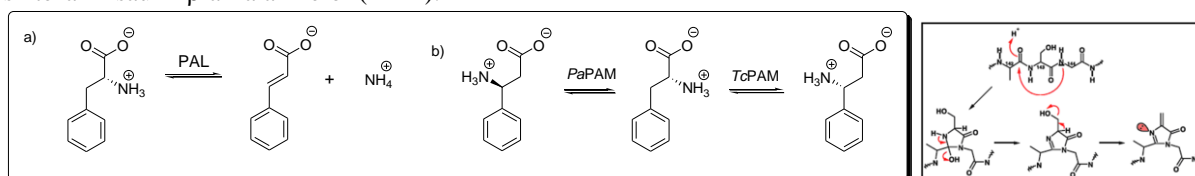


Raport științific sintetic al proiectului

AMONIAC LIAZE SI AMONIAC MUTAZE NATIVE SI MUTANTE IMOBILIZATE PENTRU OBTINEREA ANALOGLOR DE ALFA- SI BETA-FENILALANINA

pentru perioada 2012-2013

Fenilalanin amoniac liazele (PAL; EC 4.1.3.24) catalizează deaminarea non-oxidativă a L-fenilalaninei cu formarea acidului (*E*)-cinamic, în timp ce fenilalanin 2,3-aminomutazele (EC 5.4.3.x) catalizează izomerizarea L-fenilalaninei la L- sau D-β-fenilalanina, în funcție de originea enzimei (**Schema 1**). În timp ce enzimele PAL sunt frecvente în plante, unde au un rol esențial în formarea fenilpropanoidelor, au fost identificate până în prezent doar câteva enzime PAL de origine bacteriană. PAL și PAM sunt folosite ca biocatalizatori pentru sinteza L-α-aminoacizilor din acrilati (PAL), în procese de rezoluție cinetică cu formarea D-α-aminoacizilor din racemați (PAL), sau pentru sinteza L- sau D-β-arilalaninelor (PAM).



Schema 1. Reacții catalizate de PAL și PAM. Formarea posttranslaționară a grupării puternic electofile MIO.

PAL este un homotetramer alcătuit din subunități monomerice. Fiecare subunitate poate fi împărțită în trei domenii. Primul domeniu este reprezentat de gruparea prostetică MIO care are rol catalitic. Secvența de aminoacizi care codifică această grupare prostetică este strict conservată. Al doilea domeniu este domeniul central, iar cel de-al treilea domeniu este cunoscut sub numele de “shielding-domain” care se presupune a avea un rol de apărare și/sau regulator (**Figura 5**). Domeniile sunt conectate prin intermediul buclilor mobile. Gruparea MIO ia naștere în urma ciclizării posttranslaționale, autocatalitice a unei tripeptide interne Ala-Ser-Gly, prin eliminarea a două molecule de apă.

Prima etapă a constat în exprimarea în *E. coli* PAL din pătrunjel *PcPAL* (eucariotic) și PAL dintr-o bacterie termofilă *Rubrobacter xylophilus* *RxPAL* radiotolerantă (NCBI cod: YP_644511.1, Uniprot cod: Q1AV79, care codifică 540 AA) cu creștere optimă la 65°C și ulterior a urmat investigarea proprietățile acestora.

Aceasta din urmă a fost găsită prin folosirea programului/algorithmului BLASTp din baza de date non-redundantă pentru proteine NCBI utilizând secvența de la PAL provenită de la *Photobacterium luminescens* (*PIPAL*) (Duchaud și colab. 2003, Williams și colab. 2005) (Uniprot cod: Q7N4T3). În urma rezultatelor favorabile (cod: YP_644511.1, care codifică 540 AA) se presupune faptul ca aceasta poate fi fenilalanina/ histidin amoniac liaza care provine de la bacteria termofilă *Rubrobacter xylophilus* DSM 9941.

Genă care codifică PAL provenită de la *Rubrobacter xylophilus* a fost optimizată la nivelul codonului pentru a putea fi exprimată în *Escherichia coli*. Folosind tehnica PCR, gena nou sintetizată – formată din 1632 perechi de baze – aflată în vectorul de clonare pMK și clonată în vectorul de expresie pBAD-HisB, are o etichetă de 6 histidine la capătul *N*-terminal, astfel încât poate fi purificată cu ușurință din lizat cu ajutorul cromatografie Ni-NTA. Alte avantaje oferite de noul vector constă în reglarea exprimării și inducția dependentă de concentrație, care permite modularea nivelurilor de exprimare. Primul pas în purificarea plasmidelor a constat în obținerea celulelor competente de XL1Blue care au fost transformate și selectate prin însămânțare pe mediu LB solid cu tetraciclină, rezistență corespunzătoare tulpinei, respectiv carbenicilină, pe baza genelor de rezistență la antibiotic codate în plasmide. Vectorul rezultat a fost confirmat prin secvențiere folosind promotorul pBAD și amorsele (primerii) “forward” și “reverse” (5’-CCTGACGCTTTTATCGCAACTC-3’ și respectiv 5’-GAGGCATCCTGGTACCCAG-3’).

După optimizarea expresiei, *RxPAL* a fost supraexprimată în *E. coli* TOP10 într-o formă solubilă cu capătul *N*-terminal care conține His6-tag (*RxPAL*). Proteina recombinată *RxPAL* a fost purificată prin cromatografie de afinitate folosind Ni-NTA. Pentru a analiza exprimarea (probele: înainte de inducție, înainte de lizare, resturile celulare și supernatantul după sonicare) și purificarea s-a folosit electroforeză în gel de poliacrilamidă (SDS-PAGE). După cum se poate vedea și în imaginile gelurilor (**Figura 1**), enzima *RxPAL*, cu masă moleculară de 58.4 kDa, a fost produsă și purificată cu succes.

Activitatea enzimei a fost urmărită prin spectrofotometrie, la lungimea de undă de 290 nm, prin monitorizarea formării produsului (acidul (*E*) cinamic) din substratul natural, fenilalanina. În primul rând s-a pus accent pe **determinarea pH-ului optim** al enzimei. Astfel, măsurătorile au fost efectuate în soluții tampon păstrând tăria ionică și temperatura constante, în domeniul de pH 6.5-12, timp de 7 minute. S-a ajuns la profilul de pH din **Figura 2**. În reprezentarea pantelor în funcție de pH (graficul din partea dreaptă) se pot observa două valori de pH optim, primul la 8.5, iar al doilea la 11.2. Datele găsite în literatura de specialitate sunt similare cu primul pH optim, 8.5, însă în cazul acesta cea mai mare activitate a fost înregistrată la pH 11.2.

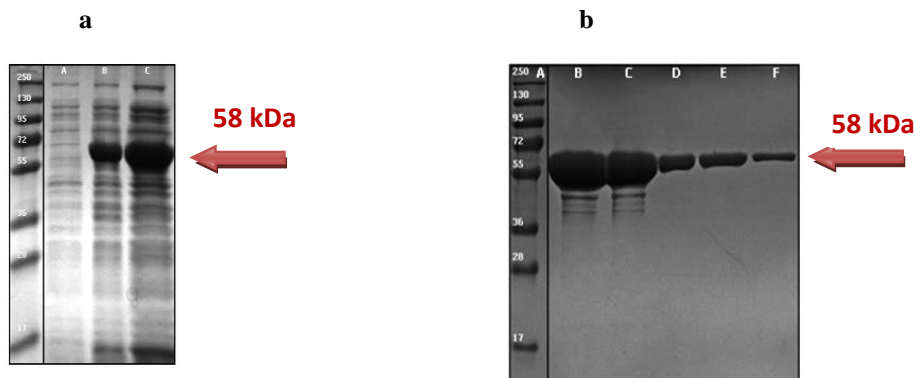


Figura 1. Verificarea exprimării (a) și purificării (b) proteinei fenilalaninamoniac-liaza *Rubrobacter xylanophilus* (RxPAL) în tulpina *E. coli* TOP10a. ProSieve™ QuadColor™ protein marker, 17 kDa – 250 kDa; A- cultură de celule înainte de inducție B- lizat bacterian; C-supernatant cu proteina recombinată b. A- ProSieve™ QuadColor™ protein marker, 17 kDa–250 kDa; B - F -fracțiile după eluarea proteinei de pe coloană

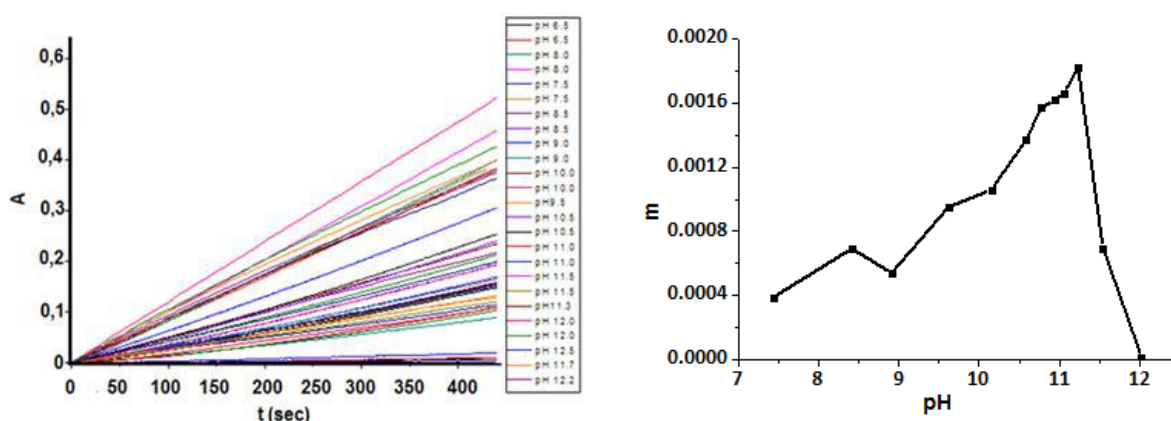


Figura 2. Profilul de activitate al RxPAL în condiții diferite de pH.

