



**UNIVERSITATEA BABEŞ-BOLYAI
CLUJ-NAPOCA**

Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică



Fenilalanin amoniac-liaze și 2,3- aminomutaze în reacții biocatalitice stereoselective

Rezumatul tezei de doctorat

Student doctorand: Andrea Varga

Conducător științific: Prof. Habil. Dr. Ing. Csaba Paizs

**Cluj-Napoca
2016**



UNIVERSITATEA BABEŞ-BOLYAI
CLUJ-NAPOCA



Facultatea de Chimie și Inginerie
Chimică

Fenilalanin amoniac-liaze și 2,3-aminomutaze în reacții biocatalitice stereoselective

Rezumatul tezei de doctorat

Comisie:

Președinte: Prof. Dr. Ion Grosu – Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca

Conducător științific: Prof. Habil. Dr. Ing. Csaba Paizs – Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca

Referenți: Dr. Mihai Ciubotaru (CSI cercetător științific gradul I)- Institutul Național de Cercetare -Dezvoltare pentru Fizică și Inginerie Nucleară "Horia Hulubei" (IFIN-HH), București

Prof. Dr. Ing. Ștefan Eugen Szedlacsek – Institutul de Biochimie al Academiei Române, București

Conf. Dr. Niculina Hădade – Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca

Susținere publică: Ianuarie 2016

Cuprins

Capitolul I. Introducere generală	10
Studiu de literatură	11
I. 1. Amoniac-liazele	11
I. 2. Structurile fenilalanin amoniac-liazei și fenilalanin 2,3-aminomutazei	14
I. 3. Mecanismul de reacție	21
I. 4. Aplicații ale PAL și PAM	23
Obiectivele studiului.....	26
Capitolul II. Exprimarea și caracterizarea fenilalanin amoniac-liazei din bacteria termofilă <i>Rubrobacter xylophilus</i> (RxPAL).....	27
II. 1. Introducere.....	27
II. 2. Rezultate și discuție	27
II. 3. Concluzii.....	35
Capitolul III. Sinteze biocatalitice mediate de <i>PcPAL</i> și <i>PaPAM</i>	36
III. 1. Investigarea stereoselectivității enzimei <i>PcPAL</i> în condiții neconvenționale	36
III. 1.1. Introducere	36
III. 1.2. Rezultate și discuție.....	36
III. 1.3. Concluzii	40
III. 2. Dezvoltarea unei noi metode pentru imobilizarea <i>PcPAL</i> – Agregate enzimatiche reticulate de tip bis-epoxidic (CLEA).....	40
III. 2.1. Introducere	40
III. 2.2. Rezultate și discuție.....	41
III. 2.3. Concluzii	24
III. 3. Biotransformări catalizate de fenilalanin 2,3-aminomutaza din <i>Pantoea agglomerans</i> (<i>PaPAM</i>)	24
III. 3.1. Introducere	24
III. 3.2. Rezultate și discuție.....	46
III. 3.3. Concluzii	48
Capitolul IV. Concluzii Generale.....	53
Capitolul V. Materiale și Metode	56
Mulțumiri.....	80
Lista de publicații.....	82
Referințe.....	34

Capitolul I. Introducere generală

În ultimii ani, utilizarea enzimelor drept biocatalizatori pentru prepararea de noi compuși a primit tot mai multă atenție și și-a găsit aplicații în diverse domenii, cu precădere în sinteza produselor farmaceutici și a produselor de sinteză organică fină.¹

Avantajele majore ale utilizării enzimelor în transformările biocatalitice sunt datorate chemo-, regio- și stereospecificității, precum și condițiilor blânde de reacție.²

Datorită faptului că enzimele sunt compatibile între ele, în același recipient pot avea loc mai multe reacții biocatalitice, în cascadă. Astfel, pentru a simplifica procesele, reacțiile secvențiale sunt fezabile dacă se folosesc sisteme multienzimatică.³ Enzimele, ca orice catalizator, scad nivelul energiei de activare, măbind simțitor viteza de reacție în comparație cu vitezele reacțiilor necatalizate.⁴

Enzimele acceptă o gamă largă de substraturi și catalizează mai multe tipuri de reacții, ele fiind biocatalizatori interesați din punctul de vedere al capacității de transformare a unei game largi de substraturi.⁵

În industria chimică sau farmaceutică biocataliza a devenit metoda preferată pentru prepararea unor molecule chirale. Aminoacizii, aminoalcoolii, aminele și alcoolii enantiomeric puri reprezintă clase de compuși de o importanță deosebită pentru sinteza multor produse farmaceutici și agrochimicale optic active. Mai mult, α - și β -aminoacizii optic activi sunt intermediari importanți în sinteza unei game largi de produse naturali bioactivi, inclusiv medicamente. În vederea sintezei α - și β -aminoacizilor optic puri, a fost explorată o cale enzimatică alternativă care utilizează amoniac-liazele (AL) și 2,3-aminomutazele (AM).

Această teză își propune să descrie izolarea, caracterizarea și aplicațiile fenilalanin amoniac-liazelor (PALs) și a fenilalanin 2,3-aminomutazelor (PAMs) ca și biocatalizatori ai reacțiilor stereoselective.

