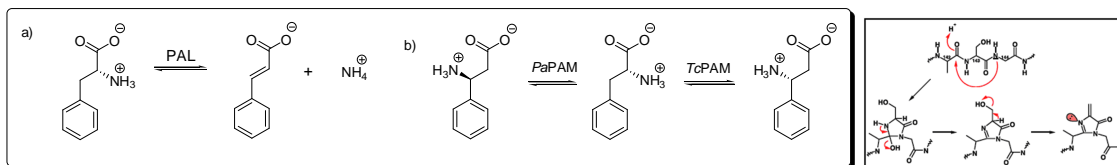


Raport științific pe anul 2012

Fenilalanin amoniac liazele (PAL; EC 4.1.3.24) catalizează deaminarea non-oxidativă a L-fenilalaninei în acid (*E*)-cinamic, iar fenilalanin 2,3-aminomutazele (EC 5.4.3.x) catalizează izomerizarea L-fenilalaninei la L- sau D-β-fenilalanine, în funcție de originea enzimei (Schema 1.). În timp ce PAL sunt frecvente în plante, unde au un rol esențial în formarea fenilpropanoidelor, au fost identificate până în prezent doar câteva PAL bacteriene. PAL și PAM sunt folosite ca biocatalizatori pentru sinteza L-α-amino acizilor din acrilăți (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 posttranslațională a grupării puternic electrophile MIO.

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

Inițial am exprimat în *E. coli* PAL din pătrunjel PcPAL (eucariotic) și PAL dintr-o bacterie termofilă *Rubrobacter xylanophilus* RxPAL radiotolerantă (NCBI cod: YP_644511.1, Uniprot cod: Q1AV79, care codifică 540 AA) cu creștere optimă la 65°C și am investigat proprietățile acestora.

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

Gena care codifică PAL provenită de la *Rubrobacter xylanophilus* 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 cromatografie Ni-NTA. Alte avantaje oferite de noul vector sunt reglarea exprimării și inducția dependentă de concentrație, care permite modularea nivelelor 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’-CCTGACGCTTTTTATCGCAACTC-3’ și respectiv 5’-GAGGCATCCTGGTACCCAG-3’).

După optimizarea expresiei, RxPAL a fost supraexprimată în *E. coli* TOP 10 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.

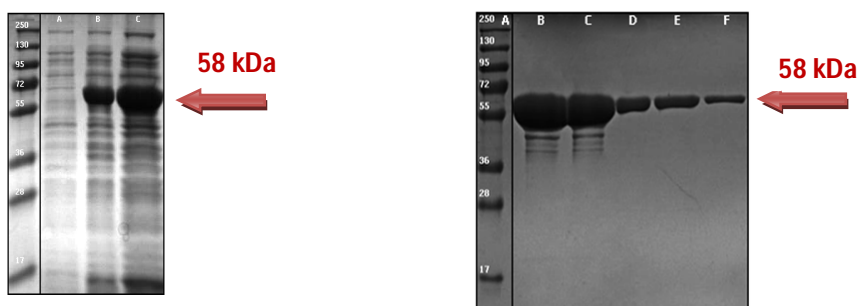


Figura 1. Verificarea exprimării (a) și purificării (b) proteinei fenilalanin amoniac-liaza *Rubrobacter xylanophilus* (RxPAL) în tulpina *E. coli* TOP10a. ProSieve™ QuadColor™ protein marker, 17 kDa – 250 kDa; A- cultură de celule înainte de inducție B- lizat bacterian; C-supernatant cu proteina recombinată.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

Activitatea enzimei a fost urmărită prin spectrofotometrie, la lungimea de undă de 290 nm, prin monitorizarea formării produsului ((*E*)-acid cinamic) din substratul natural, fenilalanina. În primul rând s-a pus accent pe determinarea pH-ului

optim al enzimei, măsurătorile au fost efectuate în soluții tampon păstrând tăria ionică și temperatura constantă, 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 observă două valori de pH optim, primul la 8.5, 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.