Stabilitatea termică a enzimei s-a determinat prin măsurători termofluorimetrice la o concentrație de 2 mg/mL RxPAL. La început, pentru a determina pH-ul optim în privința temperaturii de topire (T_m), măsurătorile au fost efectuate în soluții tampon 100 mM, în domeniul de pH 6-12. Din profilul de pH (Figura 3.a) se observă că temperatura de topire maximă se atinge în domeniul pH 8- 8.5 și este aproximativ 63°C.

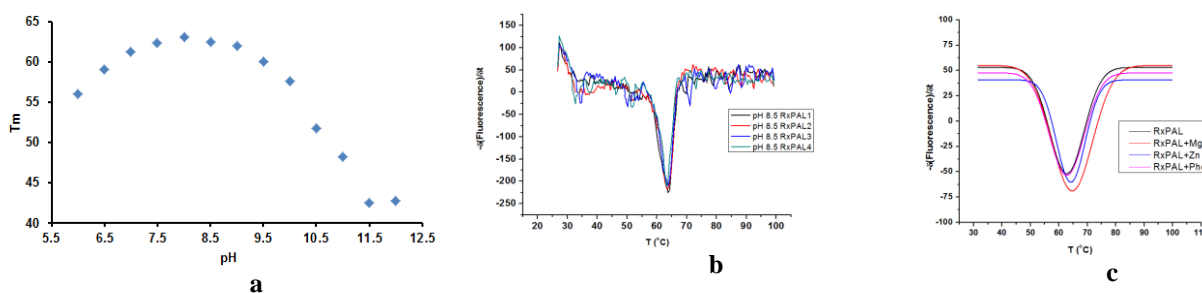


Figura 3. Profilul temperaturii de topire al RxPAL în condiții diferite de pH.

Următoarele măsurători au fost efectuate în soluție tampon Tris-HCl, pH 8.5 la diferite concentrații de substrat (Figura 3.b), apoi în prezența unor ioni metalici (Mg^{2+} , Zn^{2+}) sau fenilalanină (Figura 3.c). Temperatura de topire a fost determinată prin citirea valorii derivatei de ordinul întâi din curba negativă obținută pe baza valorilor experimentale. Comparând rezultatele măsurătorilor în prezența substratului cu cele în absența acestuia se observă că temperatura de topire (63°C) nu este modificată de prezența fenilalaninei. În schimb, ionul de Mg^{2+} în concentrație de 0.3 mM mărește cu 1.9°C, iar ionul de Zn^{2+} în concentrație de 0.2 μM mărește cu 1.4°C temperatura de topire a proteinei.

Cu scopul de a analiza **stabilitatea structurii enzimei** s-au efectuat măsurători de spectroscopie de dicroism circular DC în prezența produsului natural al reacției enzimatice, acidul cinamic, deoarece spectrul fenilalaninei se suprapune peste cel al proteinei. Măsurătorile au fost efectuate în soluții tampon păstrând temperatura constantă (20°C), în domeniul de pH 6.5-12, la o concentrație RxPAL de 2 mg/mL.

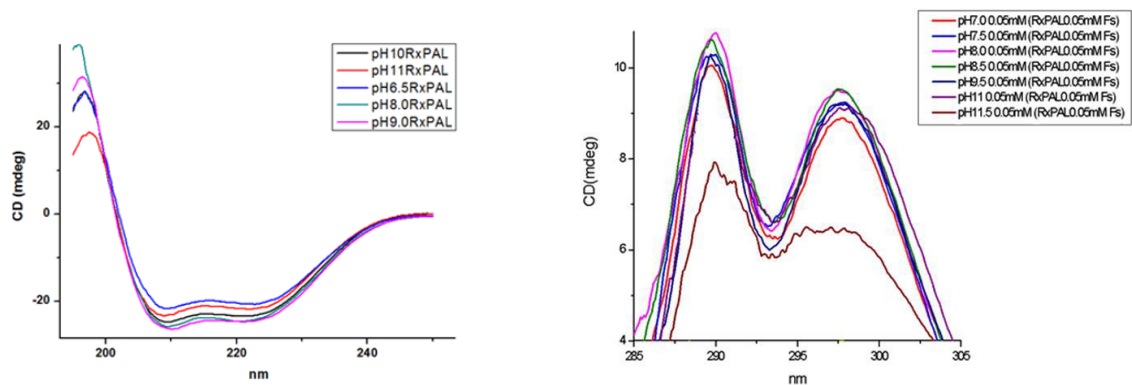


Figura 4. Spectrele de DC ale RxPAL în UV îndepărtat și UV apropiat la diferite valori ale pH-ului

Spectrele de DC (**Figura 4.**) indică faptul că enzima nu prezintă modificări semnificative în ceea ce privește structura secundară, terțiară și cuaternară a enzimei în intervalul de pH 6.5-11.2, ceea ce înseamnă că structura este foarte bine păstrată în acest interval de pH. De asemenea se poate observa că, la valori mai mari de 11.5 ale pH-ului, o parte a structurii enzimei se deteriorează.

Activitatea enzimatică a fost determinată prin monitorizarea formării acidului (*E*)-cinamic din fenilalanină în UV la 290 de nm, la diferite concentrații ale substratului (10-40 mM). Măsurătorile au fost efectuate în soluție CAPS de concentrație 100 mM cu pH 11.4 concentrația enzimei fiind 2 μM. Constantele Michaelis-Menten rezultate au fost K_m 1 mM iar k_{cat} $10^{-4} s^{-1}$. O posibilă explicație pentru aceste valori ar putea fi faptul că nucleofilul 2-sulfaniletanol folosit la purificare reacționează cu gruparea prostetică MIO puternic electrolilă formând un aduct ce inhibă ireversibil enzima. În lipsa agentului reductiv grupările tiolice interacționează intermolecular formând agregate enzimice (cross-linked enzyme aggregates-CLEA), ceea ce duce la precipitare.

Parcurgând etapele mai sus menționate s-a caracterizat și **PAL-ul eucariotic din *Petroselinum crispum*** (pătrunjel, PcPAL). În contrast cu RxPAL, activitatea PcPAL e maximă la 37°C și pH 8.8. Mai mult, valorile K_m 30 mM și k_{cat} $34 s^{-1}$, secondat de faptul că PcPAL s-a dovedit un biocatalizator util în biotransformarea analogilor naturali ai fenilalaninei, califică această enzimă cu un potențial superior față de RxPAL. Totuși a fost evidențiată, prin măsurătorile de activitate enzimatică, DC și termofluorometrie, o inactivare relativ rapidă a PcPAL.

Comparând omologii eucariotice cu cei procariotice se poate afirma că aceștia din urmă conțin cu aproximativ 20% mai puțini aminoacizi în structura lor. Bucla multihelix C-terminal de aproximativ 200 de aminoacizi, existentă în PAL-uri eucariote, se situează în jurul situsului catalitic restricționând atașarea substratului, respectiv decuplarea produsului de reacție de enzimă (**Figura 5**). Mai mult, se presupune ca aceste bucle destabilizează structural enzimele.

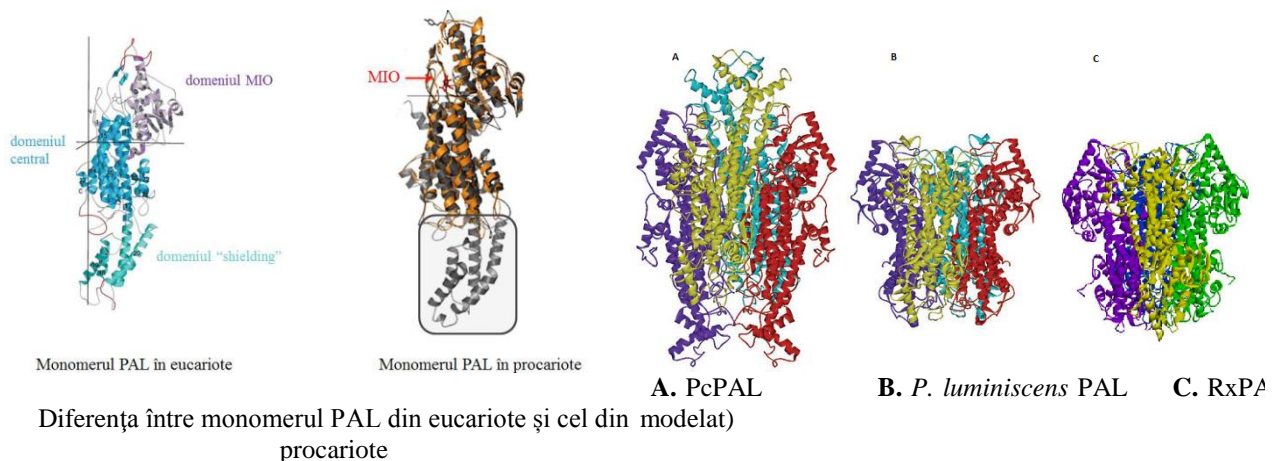


Figura 5. Structuri PAL eucariotice și procariotice

În privința termostabilității enzimei RxPAL, au fost luați în considerare 2 factori: posibilitatea de formare de punți disulfurice și respectiv ionice. Au fost detectate 3 posibilități de formare de punți disulfurice într-un monomer (**Figura 6a**): Cys₃₅-Cys₁₁₆, Cys₃₂₁-Cys₄₇₈, Cys₂₃₁-Cys₂₂₈, ultimul fiind cel intrahelical, cu cea mai mică importanță. Cys₃₅ și Cys₁₁₆ sunt plasate la suprafață, în consecință aceste cisteine au fost mutate la serine, pentru a împiedica formarea de agregate interproteice. Celelalte cisteine sunt defavorizate în a forma agregate nu numai datorită numărului mare de aminoacizi superficiali ionizabili (Glu 8.5%, Arg 8.32% raportate la întreaga secvență), dar și datorită distribuției lor omogene pe suprafață (**Figura 6**).