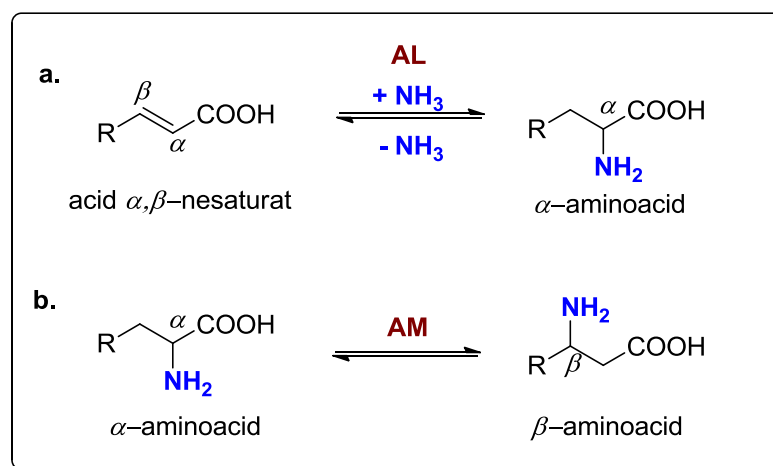
Studiu de literatură

I. 1. Amoniac-liazele

Liazele (EC 4) sunt definite ca fiind enzime ce catalizează scindarea diferitor legături chimice (C-C, C-O, C-N) prin alte mijloace decât hidroliză și oxidare, formând o legătură dublă sau adăugând diferite grupări la legăturile duble. În majoritatea cazurilor, produșii sunt molecule nesaturate. Liazele utilizează o gamă largă de grupări prostetice, care include: coenzima B-12, dipirometan, piridoxal-fosfat sau 3,5-dihidro-5-metiliden-4*H*-imidazol-4-ona (MIO).⁶

Amoniac-liazele catalizează dezaminarea non-oxidativă reversibilă a α -aminoacizilor aromatici, cu obținerea acizilor *trans*- α , β -nesaturați și a amoniacului (**Schema 1a**).⁷

În unele cazuri, eliminarea este urmată imediat de adăuție, astfel că, per ansamblu, reacția pare a fi una de substituție. Chiar dacă există dovada unui intermediar nesaturat, enzima este clasificată în clasa liazelor. Liazele intramoleculare reprezintă un grup mic de enzime, clasificate ca fiind izomeraze (EC 5), inclusiv aminomutazele.⁸ Familia amoniac-liazelor prezintă o similaritate mare cu 2,3-aminomutazele. Aminomutazele catalizează izomerizarea α -aminoacizilor la β -aminoacizi (**Schema 1b**).



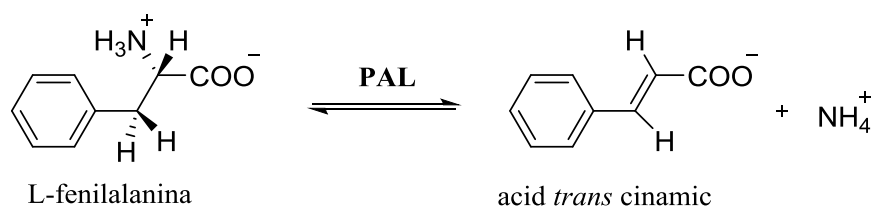
Schema 1. a. Reacția catalizată de amoniac-liaze. **b.** Reacția catalizată de 2,3-aminomutaze.

AM și AL sunt membri ai familiei clasei I de liaze, care include fenilalanin amoniac-liazele (PAL), tirozin amoniac-liazele (TAL)⁹, histidin amoniac-liazele (HAL)¹⁰, tirozin 2,3-aminomutazele (TAM)¹¹, fenilalanin 2,3-aminomutazele (PAM). Toate aceste enzime se bazează pe un cofactor, derivat din proteină, 3,5-dihidro-5-metiliden-4*H*-imidazol-4-ona

(MIO), generat autocatalitic din trei resturi ai situsului activ: Ala/Thr-Ser-Gly, care formează motivul MIO.¹²

I. 1.1. Fenilalanin amoniac-liaza (PAL)

Fenilalanin amoniac-liaza catalizează eliminarea non-oxidativă a amoniacului din L-fenilalanină (**Schema 2.**), obținându-se acidul *trans*-cinamic.



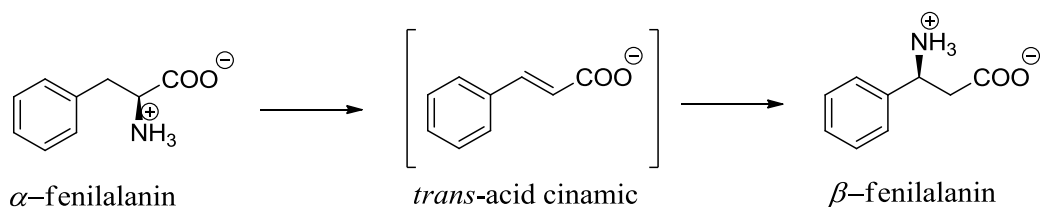
Schema 2. Dezaminarea L-fenilalaninei catalizată de PAL

Enzimele PAL sunt răspândite în plante și reprezintă prima enzimă din calea biosintetică a fenilpropanoidelor. Acidul *trans*-cinamic este un intermediar important în biosinteza mai multor fenilpropanoide, cum sunt: lignina, flavonoidele și cumarinele.¹³

Ele sunt găsite de asemenea în ciuperci, în schimb în bacterii sunt foarte rar întâlnite. Lipsa PAL în bacterii poate fi explicată prin faptul că fenilpropanoidele nu sunt des întâlnite în aceste organisme.