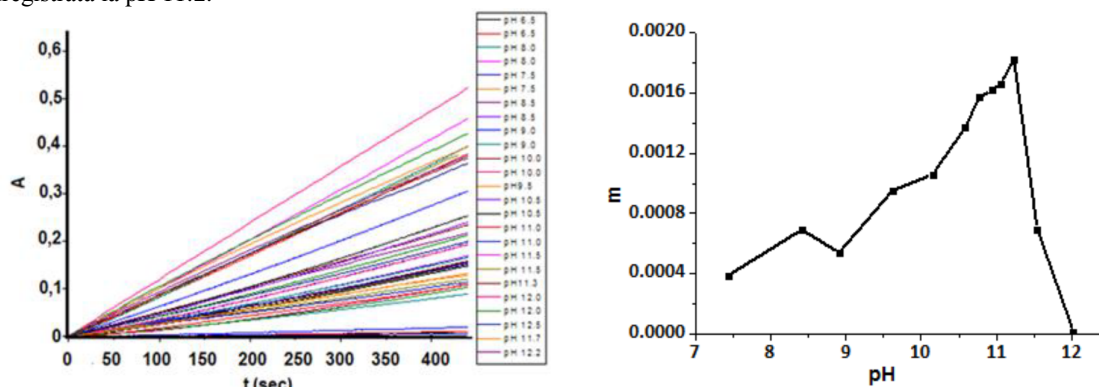


Figura 2. Profilul de activitate al RxPAL în condiții diferite de pH

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.

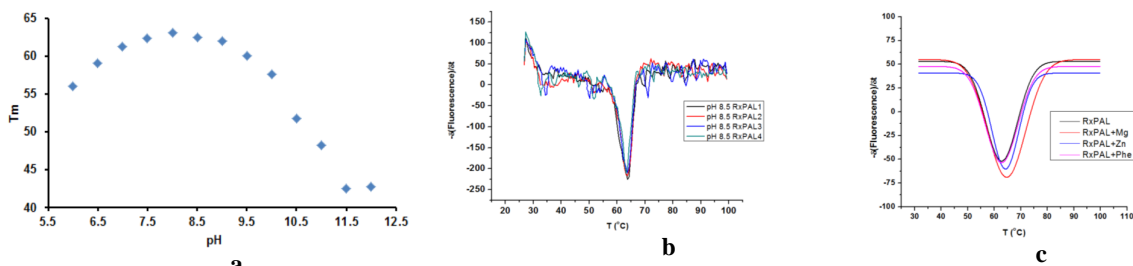


Figura 3. Profilul de temperatură de topire al RxPAL în condiții diferite de pH

Următoarele măsurători s-au făcut 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 citită din curba negativă a derivatei de gradul întâi a curbei 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 0.2μM mărește cu 1,4°C temperatura de topire a proteinei.

În scopul de a analiza **stabilitatea structurii enzimei** s-au efectuat măsurători de spectroscopie de dicroism circular DC în prezența produsului natural al reacției enzimatică, 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.

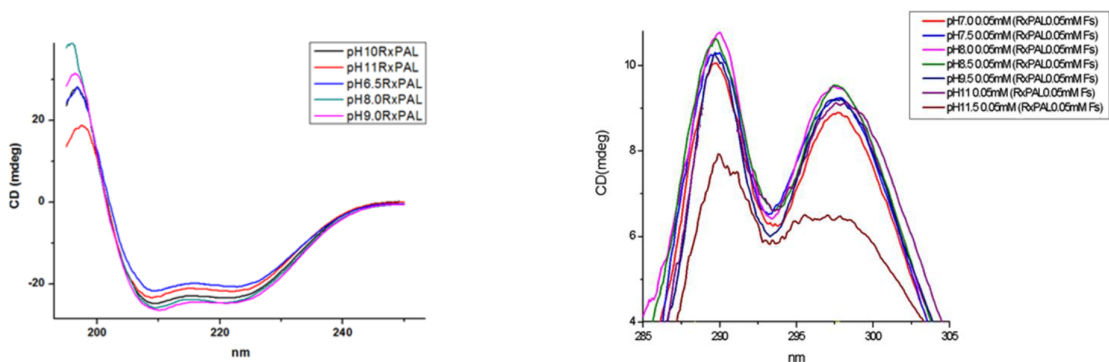


Figura 4. Spectrele de DC ale RxPAL în UV îndepărtat și UV apropiat la diferite valori ale pH-ului

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 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 electrofilă 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 [1].

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 30mM și k_{cat} 34s⁻¹, secondat de faptul că PcPAL s-a dovedit un biocatalizator util în biotransformarea analogilor nenaturali 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 eucariotic cu cei procarionici 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.