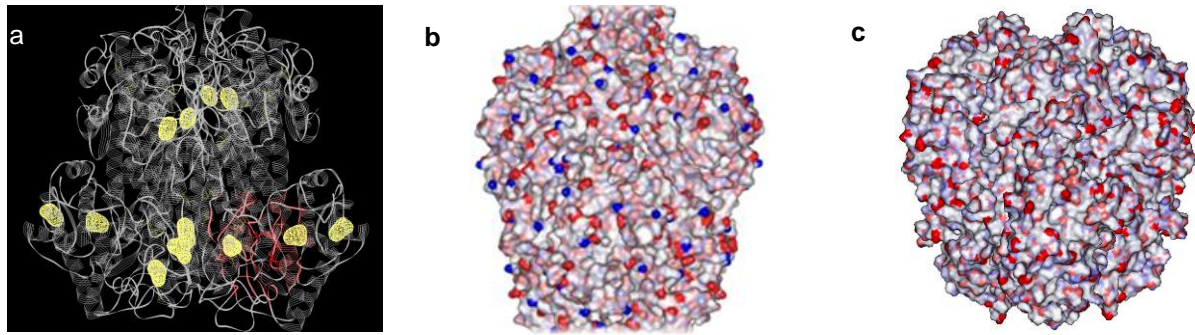


Figura 6 (a) Cisteinele proximale în structura RxPAL (domenii galbene) unul din cele patru situsuri catalitice marcat cu roșu. Modelul suprafețelor (b) PcPAL și (c) RxPAL. Resturi acide (roșu) cele bazice (albastru). Sarcini izolate pentru PcPAL și distribuție omogenă de sarcini, dar acidă pe suprafața RxPAL.

Deși posibilitatea de agregare a RxPAL a fost înlăturată, parametrii catalitici ai enzimei nu au fost îmbunătățiți. Acest fapt ne-a condus la concluzia că, cel puțin în cazul RxPAL, formarea punților disulfurice în procesul de expresie proteică este esențială. De vreme ce expresia în vector pBAD și *E. coli* TOP10 nu permite acest lucru, ne-am focusat la proiectarea genelor native exprimabile în vector pET19, compatibile cu celule competente *E. coli* Rosetta-gami care asistă posttranslaționar la formarea punților disulfurice. Pe lângă genele PcPAL și RxPAL au fost comandate în vectorii de expresie pET19 o serie de fenilalaninamoniac-liaze native ca cea din *Anabaena variabilis* (wt-AvPAL), *Streptomyces maritimus* (wt-SmPAL) și *Rhodospiridium toruloides* (wt-RtPAL), dar și fenilalaninamoniac-mutaze native ca cea din *Taxus canadensis* (wt-TcPAM) și *Pantoea agglomerans* (wt-PaPAM). Este de menționat faptul că, după caz, codonii cisteinelor singulare din domeniul shielding (care nu sunt implicate în punți disulfurice) au fost schimbate cu codon serinic. Redăm în continuare secvența aminoacizilor din monomerul wt-PAL (cisteina schimbată cu serina – marcat cu galben):

```
MENGN GATTNGHVNGNGMDFCMKTEDPLYWGIAAEAMTGSHLDEVKKMVAEYRKPVVKLGGETLTISQVAAI
SARDGSGVTVELSEARAGVKASSDWVMDSMNKGTD SYGVTTFGFGATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGIFGNG
SDNTLPHSATRAAMLVRINTLQGYSGIRFEILEAITKFLNQNTIPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPN SKAVG
PTGVILSPEEAFKLAGVEGGFFELQPKEGLALVNGTAVGSGMASMVLFEANILAVLAEVMSAIFAEVMQ GKPEFT
DHLTHKLKHPGQIEAAAIMEHILDGSAYVKA AAKLHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIR SSTKMIE R
EINSVNDNPLIDVSRNKAIHGGNFQGTPIGVSM DNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLD
YFGKGA EIAMASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTSEAVEILKLMSTTFVGLCQAIDL RHLE
ENLKSTVKNTVSSVAKRVLTMGVN GELHPSRFCEKDLLRVVDREYIFAYIDDPCSATYPLMQKLRQTLVEHALKN
GDNERNLSTSIFQKIATFEDELKALLPKEVESARA ALESGNPAIPNRIIECRSYPLYKFVRKELGTEYLTGEKVTSPG
EEFEKVF IASKGEIIDPLLESLESWNGAPLPIS
```

Plasmidele pET19 conțin o secvență His6-tag N-terminală cu un situs de clivare recunoscut de către enterokinază, o genă rezistentă la ampicilină, un promotor T7lac și genele PAL, respectiv PAM. Expresiile induse cu IPTG în *E. coli* Rosetta-gami au decurs cu randamente bune, în urma purificării proteinelor prin cromatografie Ni-NTA. Eluția proteinelor de inetrus a fost efectuată cu o soluție de 500 mM imidazol. În **Figura 7** sunt redată harta genetică a plasmidelor și electroforegrama din diversele fracții obținute după ruperea peretelui celular, respectiv fracții rezultate în urma purificării cromatografice.

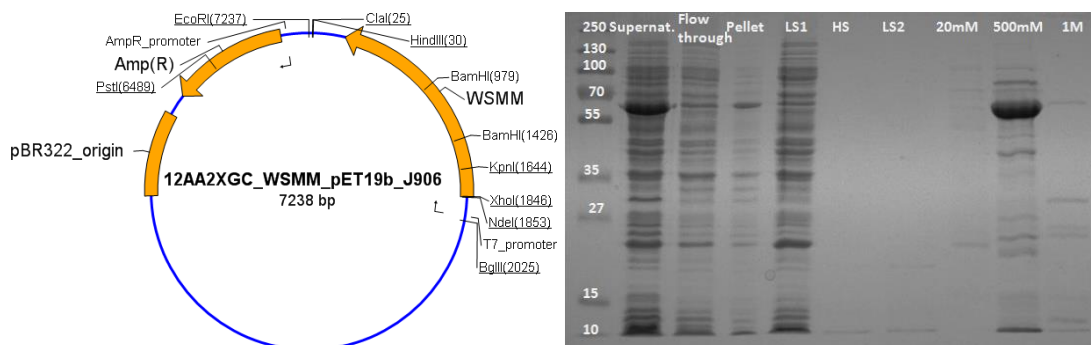


Figura 7. Harta genetică a plasmidei pentru producerea wt-PaPAM și electroforegrama care certifică expresia și gradul de puritate al enzimei în diversele stadii de purificare.

Liazele și mutazele astfel obținute au prezentat parametri catalitici asemănători celor obținuți de noi anterior (pentru PcPAL) sau prezentate în literatură pentru restul de proteine. Cum era de așteptat, activitatea RxPAL s-a îmbunătățit, K_m 5mM și k_{cat} 0.5 s⁻¹, dar din păcate aceste valori nu sunt suficient de promițătoare pentru a califica această

enzimă în rândul biocatalizatorilor utili la scară preparativă. Stabilitatea enzimelor de origine eucariotă a crescut cu aproximativ 10-15%, efectul destabilizator al helixurilor din domeniul shielding persistând în continuare.

În concluzie, s-a demonstrat că enzimele procariote sunt stabile, dar ineficiente din punct de vedere catalitic, în timp ce enzimele eucariote sunt instabile structural, dar cu o capacitate biocatalitică însemnată.

Următoarea etapă a constat în proiectarea unor mutații hibridi care îmbină domeniul catalitic al enzimelor eucariote cu domeniul shielding al enzimelor procariote, în speranța producerii unor enzime stabile și eficiente din punct de vedere catalitic.

Secțiunea de scindare s-a determinat prin alinierea secvențelor și inspecția vizuală, ținându-se cont de două posibilități: realizarea unei singure intersecții inclusiv prin excizia câtorva aminoacizi din secvența gazdei (domeniul catalitic eucariotic) sau a două intersecții prin înserarea buclei procariote între domeniul catalitic și secvența scurtă C-terminală, ambele aparținând domeniului gazdă. S-a ales a doua variantă, dat fiind faptul că s-a evidențiat o interacțiune hidrofobă importantă între domeniul central și secvența scurtă C-terminală la *PcPAL*. Mai mult, cele două secțiuni de scindare sunt bine conservate și apropiate de locul joncțiunii (**Figura 8**).

```

cPAL VEILKLMSTTFLVGLCQAIDLRHLEENLKSTVK 537
AvPAL VDIFQNYVAIALMFGVQAVDLRITYKKTGHYDAR 501
      *: * : : * : ** : ** * : : : : :
PcPAL RASLSPATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPIWND 683
AvPAL RIEECRSYP-LYKFVRKELG-----TEYLTGE 527
      * . . : ** : ** : * : * : :

```

Figura 8. Fragmente rezulate în urma alinierii de secvențe din *PcPAL* și *AvPAL*. Domeniile conservate de intersecție sunt marcate cu verde

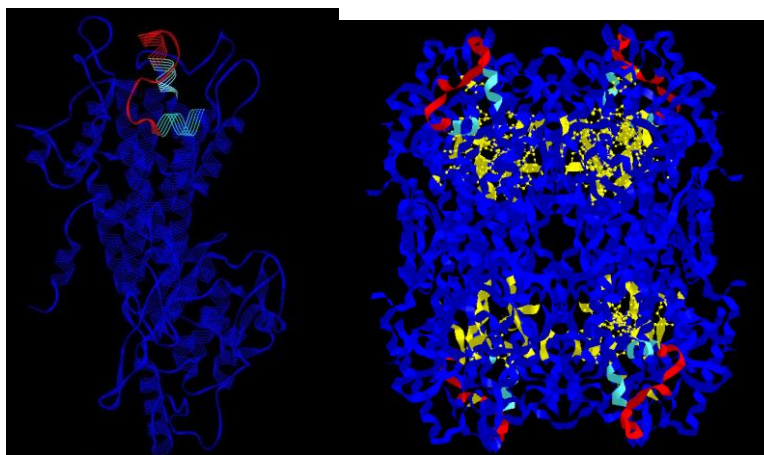
Astfel s-a trecut la evaluarea posibililor hibridi și s-au proiectat secvențele de aminoacizi pentru mutații *PcPAL*(domeniu catalitic)-*AvPAL*(domeniu shielding), *TcPAM*(dc)-*AvPAL*(ds), *RtPAL*(dc)-*AvPAL*(ds) și *AvPAL*(dc)-*PcPAL*(ds). Pentru cea din urmă se așteaptă o scădere a stabilității datorită asamblării domeniului catalitic procariotic din *AvPAL* și domeniului shielding puternic destabilizator din *PcPAL*. Secvența de aminoacizi pentru unul din monomerii din tetramerul hibrid *PcPAL*(dc)-*AvPAL*(ds) este redată în **Figura 9a**. În **Figura 9b, c** apar monomerul, respectiv tetramerul modelat al mutantului hibrid, unde cu albastru închis apare domeniul catalitic din *PcPAL*, cu albastru deschis domeniul de intersecție păstrat din *PcPAL*, cu roșu domeniul de shielding din *AvPAL*, iar cu galben serine care înlocuiesc cisteine singulare, neimplicate în legături disulfurice.