I. 1.2. Fenilalanin 2,3-aminomutaze (PAM)

2,3-aminomutaze diferă de amoniac-liaze prin faptul că ele elimină gruparea amino din α -fenilalanina naturală, pentru a produce β -fenilalanină via intermediarul *trans*-cinamic (**Schema 3.**)¹⁴



Schema 3. Reacțiile de izomerizare ale α -fenilalaninei la β -fenilalanină, catalizate de PAM

Această transformare are aplicații industriale importante, în producția derivaților chirali ai fenilalaninei,¹⁵ precum și în producția compușilor farmaceutici, cum este medicamentul împotriva cancerului Taxol¹⁶ și antibioticul Andrimid.¹⁷

I. 2. Structurile fenilalanin amoniac-liazei și fenilalanin 2,3-aminomutazei

Enzimele PAL sunt proteine homotetramerice care conțin patru subunități monomerice identice,¹⁸ interconectate între ele.¹⁹ Homotetramerul conține patru situsuri active, cu trei monomeri diferiți care participă la formarea fiecărui situs catalitic.¹⁸

Amoniac-liazele sunt proteine formate predominant din α -helixuri, fiecare monomer fiind subdivizat în trei domenii. Primul este domeniul catalitic MIO, care conține gruparea prostetică MIO. Al doilea domeniu este domeniul central, iar al treilea domeniu este cunoscut ca “domeniul de ecranare”. Aceste domenii sunt conectate prin bucle mobile.

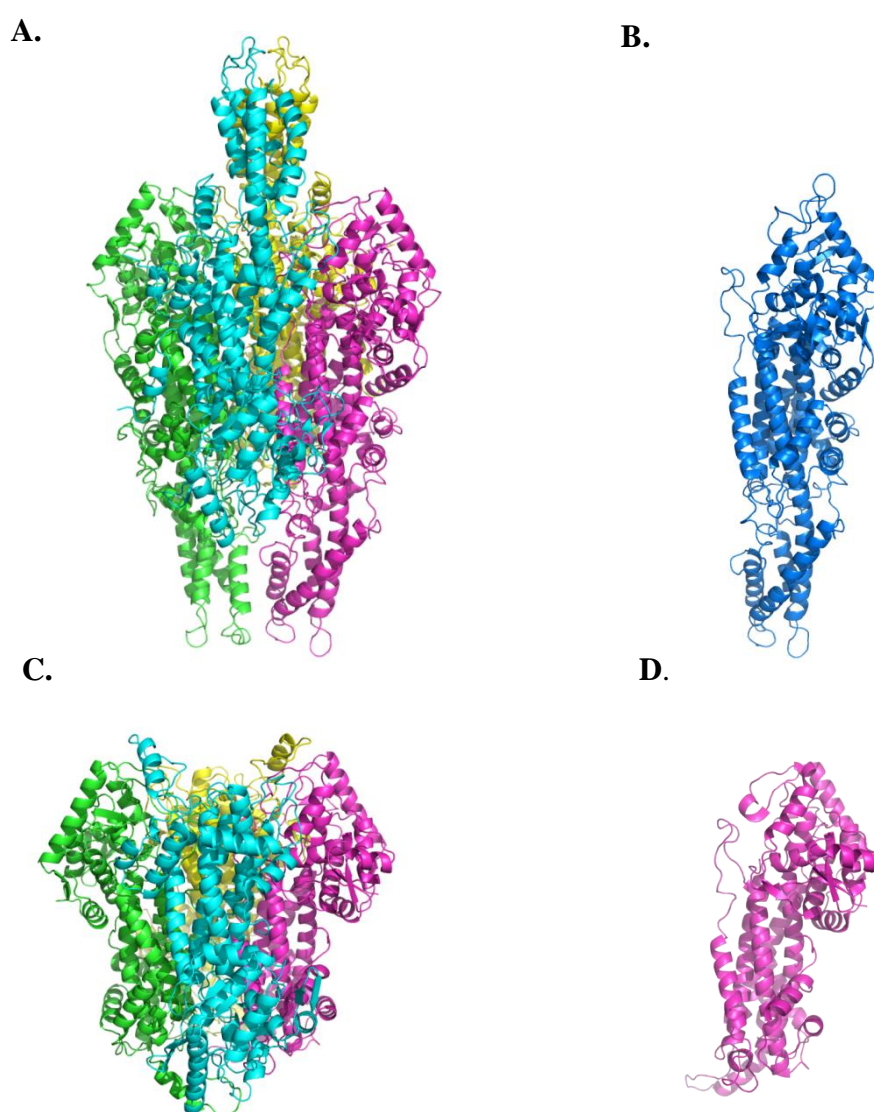


Figura 1. Structurile fenilalanin-amoniac-liazei din *Petroselinum crispum* (*PcPAL*) și fenilalanin 2,3-aminomutazei din *Pantoea agglomerans* (*PaPAM*). **A.** structura tetramerică a *PcPAL*, **B.** structura monomerică a *PcPAL*, **C.** structura tetramerică a *PaPAM*, **D.** structura monomerică a *PaPAM*