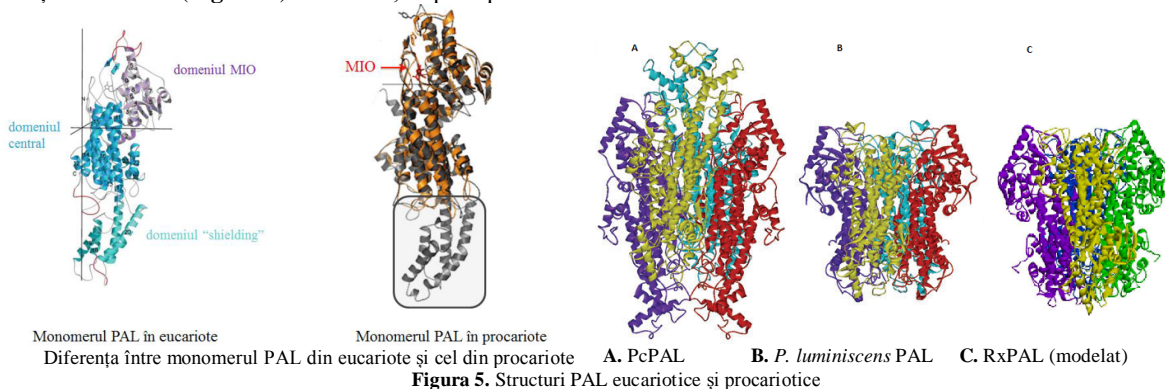


Figura 5. Structuri PAL eucariotice și procarionice

În privința termostabilității 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 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**).

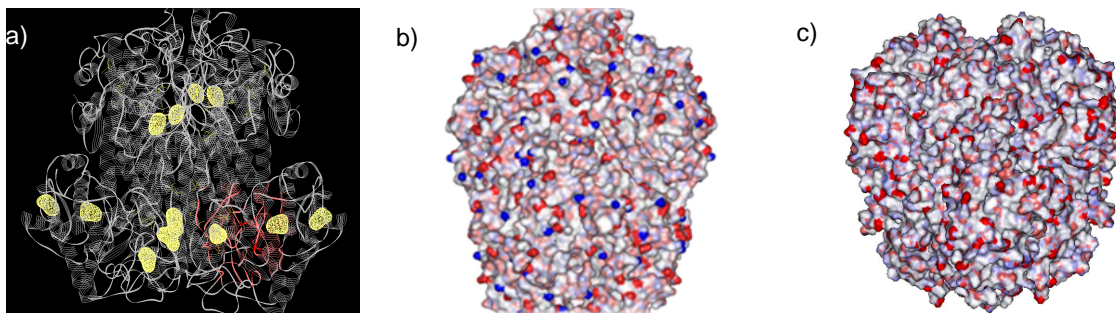


Figura 6 (a) Cisteinele proximale în structura RxPAL (domeni galbene) unul din cei patru situsuri catalitice marcat cu roșu. Modelul suprafețelor (b) PcPAL și (c) RxPAL. Resturi acide (roșu) cele bazeice (albastru). Sarcini izolate pentru PcPAL și distribuție omogenă de sarcini, dar acidă pe suprafața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

Deși posibilitatea de agregare a RxPAL a fost înlăturată, parametri 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* TOP 10 nu permite acest lucru, ne-am focusat la proiectarea genelor native exprimabile în vector pET19, compatibile cu celule competente *E. coli* RosettaGami care asistă posttranslațional la formarea punților disulfurice. Pe lângă genele PcPAL și RxPAL au fost comandate în vectorii de expresie pT19 o serie de fenilalanin amoniac liaze native ca cea din *Anabaena variabilis* (wt-AvPAL), *Streptomyces maritimus* (wt-SmPAL) și *Rhodospiridium toruloides* (wt-RtPAL), dar și fenilalanin amoniac 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 (cisteină schimbată cu serină marcat cu galben):