Designul genei și al plasmidei a decurs identic cu cele descrise anterior. Expresia și purificarea tuturor hibridurilor a fost realizată cu succes utilizând metoda anterior descrisă. Primele determinări de activitate și stabilitate sunt promițătoare; mai mult, hibridul mutant *PcPAL*(dc)-*AvPAL*(ds) acceptă ca substrat și analogi nenaturali ai fenilalaninei. Estimăm că până la sfârșitul anului vom realiza caracterizarea completă a activității și stabilității hibridurilor mutații.

```

MENGNGATTNGHVNNGMDFCMKTE
DPLYWGIAAEAMTGSGLDEVKKMVAE
YRKPVVKLGGETLTISQVA AISARDGSG
VTVELSEARAGVKASSDWVMDSMNK
GTDSYGVTTGFGATSHRRTKQGGALQK
ELIRFLNAGIFGNGSDNTLPHSATRAAM
LVRINTLQGYSGIRFEILEAITKFLNQNT
PCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRP
NSKAVGPTGVILSPEEAFKLAGVEGGFF
ELQPKEGLALVNGTAVGSGMASMVLFE
ANILAVLAEVMSAIFAEVMQ GKPEFTD
HLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSAY
VKAAQKLHEMDPLQPKQDRYALRTSP
QWLG PQIEVIRSSTKMIEREINSVNDNPL
IDVSRNKAIHGGNFQGTPIGVSM DNTL
AIAAIGKLMFAQFSELV NDFYNNGLPSN
LSGGRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQ
FLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISS
RKTSEAVEILKLMSTTFLVGLCQAIDLR
TYKKTGHYDARASLSPATERLYKFVRK
ELGTEYLTGEKVTSPGEEFEKVFIAMSK
GEIIDPLLESLESWNGAPLPIS

```



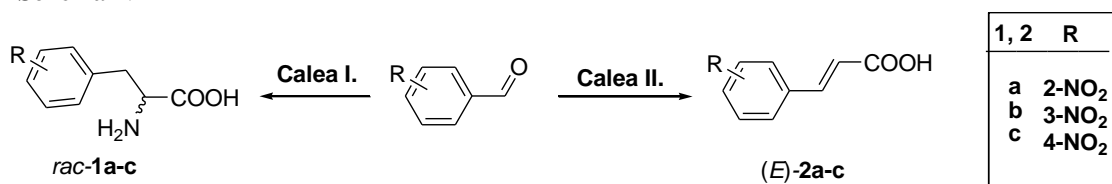
A

B

C

Figura 9. **A.** Structura primară a mutantului hibrid *PcPAL*(dc)-*AvPAL*(ds). **B.** Structura modelată a monomerului. **C.** Structura cuaternară a homotetramerului

În paralel s-a realizat un șir de experimente utilizând substraturi nenaturale nitrofenilalaninice cu wt-PcPAL cu stabilitate crescută în care cele 2 cisteine singulare (care nu sunt implicate în punți disulfurice) din domeniul shielding au fost schimbate cu serine. Mai mult, prin mutarea Ser143→Ala143, s-a creat un mutant în care formarea posttranslațională a grupării prostetice MIO devine imposibilă (PcPAL MIO deficitar). Sinteza substraturilor este redată în **Schema 2**.



Calea I. a. NaBH₄ / CH₃OH; b. SOCl₂/CH₂Cl₂, 0-5°C- r.t.; c. NaH, CH₃CONH(COOEt)₂ / DMF, 60°C; d. 18% HCl-dioxan 1:1 (V/V), reflux, 12h; **Calea II.** a. Ph₃P=CHCOOEt / toluen, reflux, 2 h; b. 10% KOH, reflux.

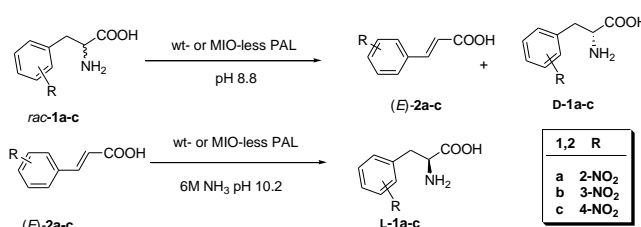
Schema 2. Sinteza nitrofenilalaninelor și a acrilatilor corespunzători

Măsurătorile cinetice cu wt-PcPAL și PcPAL-MIO deficitar au evidențiat pe de o parte faptul că wt-PcPAL poate media cu succes deaminarea tuturor nitrofenilalaninelor investigate, pe de altă parte faptul că lipsa grupării prostetice puternic electrophile în PcPAL MIO deficitar este contrabalansată de caracterul puternic electronoatrăgător al grupării nitro, astfel deaminarea acestor substraturi decurge cu parametri cinetici acceptabili dacă este mediată de PAL cu capacitate catalitică cvasi inexistentă în raport cu substratul său natural (**Schema 3**, Tabel 1).

Table 1. Constante cinetice pentru wt-PAL

Substrat	K_m (mM)	V_{max} % V_{max}^{Phe}	$\lambda_{\mu\alpha\xi}$ (nm)	Viteze relative	
				V_{max} wt-PAL / V_{max} PAL MIO-deficitar	
l-Phe	33.3	1	290	413	
rac-1a	268.1	0.57	243	244	
rac-1b	64.6	0.21	260	52	
rac-1c	295.5	0.86	340	411	

0.53 mg PAL/ml soluție; 26.5 mg PAL/probă



Schema 3. Sinteza la scară preparativă a ambilor enantiomeri nitrofenilalaninei

PcPAL stabilizat prin înlocuirea cisteinelor singulare cu serine, respectiv prin formarea punților disulfurice (expresie în Rosetta-gami *E. coli*), a permis investigarea interacțiunii substraturilor nitate cu mutantul MIO-deficitar, care pe lângă utilitatea practică a reacțiilor enzimice a folosit și la elucidarea mecanismului de interacțiune PAL-substrat [2].

RAPORT ȘTIINȚIFIC PE ANUL 2013

1. INTERACȚIA UNOR HETEROARILALANINE CU ENZIMELE PAL

Liazele sunt enzime care rup legăturile C-C, C-O, C-N, etc. prin eliminare, cu formarea unei legături duble sau a unui ciclu sau pot cataliza adăptia legăturilor duble. Amoniac liazele, care acționează asupra legăturii C-N, catalizează formarea prin eliminare de amoniac a unei legături α,β -nesaturate (Fig. 1.1).

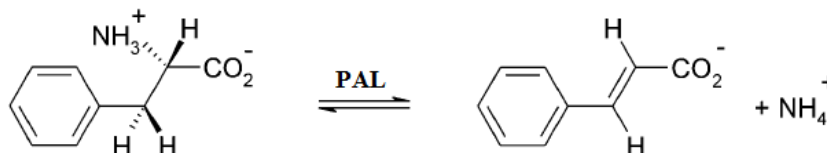


Figura 1.1. Reacția naturală catalizată de PAL

Sinteza aminoacizilor naturali și nenaturali în formă homochirală constituie o provocare a chimiei preparative. Spre exemplu, farmacoforii inhibitorilor proteazei, o clasa importantă de compuși farmaceutici care acționează împotriva virusului HIV, a citomegalovirusului, conțin în structura lor o entitate analoagă fenilalaninei.

În principiu, amoniac liazele pot fi folosite în acest sens în două moduri distincte:

1. Utilizarea reacției inverse stereoconstructive, adică adăptia amoniacului la un precursor nesaturat achiral cu formarea L-aminoacidului.

2. Utilizarea reacției stereodestructive de eliminare a amoniacului dintr-un amestec racemic al aminoacidului, cu obținerea D-enantiomerilor datorită transformării selective a enantiomerilor L din racemat. (**Figura. 1.2**).

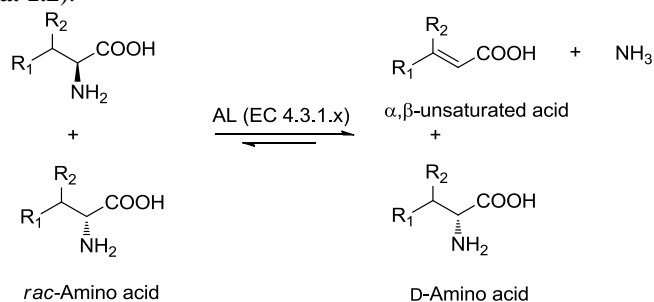
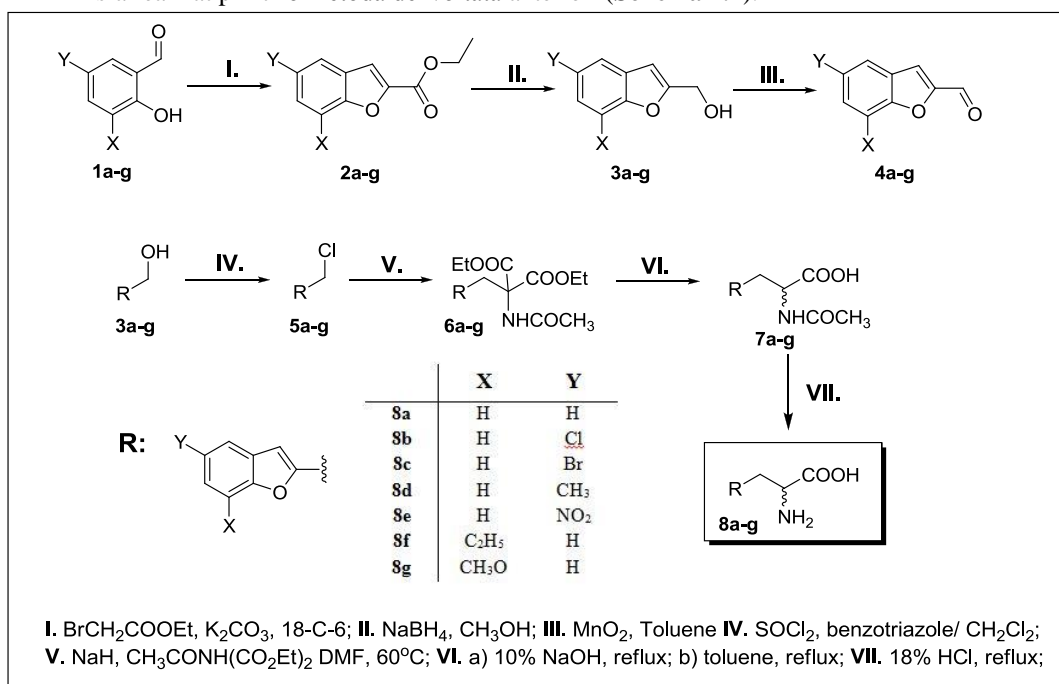