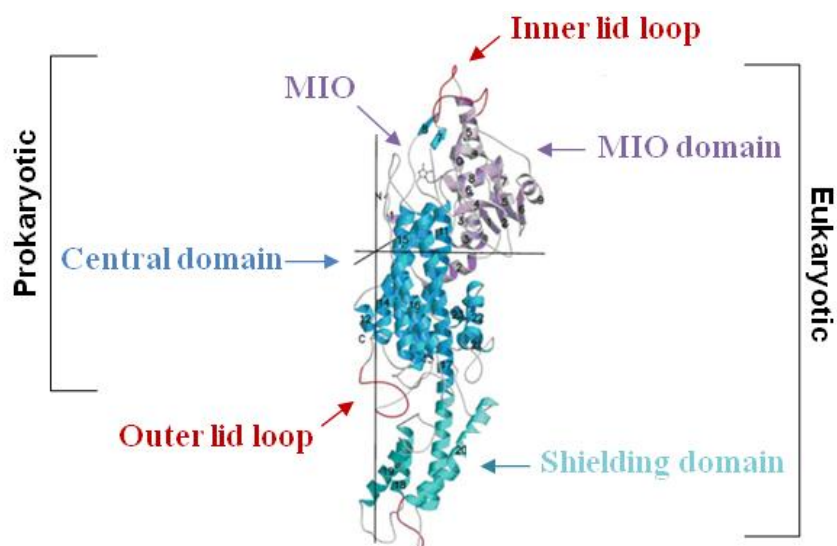


Figura 2. Structura monomerică a PAL. Structurile eucariote vs. procariote cu cele trei domenii: **albastru închis** – domeniu central, **albastru deschis** – domeniul de ecranare, **mov** - domeniul MIO și **roșu** – bucle mobile (buclele capacului interior și ale capacului exterior)

Studiile de structură asupra enzimelor PAL au arătat o diferență caracteristică între PAL de origine procariotă^{20,21} și cea de origine eucariotă¹⁸ (la fel pentru PAM). La plante și la drojzii, PAL conțin un domeniu multihelix C-terminal de aproximativ 120 de resturi (domeniul de ecranare), care e absent la enzimele PAL bacteriene.

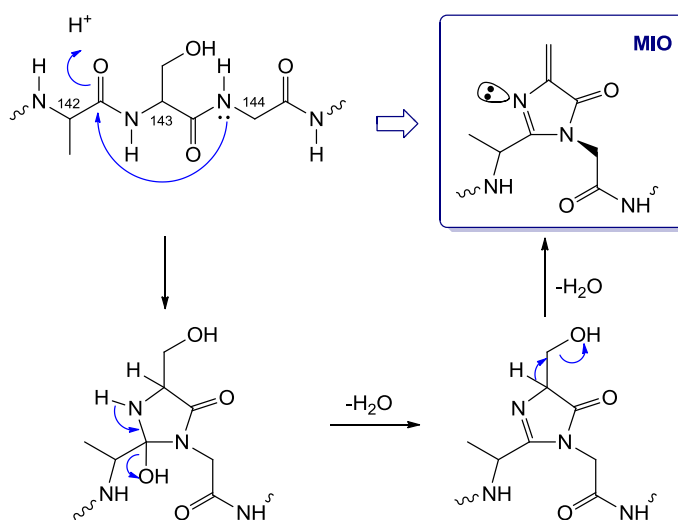
Enzimele fenilalanin 2,3-aminomutazice au o structură similară cu fenilalanin amoniac-liazele.

I. 2.1. Gruparea electrofilă MIO

În urma determinării structurii cristaline a histidin amoniac-liazei²¹ din *Pseudomonas putida* s-a stabilit că amoniac-liazele și 2,3-aminomutazele posedă un cofactor modificat la situsul activ, o grupare electrofilă numită 3,5-dihidro-5-metiliden-4H-imidazol-4-ona (MIO).²¹

Hanson și Havir (1970) au sugerat, că electrofilul este obținut prin deshidratarea posttranslațională a unui rest de serină, formându-se o dehidroalanină.²² În una dintre cele mai bine caracterizate amoniac-liaze, cea care provine din bacteria *Pseudomonas putida* (*PpHAL*), a fost identificat pentru prima dată cofactorul MIO prin difracția de raze X a acestei enzime, rezolvată în 1999 de către Schwede și colab., ceea ce a permis descoperirea faptului că nu dehidroalanina, ci o grupare prostetică 3,5-dihidro-5-metiliden-4H-imidazol-4-ona (MIO) este gruparea electrofilă cu importanță catalitică.²³ MIO este format prin ciclizarea

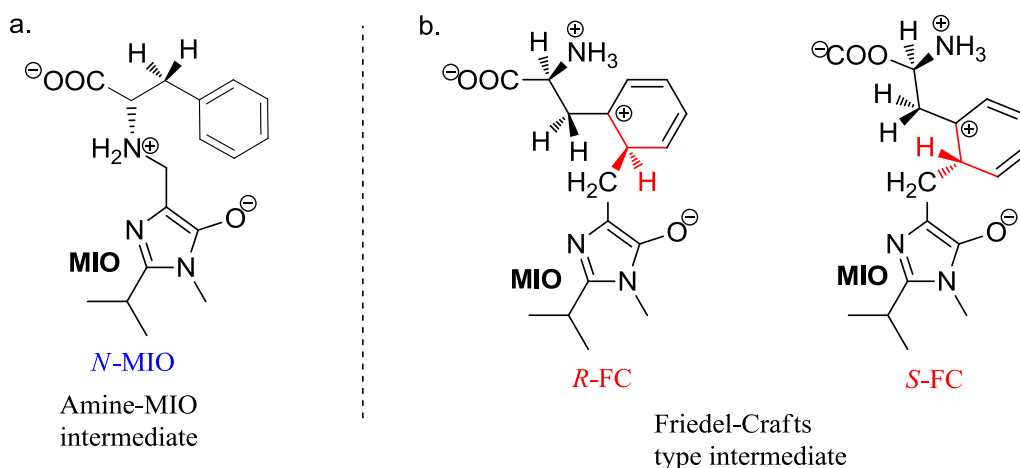
și deshidratarea autocatalitică a unei tripeptide interne Ala-Ser-Gly, prezente în situsul activ al enzimei²³ (**Schema 4.**), un motiv strict conservat, care acționează ca un electrofil în mecanismul reacției, și este întâlnit la toate amoniac-liazele și 2,3-aminomutazele identificate până în prezent.²⁴ În cazul enzimei PAM din *Pantoea agglomerans* MIO este format din Thr-Ser-Gly, Ala fiind înlocuită de către Thr.²⁵