MENGGATTNGHVNGNGMDFCMKTEDPLYWGIAAEAMTGSHLDEVKKMVAEYRKPVVKLGGETLTISQVAAISARDGSGVTVELSEARAG
VKASSDWVMDSMNKGTDSYGVTTFGFGATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGIFGNGSDNTPHSA TRAAMLVRINTLQGYSGIRFEILEAITKFLN
QNTTPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPTGVILSPPEAFKLAGVEGGFFELQPKEGLALVNGTAVGSGMASMVLFEANILAVLA
EVMSAIFAEVMQGGKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSA YV KAAQKLHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGPIQIEVIRSSTKMIEREI
NSVNDNPLIDVSRNKAIHGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLA
NPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTSEAVEILKLMSTTFVGLCQAIDLRHLEENLKSTVKNTVSSVAKRVLTMGVNGLHPSRFCEKDLLR
VVDREYIFAYIDDPCSATYPLMQKLRQTLVEHALKNGDNERNLSTSIQKIATFEDELKALLPKEVESARAALESGNPAIPNRIECSRYPYK FVR
KELGTEYLTGEKVTSPGEEFEKVFIAASKGEIIDPLLESLESWNGAPLPIS

Plasmidele pET 19 conțin o secvență His6-tag N-terminală cu un site de clivare cu enterokinază, o genă rezistentă la ampicilină, un promotor T7lac și genele PAL, respectiv PAM. Expresiile induse cu IPTG în *E. coli* RosettaGami au decurs cu randamente bune, la purificarea proteinelor prin cromatografie Ni-NTA eluția decurgând cu o soluție de histidină 50 mM. În Figura 7 sunt redată harta genetică a plasmidelor și electroforegrama din diversele fracții obținute după ruperea peretelui celular, respectiv elfuenți de la purificarea cromatografică.

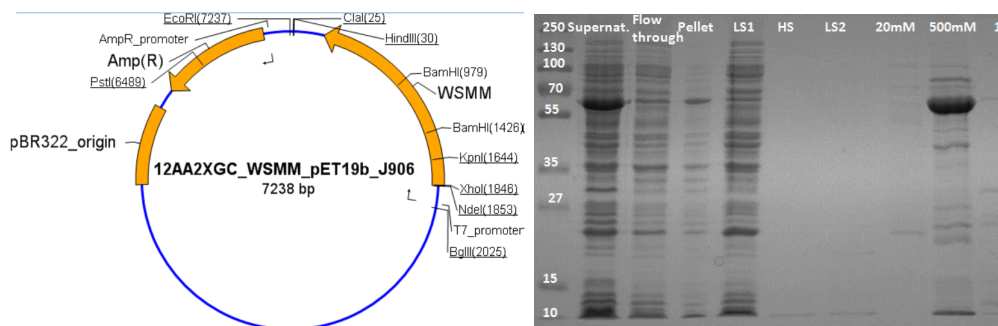


Figura 7. Harta genetică a plasmidei pentru producerea wt-PaPAM și electroforegrama ce certifică expresia și puritatea enzimei în diversele stagii de purificare.

Liazele și mutazele astfel obținute au prezentat parametri catalitici asemănătoare 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} $0.5s^{-1}$, dar din păcate aceste valori nu sunt suficiente de promițătoare pentru a califica această enzimă în rândul biocatalizatorilor utili la scară preparativă. Stabilitatea enzimelor eucariote 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 catalitic, pe când enzimele eucariote sunt instabile structural, dar cu o capacitate biocatalitică însemnată.

În continuare s-a trecut la proiectarea unor mutații hibridi, imbinând domeniul catalitic al enzimelor eucariote cu domeniul shielding al enzimelor procariote, în speranța producerii unor enzime stabile și eficiente 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 interacție 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**).

```

PcPAL VEILKLMSTTFLVGLCQAIDLRHLEENLKSTVK 537
AvPAL VDIFQNYVAIALMFGVQAVDLRITYKKTGHYDAR 601
      *..: :*: **..** : : : :
PcPAL RASLSPATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWNND 683
AvPAL RIEECRYP-LYKFVRKELG-----TEYLTGE 527
      *..: **..** :* * : :

```

Figura 8. Părți din alinierea de secvențe din PcPAL și AvPAL. Domeniile conservate de intersecție sunt marcate cu verde

Astfel s-a trecut la evaluarea posibilităților 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 acesta din urmă se așteaptă o scădere a stabilității fin asamblate domeniul catalitic procariotic din AvPAL și domeniul 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 și cu galben serine ce 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 mutanți.

