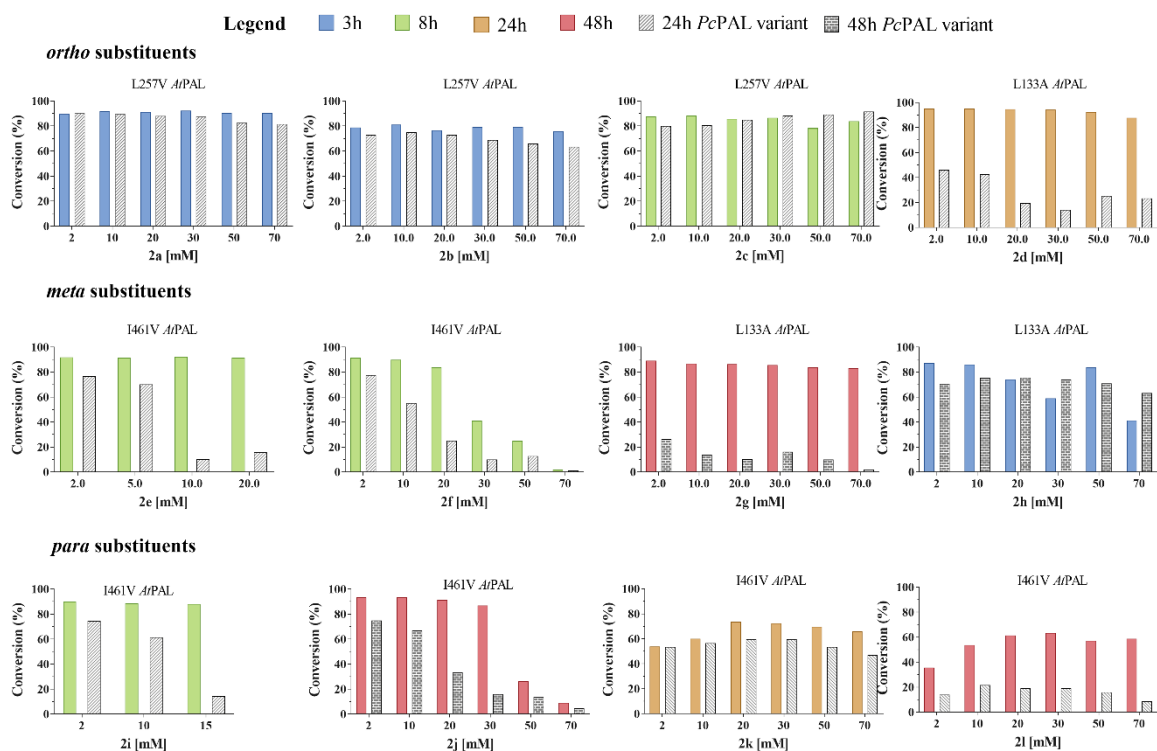


Figura 24. Efectul concentrației de substrat asupra conversiilor obținute în reacția de adiție de amoniac pornind din derivați de acizi cinamici **2a-2l**, folosind cei mai performanți mutații de *At*PAL (L257V, L133A sau I461V). Rezultatele sunt comparate cu valorile de conversie obținute folosind variantele *Pc*PAL corespunzătoare (L256V, L134A sau I460V - coloane cu model gri (hatched)).

Tabelul 6. Valorile de conversie și exces enantiomeric (*ee*) ai produșilor **L-1a-l** obținute în reacțiile de adiție de amoniac efectuate în condițiile optime menționate anterior.

Substrat	Substituent	mutant <i>At</i> PAL				mutant <i>Pc</i> PAL			
		[S] (mM)*	Timp (h)	c (%)	<i>ee</i> l (%)	[S] (mM)	Timp (h)	c (%)	<i>ee</i> l (%)
2a	<i>o</i> -Br	100	3	91.7	>99	70	24	81.6	>99
2b	<i>o</i> -CF ₃	100	3	75.9	>99	20	24	73	>99
2c	<i>o</i> -CH ₃	100	8	87.6	>99	70	24	91.5	>99
2d	<i>o</i> -OCH ₃	50	24	92.5	>99	10	24	42.5	>99
2e	<i>m</i> -Br	20	8	91.5	93	5	24	70.1	98
2f	<i>m</i> -CF ₃	10	8	89.9	>99	2	24	77.5	>99
2g	<i>m</i> -CH ₃	20	48	86.3	>99	2	48	26.4	>99
2h	<i>m</i> -OCH ₃	100	3	83.3	>99	50	48	71	>99
2i	<i>p</i> -Br	15	6	88.1	>99	10	24	61.6	>99
2j	<i>p</i> -CF ₃	20	48	91.3	>99	2	48	42.2	>99
2k	<i>p</i> -CH ₃	30	24	72.6	>99	30	48	59.9	>99
2l	<i>p</i> -OCH ₃	30	48	63.4	>99	30	48	19.1	>99