Figura. 1.2. Natura stereoconstructivă și stereodestructivă a amoniac liazelor

Sinteza chimică a acizilor 2-amino-3-(benzofuran-2-il) propionici

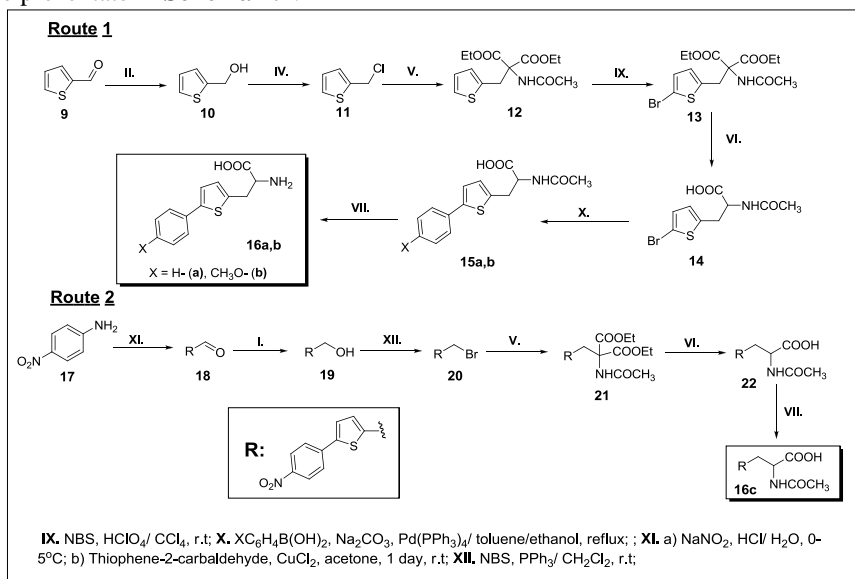
- s-a realizat printr-o metodă dezvoltată anterior (**Schema 1.1**).



Schema 1.1. Sinteza benzofuran-alaninelor

Sinteza chimică a acizilor 2-amino-3-(feniltiofen-2-il) propionici

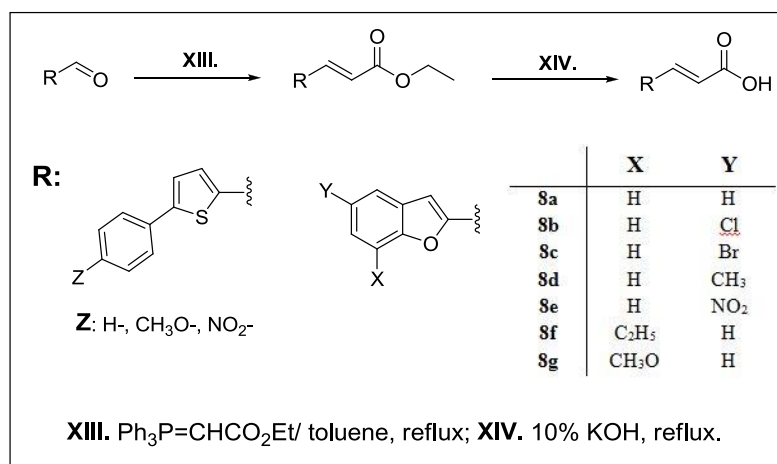
Sinteza feniltiofenalaninelor depinde de natura substituenților prezenți pe inelul furanic, în conformitate cu reacțiile prezentate în **Schema 1.2**.



Schema 1.2. Sinteza chimică a feniltiofenalaninelor

Sinteza chimică a (E)-5-feniltiofen-2-il- și (E)-5,7-benzofuran-2-il-acriilaților

- s-a realizat pornind de la aldehidele corespunzătoare, prin reacțiile prezentate în **Schema 1.3**.



Schema 1.3. Sinteza chimică a acizilor acrilici

Toți compușii sintetizați au fost purificați și caracterizați complet din punct de vedere spectral.

Determinarea constantelor cinetice pentru reacția enzimatică a heteroarilalaninelor Determinările cinetice au fost efectuate cu un spectrofotometru Agilent 8453 în cuve de 1 mL la 30°C prin înregistrarea absorbanțelor specifice, timp de 5 minute la interval de 1 minut pentru enzima PAL nativă (wt-PAL). În prealabil s-au determinat coeficienții de extincție (ϵ) ai acriilaților în tampon 0.1 M Tris (pH 8.8) la lungimi de undă (λ) la care aminoacidul corespunzător nu absoarbe (**Tabelul 1**). Datele calculate, viteza maximă (V_{max}) relativ la cea a derivatului nesubstituit și constanta Michaelis sunt prezentate în **Tabelul 1.1**.

Tabel 1.1. Datele cinetice ale wt-PAL (din *Petroselinum crispum*) la 30°C în prezența unor benzofuran-2-il-alanine

Nr.	Substrat	ϵ	λ (nm)	c_{WPCL} (μ g)	K_m (μ M)	V_{max} (μ M/s/ μ g)	V_{max}/V_{maxBF}
1	8a H-BF	19226	310	6.85	248	1.61E-02	1.000
2	8b 7Et-BF	21821	311	6.9	8000	2.90E-03	0.181
3	8c 7MeO-BF	32267	305	16.9	1770	2.96E-04	0.018
4	8d 5Me-BF	6318	311	28.68	133	1.48E-04	0.009
5	8f 5Br-BF	2180	310	9.64	882	2.92E-03	0.182
6	8e 5Cl-BF	15038	310	6.85	903	1.74E-04	0.011
7	8g 5NO ₂ -BF	405	400	14.5	3240	5.19E-03	0.323

Se pot observa viteze scăzute în cazul *rac*-8b-f, respectiv afinitatea acestor substraturi pentru wt-PAL (K_m) între 123-8000 mM. Cea mai redusă afinitate s-a determinat pentru *rac*-8b-c, g. Valoarea mare a K_m în cazul *rac*-1b-c substituit în poziția 7 a inelului benzofuranic demonstrează că apare un impediment steric la atașarea substratului în situsul catalitic al enzimei. Afinitatea enzimei pentru *rac*-8d-g care conțin substituenți în poziția 5, depinde de natura acestora, respectiv de efectele lor electronice.

Comparativ cu PAL din pătrunjel, PAL-urile din *Rhodosporidium toruloides* și *Anabaena variabilis* prezintă o toleranță mai redusă la alte substraturi, conform datelor din **Tabelele 1.2** și **1.3**.

Tabel 1.2. Datele cinetice ale enzimei PAL din *Rhodosporidium toruloides* la 30°C în prezența benzofuran-2-il-alaninelor

Nr.	Substrat	ϵ	λ (nm)	c_{WRTL} (μ g)	K_m (μ M)	V_{max}	V_{max}/V_{maxBF}
1	H-BF	19226	310	6.85	2670	8.0E-03	1.000
2	5Br-BF	21821	311	6.9	123	8.9E-04	0.111
3	7Et-BF	32267	305	16.9	22200	8.0E-04	0.100

Tabel 1.3. Datele cinetice ale enzimei PAL din *Anabaena variabilis* la 30°C în prezența benzofuran-2-il-alaninelor

Nr.	Substrat	ϵ	λ (nm)	c_{WAVL} (μ g)	K_m (μ M)	V_{max}	V_{max}/V_{maxBF}
1	H-BF	19226	310	6.85	101	7.6E-03	1.000
2	5Br-BF	21821	311	6.9	389	3.0E-02	3.947

A fost studiată influența temperaturii asupra interacțiunii fenil-tiofen-2-il-alaninelor cu PAL din pătrunjel și s-au obținut rezultate neașteptate, prezentate în **Tabelul 1.4** și **Diagrama 1.1**.