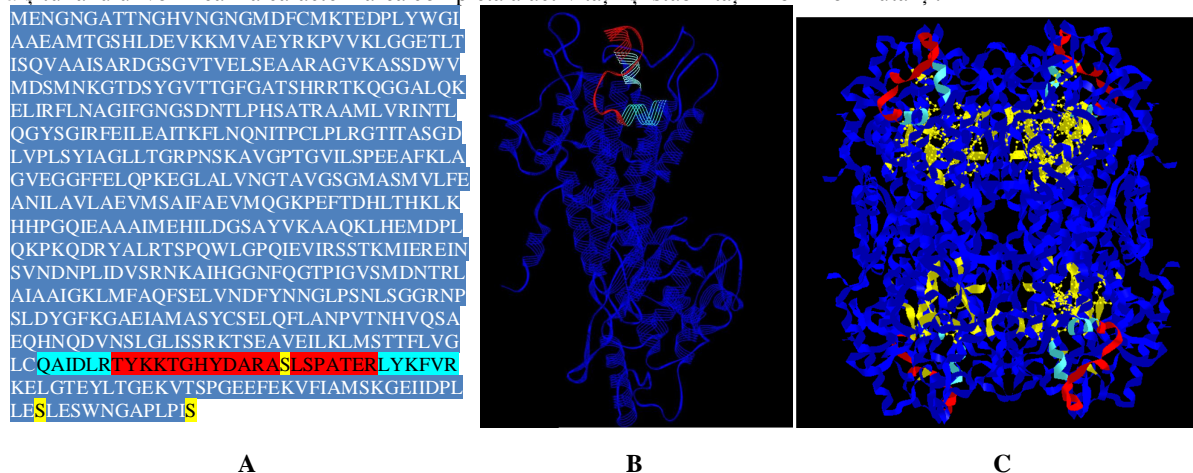
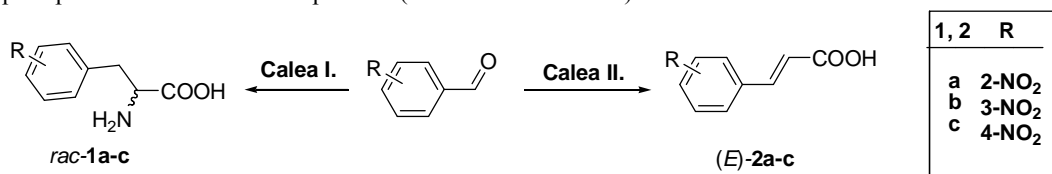


Figura 9. A. Structura primară al mutantului hibrid PcPAL(dc)-AvPAL(ds). B. Structura modelată al monomerului. C. Structura cuaternară al homotetramerului

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 serinie. 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.

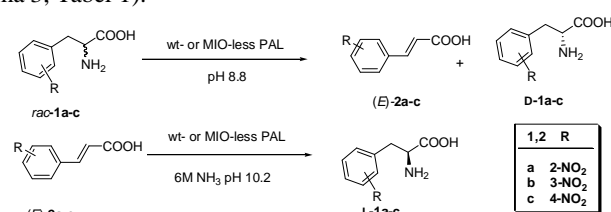
Schema 2. Sinteza nitrofenilalaninelor și a acriilaților corespunzători

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 electrofile în PcPAL MIO deficitar este contrabalansată de caracterul puternic electronatrăgător al grupării nitro, astfel deaminarea acestor substraturi decurge cu parametri cinetici acceptabili dacă este mediată de PAL cu capacitate catalitică quasi 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} | λ_{max} (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 enantiomerilor nitrofenilalaninelor

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

1. K. Kovács, G. Bánóczy, A. Varga, I. Szabó, A. Holczinger, G. Hornyánszky, I. Zagyva, Cs Paizs*, B. Vértessy*, László Poppe* Expression and properties of the highly alkalophilic phenylalanine ammonia-lyase of the thermophilic *Rubrobacter xylanophilus* Extremophiles (trimis spre publicare)

2. Toşa, M. I., Brem, J., Mantu, A., Irímie, F. D. Paizs, C.,* Rétey, J.* The Interaction of Nitro-phenylalanines with Wild Type and Mutant (MIO-less) Phenylalanine Ammonia-Lyase ChemCatChem (acceptat)

CONF. DR. ING. PAIZS CSABA