Efectul sursei de amoniac și/sau al pH-ului

Mediul de reacție, care în cazul de față este atât sursă de amoniac, cât și soluție tampon pentru reacție, poate să influențeze semnificativ conversia reacției de adiție de amoniac. Efectul sursei de amoniac a fost testat efectuând reacția de adiție în soluții de NH_4OH de diferite concentrații (2, 3, 4, 6 M), pH 9,5 (ajustat cu CO_2) sau carbamat de amoniu (2, 3, 4, 6 M), pH ~ 9,5 (fără ajustare); folosind ca substrat doi derivați parasubstituiți ai acidului cinamic, **2j** și **2k**, iar raportul *biocatalizator: concentrație de substrat* de 1 (OD600: mM). Conversiile cele mai ridicate au fost observate la utilizarea soluției de NH_4OH 6 M, respectiv carbamat de amoniu de 3-6 M (**Figura 25a**). Deoarece carbamatul de amoniu furnizează două molecule de amoniac, în timp ce NH_4OH numai una, puterea ionică globală este mai mică în cazul soluției de $\text{NH}_4[\text{H}_2\text{NCO}_2]$.

Pentru selecția finală a sursei optime de amoniac, în continuare a fost investigată impactul pH-ului asupra conversiilor obținute, folosind cele două surse diferite de amoniac ($\text{NH}_4[\text{H}_2\text{NCO}_2]$ 3 M, sau NH_4OH 6 M) și alte două substraturi (acizi cinamici substituiți cu *m*- OCH_3 și *p*-Br, **2i** și **2h**). Rezultatele arată o scădere semnificativă a valorilor de conversie pentru ambele substraturi la valori de pH >10, iar valoarea optimă s-a dovedit ca fiind ~9,5, indiferent de utilizarea $\text{NH}_4[\text{H}_2\text{NCO}_2]$ (3 M) sau NH_4OH (6 M) (**Figura 25b**).

Deși reacția de adiție a amoniacului oferă conversii similare cu ambele surse de amoniac, bazată pe puterea ionică globală mai scăzută a soluției de carbamat și luând în considerare componentele economice avantajoase, am selectat $\text{NH}_4[\text{H}_2\text{NCO}_2]$ de 3 M ca sursă optimă de amoniac pentru experimentele ulterioare.

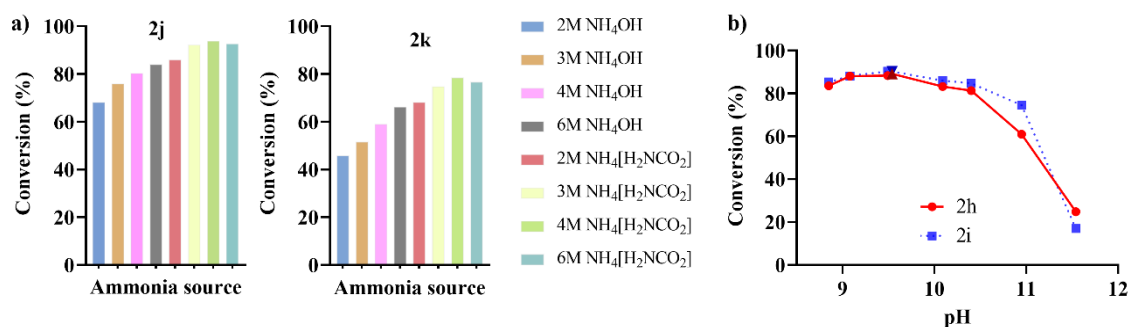


Figura 25. a) Conversiile reacțiilor de adiție de amoniac la *p*-CF₃-acid cinamic (**2j**) și la *p*-CH₃-acid cinamic (**2k**) după 24 de ore timp de reacție, folosind diferite surse de amoniac și muntatul *At*PAL I461V ca biocatalizator. În toate cazurile valorile excesului enantiomeric (*ee*) au fost >99%. **b)** Profilul de conversie - pH al reacțiilor de adiție de amoniac pornind din **2h** și **2i**, folosind mutații *At*PAL L133A și I461V.

Efectul temperaturii

În continuare, am studiat efectul temperaturii asupra valorilor de conversie a biotransformărilor, folosind ca substrat metil-fenilalanina substituită în diferite poziții *o*-, *m*-, *p*- (**2c**, **2g**, **2k**). Reacțiile au avut loc la temperaturi diferite (de la 15 °C la 45 °C), utilizând două concentrații de substrat (2 mM și 20 mM) (**Figura 26**), conversiile obținute indicând o temperatură optimă de 25 °C.