Tabel 1.4. Datele cinetice obținute în urma interacțiunii fenil-tiofen-2-il-alaninelor cu PAL din *Petroselinum crispum*

Nr.	Substrat	ϵ	λ (nm)	c_{WPCL} (μg)	K_m (μM)	V_{\max} ($\mu\text{M/s}$)	$V_{\max}/V_{\max FT}$
1	H-FT (30°C)	14691	338	51	97	0.0033	1
	H-FT (40°C)				35.9	0.0033	1
	H-FT (45°C)				221	0.01	3.03
	H-FT (50°C)				423	0.01	3.03
	H-FT (55°C)				85.9	0.016	4.85
	H-FT (60°C)				61	0.05	15.15
2	NO ₂ -FT (30C)	4005	290	43.2	181	0.1	1
	NO ₂ -FT (40C)				150	0.14	1.40
	NO ₂ -FT (45C)				170	0.2	2
	NO ₂ -FT (50C)				195	0.16	1.6
	NO ₂ -FT (55C)				134	0.25	2.50
	NO ₂ -FT (60C)				97	0.33	3.3
3	MeO-FT (60C)	120608	349	30	303	0.001	1

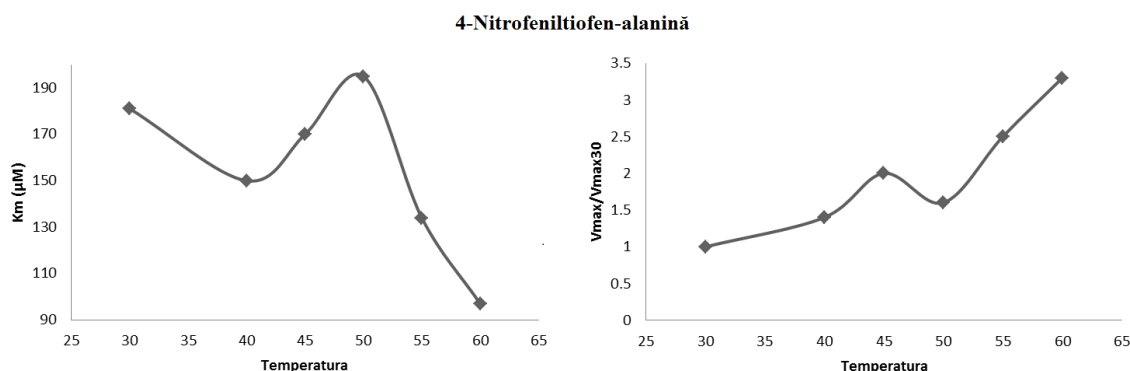


Diagrama 1.1. Variația K_m și $V_{\max}/V_{\max 30}$ cu temperatura

2. IMOBILIZAREA FENILALANINAMONIAC-LIAZEI (PAL) PE NANOTUBURI DE CARBON CU UN SINGUR PERETE (SWNT)

Pentru activarea nanotubului de carbon, 20 mg de SWNT-COOH a fost incubat timp de 5 ore sub agitare la 1350 rpm la temperatura camerei, în 3 mL de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidă clorhidrat 200 mM (EDAC) în soluție de tampon Tris (0.1M, pH 8.8).

După incubare, proba a fost filtrată și spălată cu soluție tampon Tris. La nanotubul astfel activat s-au adăugat 2 mg PAL într-un mililitru de soluție tampon, iar amestecul a fost supus agitării (1350 rpm) peste noapte la temperatura camerei.

După imobilizarea enzimei, proba a fost filtrată și spălată cu apă distilată (3×10 mL). Concentrația enzimei a fost măsurată la spectrofotometru atât în filtrat cât și în apa de spălare folosind metoda Bradford.

Pentru reacția de eliminare, 1 mL de acid 2-amino-3-(tiofen-2-il) propanoic 5 mM (în tampon Tris 0.1M, pH 8.8) a fost incubat cu 3 mg de enzimă imobilizată timp de 22 de ore, la temperatura camerei, la 150 rpm. După 22 de ore, amestecul de reacție a fost filtrat, iar filtratul obținut a fost concentrat. Enzima imobilizată a fost reutilizată, în aceleași condiții, de mai multe ori. Conversia reacțiilor nu s-a modificat semnificativ în urma reutilizării enzimei imobilizate.

În **Figura 2.1-2.2** sunt prezentate spectrele ¹H-RMN ale amestecurilor obținute, folosite pentru determinarea eficacității reacției.

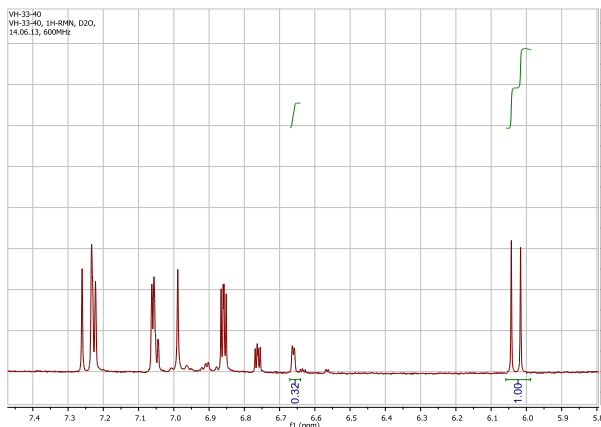


Figura 2.1. Spectrul ^1H RMN: reacția de adiție. 22 de ore, 40°C

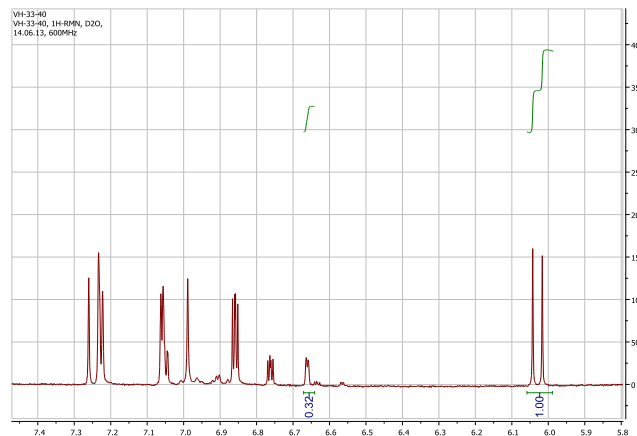


Figura 2.2. Spectrul ^1H RMN: reacția de adiție. 22 de ore, 50°C

Conversia depinde semnificativ de temperatură, conform datelor reprezentate în **Figura 2.3**. Astfel, se poate observa o scădere drastică a conversiei odată cu creșterea temperaturii la utilizarea enzimei imobilizate pe SWNT.

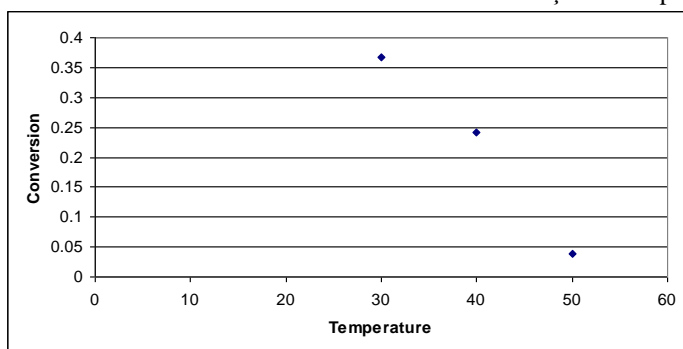
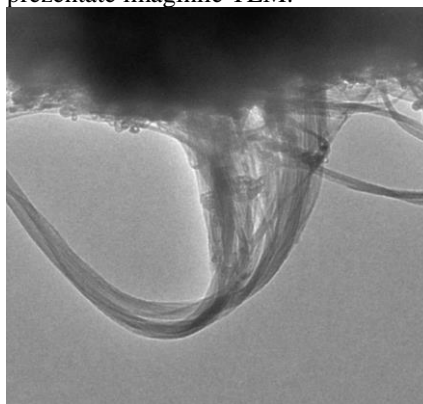
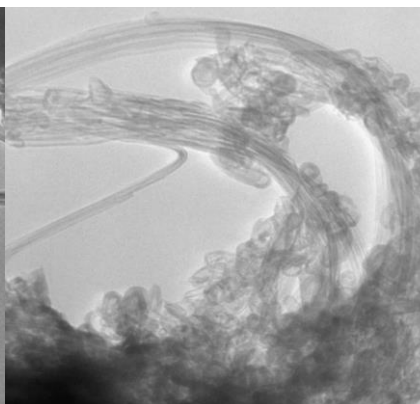


Figura 2.3. Variația conversiei în funcție de temperatură

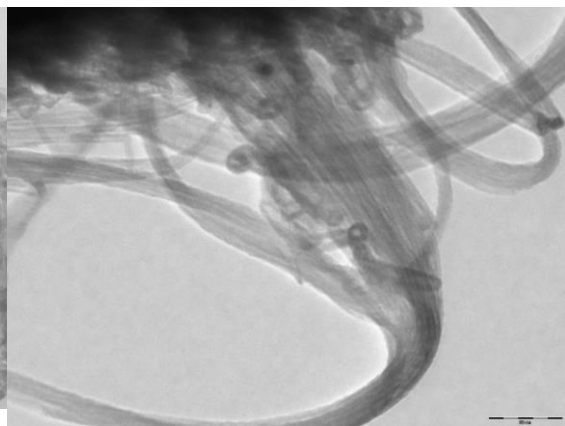
Pentru evidențierea structurii microscopice a enzimei și suportului folosit la imobilizare în **Figura 2.4** sunt prezentate imaginile TEM.



Imagine TEM după activarea nanotubului funcționalizat



Imagine TEM după imobilizarea enzimei



Imagine TEM după reacție

Figura 2.4. Imagini TEM utilizate în observarea procesului de imobilizare a PAL pe SWNT

3. OBTINEREA UNOR NOI BIOCATALIZATORI SELECTIVI: AGREGATE RETICULATE DE TIP BIS-EPOXIDIC

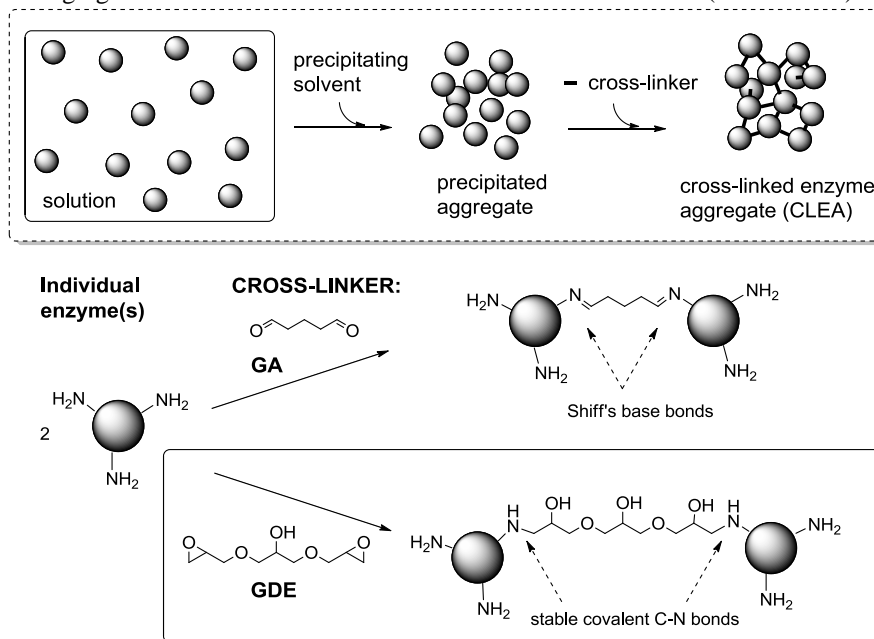
Agregatele de enzime reticulate (Cross-linked enzyme aggregates=CLEAs) se formează prin precipitarea lor într-un solvent, în absența oricărui suport, dar în prezența unui agent de reticulare cum ar fi glutaraldehida (GA). Optimizarea metodei de obținere presupune modificarea solventului sau a cantității de GA (cel mai adesea), dar și folosirea altor aldehide reticulante sau coimobilizarea cu o altă proteină ca de exemplu BSA.