Schema 4. Formarea grupării electofile MIO în *PpHAL*

I. 3. Mecanismul de reacție

Au fost propuse două mecanisme pentru eliminarea amoniacului catalizată de MIO, observate în familia amoniac-liazelor (**Schema 5.**)²⁶



Schema 5. Doi intermediari propuși în reacția de dezaminare catalizată de PAL a L-fenilalaninei **a.** Intermediarul *N*-MIO (Hanson – Havir),²² **b.** Intermediarul de tip Friedel-Crafts (Rétey)²⁷

Primul se bazează pe un cofactor intermediar *N*-MIO care intervine în eliminarea amoniacului și al doilea se bazează pe o reacție de tip Friedel-Crafts. În ambele mecanisme propuse, MIO formează un intermediar covalent cu substratul fenilalaninic, care este ulterior deprotonat la poziția β .

I. 4. Aplicații ale PAL și PAM

Produsul reacției catalizate de PAL este *trans*-cinamatul, precursor cheie al fenilpropanoidelor ca de exemplu: lignina, flavonoidele și cumarinele. Astfel, PAL se situează la intersecția metabolismului primar cu cel secundar la plante, iar importanța sa îl face o țintă pentru ierbicide.

Fenilalanin amoniac-liazele prezintă și potențiale *aplicații terapeutice*, deoarece PAL transformă L-fenilalanina în acid *trans*-cinamic, care este un metabolit inofensiv și nu necesită cofactor, fiind considerat un posibil candidat pentru tratamentul fenilceturoniei.²⁸

În comparație cu HAL, PAL tolerează o varietate mare de substraturi. Enzimele PAL prezintă avantajul folosirii ca substraturi a derivaților de acid cinamic disponibili și nu se bazează pe nici un cofactor extern sau sistem de reciclare, fiind potrivite pentru utilizare în industrie.

2,3-aminomutazele sunt deseori utilizate ca *biocatalizatori* datorită faptului că prezintă flexibilitate mare în ceea ce privește natura substratului. În funcție de origine, fenilalanin 2,3-aminomutazele (EC 5.4.3.10/11) pot cataliza izomerizarea (*S*)- α -fenilalaninei sau a derivaților acesteia la (*S*)- sau (*R*)- β -fenilalanine.

Proprietățile catalitice ale acestor enzime le fac atractive pentru aplicațiile sintetice, având capacitatea de a prepara compuși valoroși. De exemplu, β -aminoacizii sunt utilizați intens în industria farmaceutică ca precursori în biosinteza unor compuși bioactivi, pentru obținerea antibioticului (Andrimin)^{17,25} sau medicamentului împotriva cancerului (Taxol).¹⁶

Obiectivele studiului

Obiectivele acestui studiu sunt următoarele:

1. Exprimarea și caracterizarea fenilalanin amoniac-liazei alcalofile din *Rubrobacter xylanophilus* (RxPAL)

În cadrul acestui studiu sunt descrise identificarea unei enzime noi PAL din bacteria termotolerantă *Rubrobacter xylanophilus* (RxPAL), clonarea genei sintetice și caracterizarea enzimei.

2. Sinteze biocatalitice mediate de fenilalanin amoniac-liaze și 2,3-aminomutaze

- **Investigarea stereoselectivității fenilalanin amoniac-liazei din *Petroselinum crispum* (PcPAL) în condiții neconvenționale** – S-au analizat o serie de factori care pot influența sinteza enantioselectivă a (*orto*-, *meta*-, *para*-)-nitro-fenilalaninelor mediată atât de celule întregi cât și de enzime PcPAL purificate conținând gruparea MIO activă sau inactivă. S-a investigat comportamentul enzimelor la diferite concentrații de amoniac. S-a studiat de asemenea și influența pH-ului asupra biotransformărilor catalizate de PcPAL.
- **Dezvoltarea unei noi metode pentru imobilizarea PcPAL – Agregate enzimatic reticulate de tip bis-epoxidic (CLEA)**– S-a studiat posibilitatea utilizării GDE ca și agent de reticulare convenabil de tip bis-epoxidic pentru obținerea unor agregate CLEA și co-CLEA a fenilalanin amoniac-liazei din *Petroselinum crispum*, în scopul îmbunătățirii performanțelor catalitice ale biocatalizatorilor.
- **Biotransformări catalizate de PaPAM** - A fost de asemenea investigată activitatea catalitică a fenilalanin 2,3-aminomutazei din *Pantoea agglomerans* (PaPAM) asupra unor α - și β -arilalanine racemice. S-au studiat de asemenea efectele naturii și poziției substituenților de pe inelul aromatic asupra echilibrului reacției.

Capitolul II. Exprimarea și caracterizarea fenilalanin amoniac-liazei din bacteria termofilă *Rubrobacter xylanophilus* (RxPAL)

II. 1. Introducere

După cum este descris în studiul de literatură, deși enzimele PAL sunt des întâlnite în plante și ciuperci, unde au un rol esențial în formarea fenilpropanoidelor, cele de origine bacteriană sunt foarte rare. Acest lucru poate fi explicat prin faptul că fenilpropanoidele nu sunt esențiale bacteriilor.