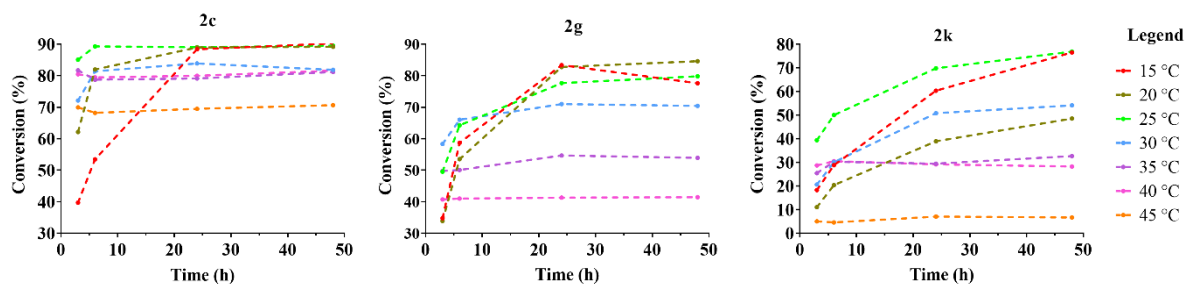


Figure 26. Efectul temperaturii asupra valorilor de conversie obținute în urma biotransformărilor a **2c**, **2g** și **2k**, catalizată de celule întregi cu PAL.

Scară preparativă

Având în vedere condițiile optime de reacție, ne-am îndreptat către producerea de Phe enantiopure cu valoare sintetică ridicată în industria farmaceutică. Reacțiile de adiție de amoniac pe substraturile **2a**, **2c**, **2g**, **2h**, **2i**, **2l** au fost efectuate la scară preparativă de 1 gram, obținând cu randamente competitive analogii de fenilalanină de puritate optică ridicată (**Tabelul 7**).

Tabelul 7. Reacțiile de adiție de amoniac la scară preparativă de 1 g, pornind din substraturile **2a**, **2c**, **2g**, **2h**, **2i**, **2l**, folosind ca biocatalizator *At*PAL sub formă de celule întregi și carbat de amoniu 3 M ca mediu de reacție.

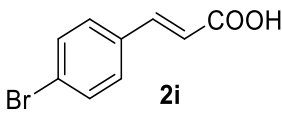
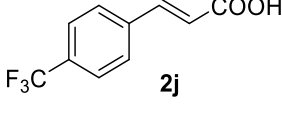
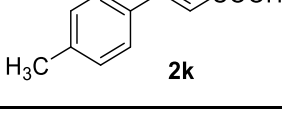
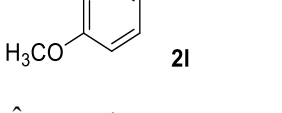
L-amino acid product	[S] (mM)	η (%)	<i>ee</i> (%)	E factor [#]	R.t. (h)	Enzime
L- 1a L- <i>o</i> -Br-Phe	50	64	>99	39.3	4	<i>At</i> PAL L257V
L- 1c L- <i>o</i> -CH ₃ -Phe	100	66	>99	32.3	4	<i>At</i> PAL L257V
L- 1g L- <i>m</i> -CH ₃ -Phe	50	65	>99	50.2	22	<i>At</i> PAL L133A
L- 1h L- <i>m</i> -OCH ₃ -Phe	100	66	>99	28.4	3	<i>At</i> PAL L133A
L- 1i L- <i>p</i> -Br-Phe	100	56 ^{**}	>99	33.9	24	<i>At</i> PAL I461V
L- 1l L- <i>p</i> -OCH ₃ -Phe	30	59	>99	84.6	48	<i>At</i> PAL I461V

Livrabile: Proceduri biotehnologice de scară preparativă pentru obținerea în formă enantiopură a unor fenilalanin analogilor de interes industrial

Sub-activitatea 4.2. Proiectarea biotransformărilor folosind noile biocatalizatori sub formă de enzime izolate

Au fost studiate diferențele dintre valorile de conversie obținute în biotransformări folosind biocatalizatorii PAL sub formă de celule întregi și enzime izolate. Rezultatele obținute în urma reacțiilor de adiție a amoniacului pornind de la substraturile **2i-2l** parasubstituite și folosind enzimele mutante *At*PAL I461V și F136V și variantele *Pc*PAL omoloage ale acestora I460V și F137V sub formă de celule întregi, respectiv enzime izolate, sunt trecute în **Tabelul 8**.