Pe de altă parte, poliglicidileterii ca și glicerol-diglicidileterul (GDE) sau polietilenglicol-diglicidileterul (PEGDGE) sunt utilizați pe scară largă ca și aditivi pentru reticularea unor polimeri cu grupări aminice, hidroxilice sau carboxilice. Cu toate acestea ei nu au fost încă utilizați la obținerea CLEAs.

Studiul efectuat de noi a demonstrat pentru prima dată posibilitatea utilizării GDE ca și reticulant ieftin de tip bisepoxidic pentru obținerea CLEAs și a unor co-CLEAs a unor enzime în scopul utilizării lor ca și biocatalizatori cu proprietăți catalitice superioare.

Prepararea și morfologia unor CLEAs din lipaze și PAL

Au fost preparate agregate de enzime reticulate ale fenilalaninamoniac-liazelor (**Schema 3.1**).



Schema 3.1. Prepararea CLEAs

A fost comparată stabilitatea mecanică a diferitelor agregate. În **Figura 3.1**, este prezentată distribuția dimensiunii particulelor agregatelor de PAL după ultrasonare timp de 300 și 600 secunde.

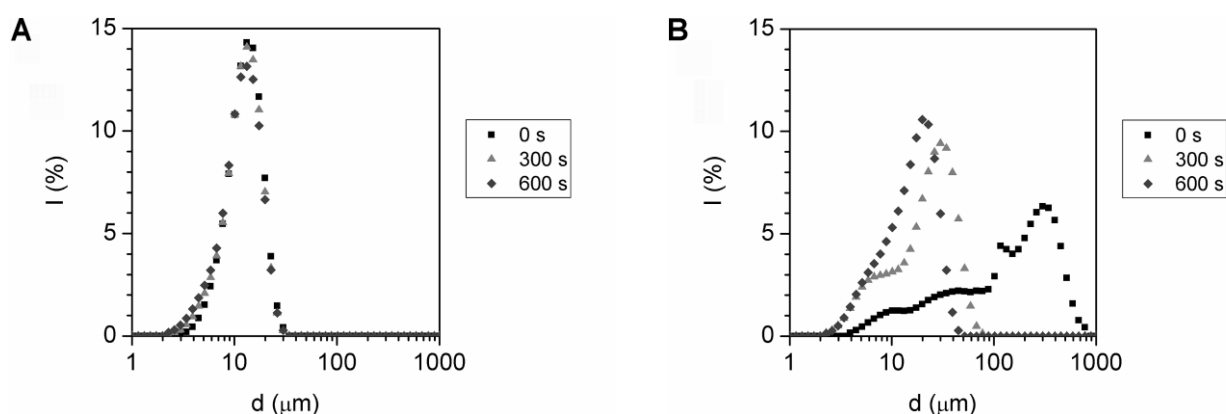


Figura 3.1. Modificarea distribuției dimensiunii particulelor agregatului de PAL obținut prin reticulare cu GDE (A) și GA (B) după ultrasonare timp de 300 și 600 s

Se observă că CLEAs obținute cu GDE prezintă o distribuție mai uniformă (cca 16 μm) și o rezistență superioară la ultrasonare în raport cu cele obținute cu GA (cu o dimensiune de cca. 19 μm). Prin compararea imaginilor SEM ale coagregatelor nereticulate PAL-BSA cu cele reticulate cu GDE și GA, se observă de asemenea diferențe remarcabile (**Figura 3.2**).

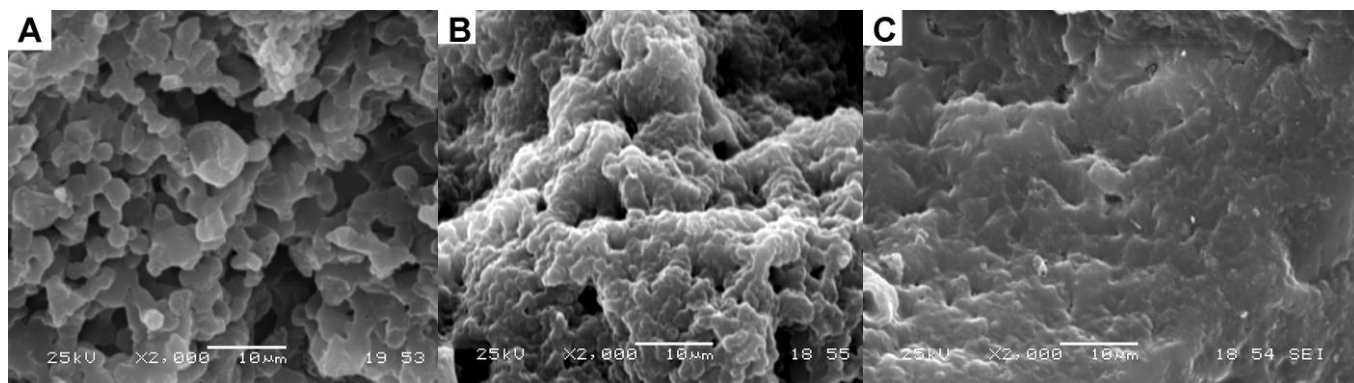
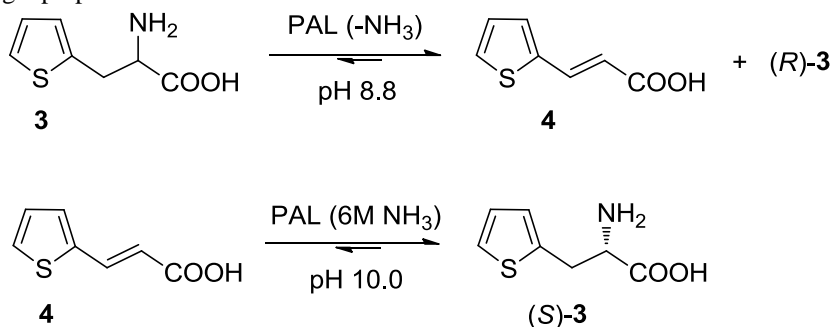


Figura 3.2. Imaginile SEM ale coprecipitatului PAL- BSA (A), PAL și BSA co-agregat și reticulat cu GDE (B) respectiv GA (C)

Pentru fiecare tip de enzimă a fost studiată eficiența catalitică (**Schema 3.2**) și s-a încercat corelarea acesteia cu morfologia preparatului enzimatic.



Schema 3.2. Biotransformări realizate cu biocatalizatorii preparați

Agregatele preparate cu PAL pur recombinant din *P. crispum* au fost testate în reacția de eliminare a amoniacului din tiofen-2-il-alanina racemic *rac*-**3**, reacția de eliminare fiind mai rapidă decât pentru substratul natural, L-Phe.

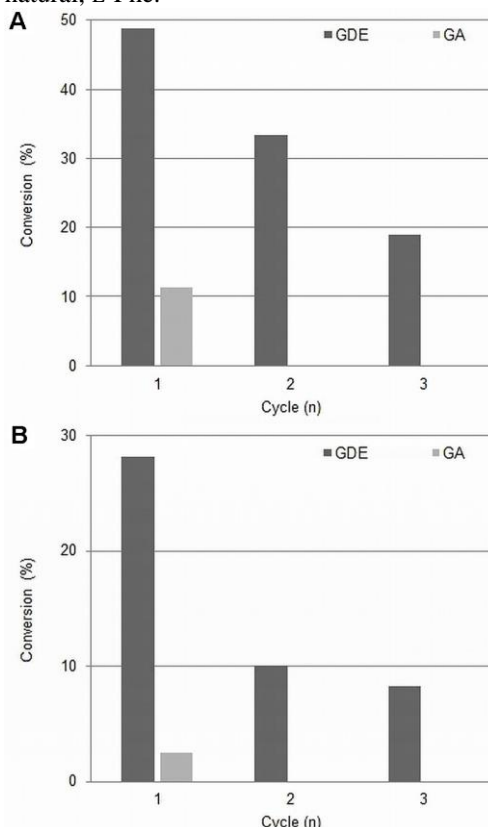


Figura 3.3. Recircularea coagregatului PAL-BSA reticulat cu GDE și GA în reacția de eliminare din *rac*-**3** (A) și în reacția de adiție la **4** (B) a amoniacului

Deși ambele tipuri de agregate s-au dovedit active pentru reacția de eliminare a amoniacului din L-Phe sau acid 2-amino-3-(tiofen-2-il)propionic *rac*-**3**, în reacția inversă de adiție toate au fost lipsite de activitate. În schimb coagregatele cu BSA reticulate atât cu GA cât și cu GDE au fost active atât în reacția de eliminare din **3** (**Figura 3.3A**) cât și în cea de adiție la **4** (**Figura 3.3B**).