În acest capitol sunt descrise identificarea și caracterizarea unei noi enzime PAL din bacteria termotolerantă *Rubrobacter xylanophilus* (RxPAL). Pentru aceasta s-a realizat clonarea genei sintetice și enzima RxPAL exprimată a fost caracterizată la diferite valori de pH; de asemenea, s-a realizat o mutație punctiformă în cadrul tripeptidei caracteristice ASG implicată în formarea grupării MIO.

II. 2. Rezultate și discuție

II. 2.1. Identificarea, exprimarea și purificarea RxPAL

Acest studiu descrie pentru prima dată caracterizarea enzimei PAL dintr-o tulpină a bacteriei Gram-pozitive, termofile și radiotolerante *Rubrobacter xylanophilus*. După identificarea presupusei gene care codifică PAL în *Rubrobacter xylanophilus* prin screening-ul genomurilor bacteriene pentru identificarea membrilor familiei amoniac-liazei utilizând programele BLAST și Clustal W, gena a fost sintetizată pentru tulpini gazdă de *E. coli* cu o utilizare optimă de codon.

Enzima RxPAL recombinantă a fost supraexprimată ca o proteină etichetată la capătul N-terminal cu 6 resturi de His într-o tulpină de *E. coli* TOP 10.

Exprimarea și purificarea RxPAL din *Rubrobacter xylanophilus* au fost realizate cu succes; enzima obținută a manifestat un grad ridicat de puritate electroforetică.

II. 2.2. Valoarea optimă de pH a enzimei RxPAL

Activitatea enzimatică a RxPAL a fost investigată spectrofotometric la 290 nm prin monitorizarea produsului format (acidul *trans*-cinamic) din substratul natural al acesteia, L-fenilalanina. Într-o primă etapă s-a identificat valoarea optimă de pH a enzimei. S-au realizat măsurători în diferite soluții tampon având pH în intervalul 6.5-12.

Viteza reacției catalizate de *RxPAL* a crescut lent până la valoarea 8.5 a pH-ului. Între valorile 8.5 și 11.5 activitatea enzimatică a crescut rapid, atingând un maxim la pH 11.5 (**Figura 3.**); peste această valoare, activitatea a scăzut brusc datorită denaturării proteinei.

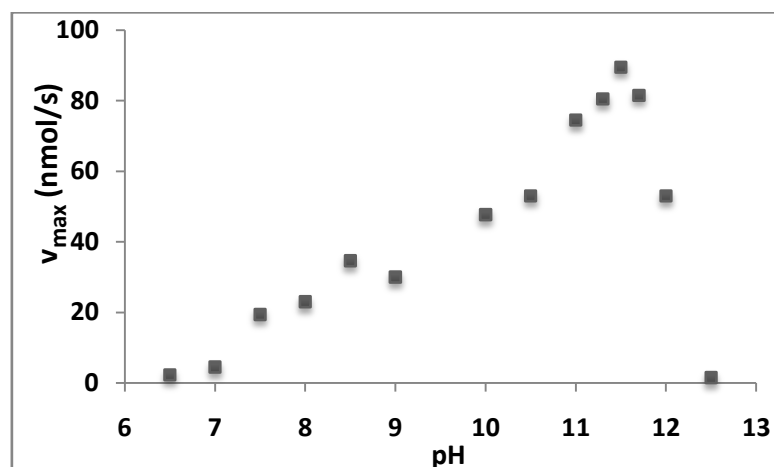


Figura 3. Profilul de pH al enzimei *RxPAL*. Datele indică o valoare locală a pH-ului optim la 8.5 și o valoare globală la 11.5.

II. 2.3. Stabilitatea termică a enzimei *RxPAL*

Stabilitatea termică a enzimei *RxPAL* a fost determinată prin măsurători termofluorometrice. În scopul identificării valorii optime a pH-ului în ceea ce privește temperatura de topire (T_m), s-au realizat măsurători în soluții tampon de concentrație 100 mM și pH în domeniul 6-12. Din profilul de pH (**Figura 4**) se poate observa că temperatura maximă de topire se atinge în domeniul de pH 8-8.5 și este de aproximativ 64°C.

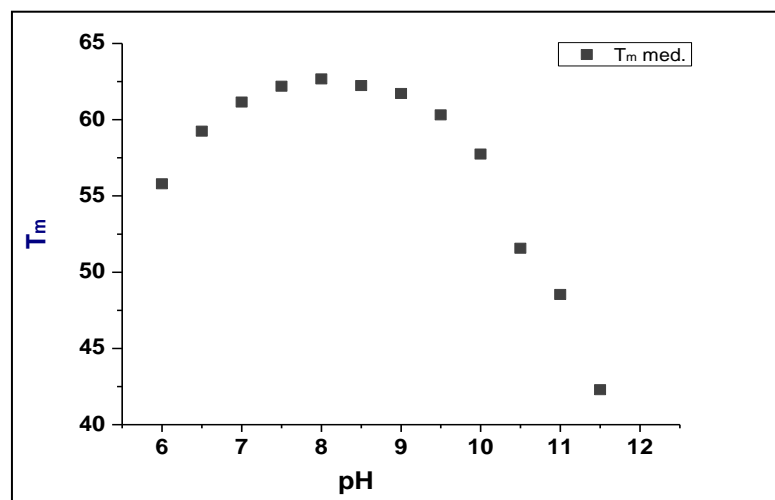


Figura 4. Profilul temperaturii de topire a *RxPAL* în condiții diferite de pH

II. 2.4. Măsurători de dicroism circular pentru estimarea structurii secundare a RxPAL

În scopul determinării proporțiilor în care se regăsesc elementele de structură secundară în RxPAL, s-a utilizat spectroscopia de dicroism circular CD în domeniu UV îndepărtat. Spectrele CD în UV îndepărtat (**Figura 5**) evidențiază clar faptul că RxPAL este asociată cu un conținut ridicat de structuri secundare tip α -helix, prin prezența picurilor caracteristice la 208 și 222 nm.