Tabel 8. Conversiile obținute în urma reacțiilor de adiție de amoniac pe substraturile **2i-2l** utilizând biocatalizatorii sub formă de enzime izolate (**ei**) și celule întregi (**cî**).

Substrat	<i>Pc</i> PAL			<i>At</i> PAL		
	Mutant	c_{ei} (%)	c_{cî} (%)	Mutant	c_{ei} (%)	c_{cî} (%)
 2i	<i>wild-type</i>	80.2	7.1	<i>wild-type</i>	82.1	84.7
	F136V	82.3	71.6	F137V	80.7	89.4
	I460V	84.0	74.7	I461V	91.6	90.6
 2j	<i>wild-type</i>	52.5	5.7	<i>wild-type</i>	34.6	48.9
	F136V	87.4	73.9	F137V	83.9	92.7
	I460V	89.5	62.5	I461V	97.7	88.7
 2k	<i>wild-type</i>	55.8	6.0	<i>wild-type</i>	29.8	36.9
	F136V	35.9	16.6	F137V	16.0	33.3
	I460V	76.5	46.1	I461V	74.7	53.7
 2l	<i>wild-type</i>	2.4	<1	<i>wild-type</i>	0.0	<1
	F136V	19.2	5.4	F137V	44.6	23.7
	I460V	46.2	10.6	I461V	39.6	30.1

În cazul tuturor reacțiilor catalizate de *Pc*PAL izolat s-a observat conversii semnificativ mai mari după 17 ore de reacție în comparație cu cele obținute utilizând *Pc*PAL sub formă de celule întregi în 24 de ore (**Tabelul 8**). Spre deosebire, în cazul enzimei *At*PAL biotransformările mediate de celule întregi și cele mediate de enzime purificate au prezentat în unele cazuri conversii similare (reacția cu **2i** catalizată de *wt* și I461V), însă în mai multe cazuri conversiile obținute folosind celule întregi au fost mai ridicate decât cele obținute cu *At*PAL izolat (reacțiile cu **2i** catalizat de mutantul F136V; **2j**, **2k** catalizată de varianta *wt* și de mutantul F136V).

Având în vedere costurile de producție scăzute în cazul biocatalizatorilor PAL sub formă de celule întregi în comparație cu costurile de producție ale enzimelor izolate și valorile competitive în ceea ce privește conversiile obținute în cadrul biotransformărilor mediate de celule întregi cu *At*PAL, până la stadiul de finalizare a proiectului ingineria reacțiilor s-a realizat exclusiv folosind noile biocatalizatori sub formă de celule întregi, descris în cadrul *Activității 4.1*.

Rezultatele cuprinse din raportul științific integral au fost/sunt în curs de diseminare prin următoarele participări la conferințe, respectiv publicații științifice.

- **Conferințe:**

1. Bencze László-Csaba, prezentare orală cu titlul "Substrate-specific tailoring approach of phenylalanine ammonia-lyases: towards a general approach", la conferința 13th International Symposium of The Romanian Catalysis Society (RomCat 2022), 22-24 iunie 2022, Băile Govora, România
2. Tork Souad Diana, poster cu titlul "Engineered *At*PALs for the production of L- and D-arylalanines", la conferința 13th International Symposium of The Romanian Catalysis Society (RomCat 2022), 22-24 iunie 2022, Băile Govora, România

3. Boros Krisztina, poster cu titlul "PETases: activity assessment, issues and solutions", la conferința 13th International Symposium of The Romanian Catalysis Society (RomCat 2022), 22-24 iunie 2022, Băile Govora, România
4. Boros Krisztina, prezentare orală cu titlul „Incorporation of non-canonical amino acid into recombinant phenylalanine ammonia-lyase” la conferința The National Scientific Students’ Associations Conference, 17-19 mai 2021, Budapesta, Ungaria (*premiul II. în secția de Biochimie*).