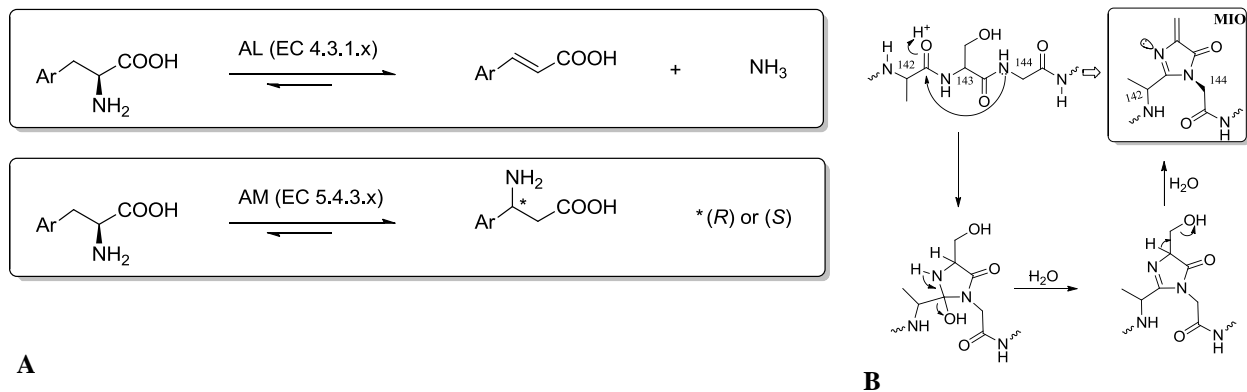
În ceea ce privește recircularea s-au observat o diferență mare între stabilitatea coagregatelor reticulate (**Figura 3.3**). Produsele obținute cu GDE ca agent de reticulare își mențin activitatea aproape nealterată chiar și după 3 recirculări, chiar și în mediu puternic bazic (**Figura 3.3B**; 6 M NH_3 , pH 10.0), în timp ce cele preparate cu GDE sunt complet inactivate chiar după prima utilizare.

Astfel putem afirma că reticularea cu GDE mărește nu doar stabilitatea mecanică, ci și cea operațională.

4. MODELAREA PRIN OMOLOGIE A AMONIACLIAZELOR ȘI 2,3-AMINOMUTAZELOR MIO-DEPENDENTE. COMPARAȚII MECANISTICE

Alături de amoniaciazele PAL și HAL, și 2,3-aminomutzele (PAM și TAM) care catalizează formarea selectivă a β -aminoacizilor (**Figura 4.1A**) conțin ca grupare prostetică 3,5-dihidro-5-metiliden-4*H*-imidazol-4-ona (MIO), un electofil puternic, format prin ciclizarea intramoleculară a unei tripeptide Ala-Ser-Gly (**Schema 4.1B**).

Banca de Date pentru Proteine (PDB) conține structurile determinate prin difracție de raze X a 10 enzime diferite în care a fost identificată această grupare prostetică: HAL din *Pseudomonas putida*, PAL din *Rhodospiridium toruloides*, *Petroselinum crispum*, *Anabaena variabilis* și *Nostoc punctiform*, TAL din *Rhodobacter sphaeroides*, TAM din *Streptomyces globisporus* și PAM din *Taxus canadensis*, *Taxus chinensis* și *Pantoea agglomerans*.



Schema 4.1. A. Schema reacțiilor catalizate de liaze (AL) și 2,3-mutaze (AM); **B.** Formarea grupării prostetice MIO commune enzimelor

Au fost analizate secvențele enzimelor alese, prezentate în **Tabelul 4.1**. Au fost comparate nu numai enzime care catalizează același tip de reacții, ci și enzime care catalizează reacții diferite. Analiza a condus la o serie de observații interesante. De exemplu, prin suprapunerea situsului activ al *PIHAL* și *AvPAL* (**Figura 4.1 A**) se observă că resturile Gln452 și Glu412 sunt localizate în aceeași poziție, aproape de Tyr314. Gln411 din *PIHAL* este în aceeași poziție ca și Asn451 în *AvPAL*.

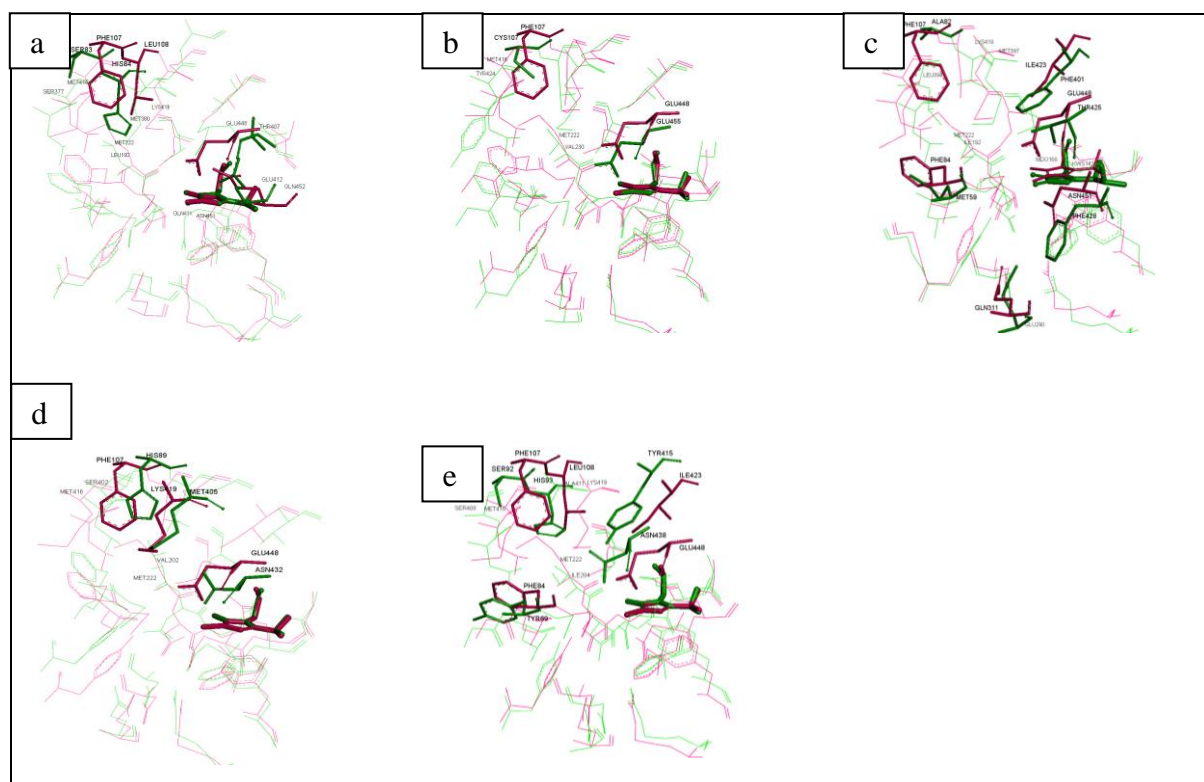


Figura 4.1. Situsul catalitic al amoniac-liazelor și amino-mutazelor aromatice (verde) comparativ cu situsul activ al *AvPAL* (3CZO, colorat în roz). **a.** Modelul de omologie al *PIHAL* **b.** Structura cristalină a *TcPAM* **c.** Modelul de omologie al *SpPAM* **d.** Structura cristalină a *RsTAL* **e.** Structura cristalină a *SgTAM*.

DISEMINAREA REZULTATELOR

s-a realizat prin participarea la manifestari stiintifice internationale si publicarea, respectiv trimiterea spre publicare a unor articole, dupa cum urmeaza:

ARTICOL PUBLICAT:

Tosa, M., Brem J., Mantu A., Irimie F.D., Paizs C., Retey J. : The interaction of nitro-phenylalanines with wild type and mutant (MIO-less) phenylalanine ammonia lyases, *ChemCatChem* **2013**, 5(3), 779-783.

ARTICOLE AFLATE IN EVALUARE:

1. Diána Weiser, Andrea Varga, Klaudia Kovács, Flóra Nagy, András Szilágyi, Beáta G. Vértessy, Csaba Paizs and László Poppe: Bis-Epoxyde Cross-Linked Enzyme Aggregates – Novel Immobilized Biocatalysts for Selective Biotransformations, *ChemCatChem*, in evaluare

2. Klaudia Kovács, Gergely Bánóczy, Andrea Varga, Izabella Szabó, András Holczinger, Gábor Hornyánszky, Imre Zagyva, Csaba Paizs*, Beáta G. Vértessy*, László Poppe* Expression and properties of the highly alkalophilic phenylalanine ammonia-lyase of thermophilic *Rubrobacter xylanophilus*, *Plos One* in evaluare

3. Zsófia Bata, Gergely Bánóczy, Klaudia Kovács, Beáta G. Vértessy, Csaba Paizs, László Poppe Homology modeling of mio-dependent ammonia- lyases and 2,3-aminomutases - mechanistic comparisons, *Enviromental Engineering and Management Journal*, in evaluare

CONFERINTE INTERNATIONALE:

1. Mantu Alexandra, Varga Andrea, Nagy Botond, Toşa Monica Ioana, Irimie Florin Dan, Paizs, Csaba: Expression and purification of various types of PAL and PAM, *13th Symposium and Summer School on Bioanalysis (13th ISSSB)*, 27-7 July 2013, Debrecen, Hungary (Poster)

2. Gergely Bánóczy, Zsófia Bata, Gábor Hornyánszky, Csaba Paizs, Ödön Farkas, László Poppe: Enzyme-substrate interactions in phenylalanine ammonia-lyases, *Biotrans 2013*, 21-25 July, Manchester Central, UK (Poster)

3. László Poppe, Sarolta Pilbák, Ödön Farkas, Klaudia Kovács, Gergely Bánóczy, Diána Weiser, Zoltán Boros, Beáta G. Vértessy, Csaba Paizs: MIO-containing ammonia-lyases and 2,3-aminomutases. Mechanism, immobilization and biotransformations in batch and continuous-flow systems, *Biotrans 2013*, 21-25 July, Manchester Central, UK (Invited lecture)

Conf. Dr. Ing. Paizs Csaba