Spectrele CD în UV îndepărtat măsurate la diferite valori ale pH-ului păstrează caracteristicile celor două maxime de la 208 și 222 nm. Prin urmare, pe baza spectrelor CD în UV îndepărtat putem afirma că structura secundară a RxPAL este bine conservată până la valoarea 11.0 a pH-ului.

S-au realizat totodată și măsurători CD în UV apropiat (**Figura 6**), întrucât detaliile spectrale fine care se regăsesc în acest domeniu constituie indicatori ai unor modificări conformaționale. **Figura 6** prezintă 2 picuri la 289 și 298 nm, caracteristice pentru resturile de triptofan și tirozină. Ambele benzi sunt vizibile în spectrul enzimei până la pH 11.5. Caracteristicile spectrale ale resturilor de triptofan sunt sensibile în mod special la modificări ale mediului proteinei. Aceste spectre confirmă stabilitatea enzimei la pH alcalin prin menținerea integrității structurii terțiare în domeniul de pH 6.5-11.5 (**Figura 5**) și arată că la pH 11.5 apar ușoare modificări structurale. La pH 12.5 spectrele CD (**Figura 5**) indică denaturarea parțială a proteinei, ceea ce este în concordanță cu rezultatele măsurătorilor de activitate.

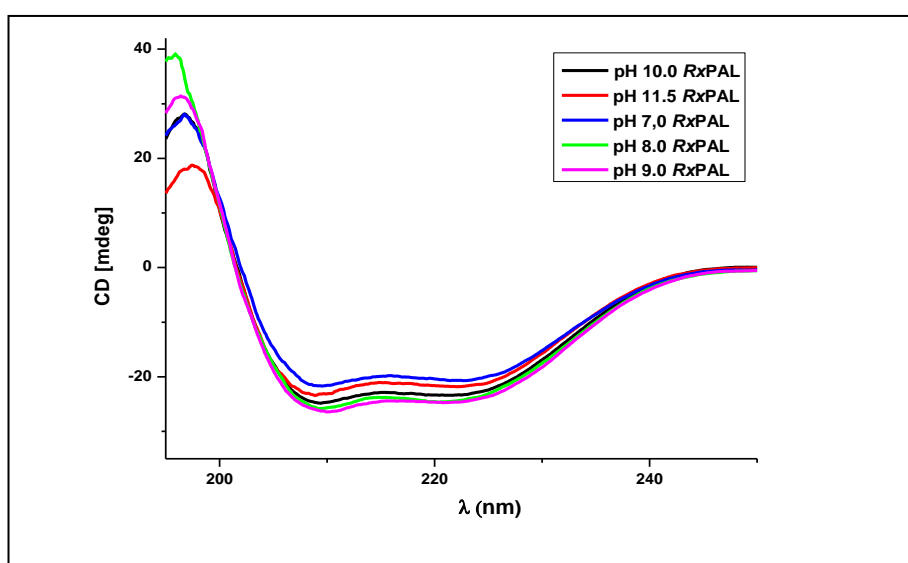


Figura 5. Spectrele de dicroism circular ale RxPAL înregistrate în domeniul UV îndepărtat (195–250 nm)

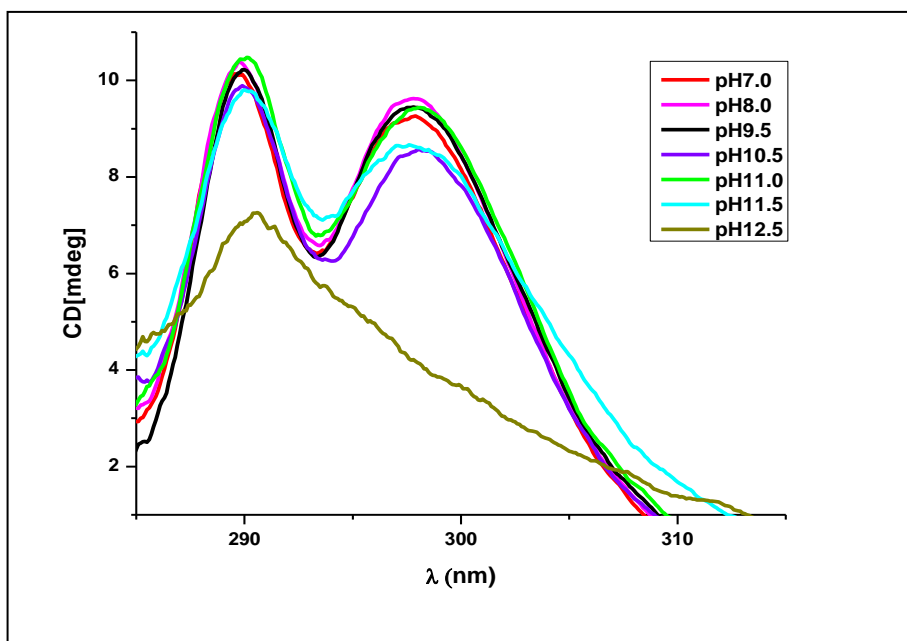


Figura 6. Spectrele de dicroism circular ale *RxPAL* înregistrate în domeniul UV apropiat (285–310 nm)