• **Publicații științifice:**

1. R. B. Tomoiagă, S. D. Tork, A. Filip, L. C. Nagy, L. C. Bencze, Phenylalanine ammonia lyases: battle between protein engineering and natural evolution for activity towards challenging substrates, *Applied Microbiology and Biotechnology* – *manuscris sub evaluare, trimis la jurnalul Applied Microbiology and Biotechnology în data de 14.09.2022 (I.F. 5,560)* - articol bazat pe rezultatele obținute din *Activitatea 1 și Activitatea 2* modificată conform planului de redresare
2. S. D. Tork, E. Z. A. Nagy, R. B. Tomoiagă, L. C. Bencze, Engineered, scalable production of optically pure L-phenylalanines using phenylalanine ammonia-lyase from *Arabidopsis thaliana* - *manuscris sub evaluare, trimis la jurnalul ACS Sustainable Chemistry & Engineering în data de 15.09.2022, transfer editorial către Journal of Organic Chemistry în data de 31.08.2022 (I.F. 4,198)* - articol bazat pe rezultatele obținute în cadrul *Activității 4*
3. K. Boros, P. Lang P., A. Filip, C. Schoefield, J. Brem, L. C. Bencze, Structural aspects of phenylalanine ammonia lyase redesign – *manuscris în pregătire, jurnal vizat: Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects (I.F. 4,117)* - articol bazat pe rezultatele obținute în cadrul *Activității 3* modificată conform planului de redresare

• **Totodată rezultatele de cercetare obținute în cadrul proiectului au contribuit/ vor contribui la:**

- două teze de doctorat al membrilor echipei:
 1. drd. Souad Diana Tork – susținere estimată în octombrie 2022
 2. drd. Boros Krisztina – susținere în 2024
- teza de habilitare a directorului de proiect – data estimativă, primul semestru 2023
- 6 lucrări de licență și 4 lucrări de disertație în perioada 2020-2022

Date: 14.09.2022

Signature: Dr. Laszlo Csaba Bencze

Referințe

- ¹ Liu, H., Naismith, J. H., *BMC Biotechnology*, **2008**, 8:91
- ² L. Poppe, L., J. Rétey, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 3668–3688.
- ³ Tomoiagă R.B., Tork S.D., Horváth I., Filip A., Nagy L.C., Bencze L.C., *Biomolecules*, **2020**, 10(6): 838
- ⁴ Zhu, L., Feng, G., Ge, F. et al. *Appl Biochem Biotechnol*, **2019**, 187, 75–89
- ⁵ A. Filip, E. Z. A. Nagy, S. D. Tork, G. Bánóczy, I. M. Toșa, F. D. Irimie, L. Poppe, C. Paizs, L. C. Bencze, *ChemCatChem.*, **2018**, 10, 2627.
- ⁶ E. Z. A. Nagy, S. D. Tork, P. A. Lang, A. Filip, F. D. Irimie, L. Poppe, I. M. Toșa, C. J. Schofield, J. Brem, C. Paizs, *ACS Catal.*, **2019**, 9, 8825.
- ⁷ Parmeggiani, F., Lovelock, S. L., Weise, N. J., Ahmed, S. T., & Turner, N. J. *Angew. Chem.*, **2015**, 127, 4691-4694.
- ⁸ Dima NA, Filip A, Bencze LC, Oláh M, Sátorhelyi P, Vértessy BG, Poppe L, Paizs C. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai Chemia*, **2015**, 61(2):21-34
- ⁹ F. Parmegiani, N. J. Weise, S. T. Ahmed, N. J. Turner, *Chem. Rev.* **2018**, 118, 73-118
- ¹⁰ 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.
- ¹¹ Tork SD, Moisa ME, Cserepes L, Filip A, Nagy LC, Irimie FD, Bencze LC, *Sci. Rep.*, **2022**, 12(1)
- ¹² Tork SD, Nagy EZA, Cserepes L, Bordea DM, Nagy B, Toșa MI, Paizs C, Bencze LC *Sci. Rep.*, **2019**, 9 (1)
- ¹³ Varga A, Bata Z, Csuka P, Bordea DM, Vértessy BG, Marcovici A, Irimie FD, Poppe L, Bencze LC *Studia Universitatis Babeș-Bolyai Chemia*, **2017**, 62(3):293-308
- ¹⁴ Kempa EE, Galman JL, Parmeggiani F, Marshall JR, Malassis J, Fontenelle CQ, Vendeville JB, Linclau B, Charnock SJ, Flitsch SL, Turner NJ, Barran PE, *JACS AU*, **2021**, 1(4):508-516
- ¹⁵ Reetz MT, Bocola M, Carballeira JD, Zha DX, Vogel A, *Angewandte Chemie-International Edition*, **2005**, 44(27):4192-4196
- ¹⁶ Reetz MT, Carballeira JD *Nature Protocols*, **2007**, 2(4):891-903
- ¹⁷ Weise NJ, Ahmed ST, Parmeggiani F, Galman JL, Dunstan MS, Charnock SJ, Leys D, Turner NJ, *Scientific Reports* 2017, 7(1)
- ¹⁸ Kille S, Acevedo-Rocha CG, Parra LP, Zhang ZG, Opperman DJ, Reetz MT, Acevedo JP, *ACS Synthetic Biology*, **2013**, 2(2):83-92