II. 2.5. Măsurători cinetice

Au fost determinați spectrofotometric parametrii cinetici pentru reacția de dezaminare a substratului natural *L*-fenilalanina cu obținerea acidului *trans*-cinamic, catalizată de *RxPAL*. Variația absorbânței la 290 nm în timp este datorată formării acidului *trans*-cinamic. Folosind o curbă de calibrare, variația în timp a absorbânței poate fi transformată în variația în timp a concentrației produsului format. Această metodă permite determinarea parametrilor cinetici (V_{\max} , k_{cat} și K_M), folosind analiza de regresie neliniară.

Tabel 1. Parametrii cinetici ai enzimei purificate *RxPAL* din *Rubrobacter xylanophylus*

K_M (mM)	v_{\max} (mMs ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat} / K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
0.37	$1.67 \cdot 10^{-4}$	0.083	0.22

II. 2.6. Investigarea prezenței grupării MIO, esențială din punct de vedere catalitic, în structura *RxPAL*

Gruparea MIO esențială pentru actul catalitic în enzimele PAL determină prezența unui semnal caracteristic în domeniul UV apropiat.²⁹ Secvența de aminoacizi ai *RxPAL* conține motivul ¹⁵²ASG¹⁵⁴, responsabil pentru formarea grupării MIO în amoniac-liaze. În scopul investigării prezenței și rolului acestui motiv în structura *RxPAL*, am construit

mutantul S153A, împiedicând astfel formarea grupării MIO. Mutantul astfel obținut S153A *RxPAL* a manifestat o pierdere totală a activității enzimatice în reacția de dezaminare a L-fenilalaninei. Spectrele UV ale enzimei *RxPAL* (wt-*RxPAL*) native și ale mutantului S153A au fost măsurate cu scopul de a demonstra prezența grupării MIO și de a estima cantitatea sa în enzimă (**Figura 7**).

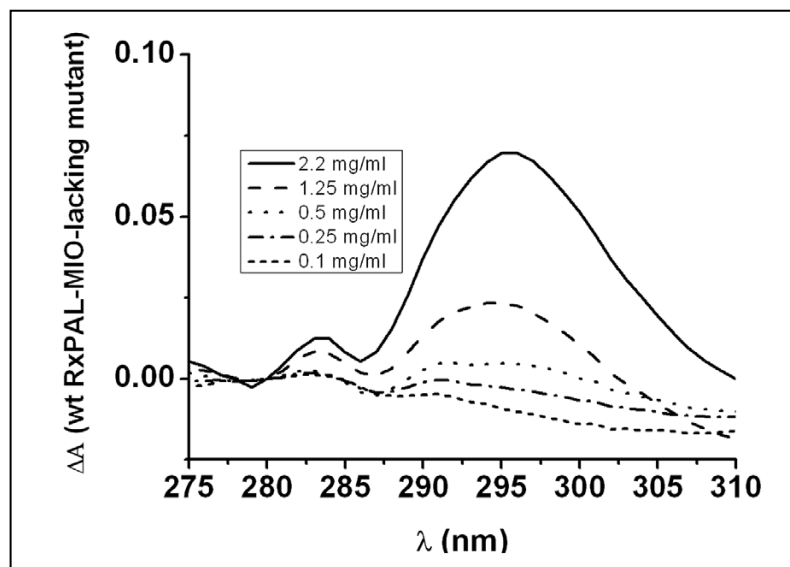


Figura 7. Mutația realizată la situsul MIO al wt-*RxPAL* determină dispariția maximului de absorbție caracteristic acestei grupări. Spectrele diferențiale wt-*RxPAL* și ale mutantului S153A au fost înregistrate la diferite concentrații de proteină

Rezultatele arată clar prezența unei benzi de absorbție caracteristice grupării MIO pentru wt-*RxPAL* care lipsește în cazul mutantului S153A. Prin aceasta, s-a dovedit că secvența ¹⁵²ASG¹⁵⁴ este implicată în formarea grupării MIO în *RxPAL*.

II. 3. Concluzii

Metodele bioinformatiche s-au dovedit utile pentru identificarea unor noi enzime PAL din bacterii termotolerante iar acest studiu demonstrează exprimarea și caracterizarea unei noi enzime PAL izolată din bacteria termofilă *Rubrobacter xylanophilus* (*RxPAL*).

Enzima *RxPAL* recombinantă a fost purificată cu succes utilizând cromatografia de afinitate Ni-NTA. Investigând influența pH-ului asupra activității enzimatice a *RxPAL* asupra substratului natural L-fenilalanina s-a observat un punct de maxim local la pH 8.5 și unul de maxim global la pH 11.5. Enzima a prezentat stabilitate termică ridicată. Studiile de dicroism circular au arătat faptul că structura secundară a enzimei are un caracter predominant de α -

helix (CD în UV îndepărtat) și că există două benzi distinctive în domeniul UV apropiat. Aceste caracteristici structurale au fost bine conservate la valori de pH de până la 11.5. Datorită acestor proprietăți, *RxPAL* constituie un potențial biocatalizator în reacții stereoselective conduse în condiții extreme sau un agent terapeutic în tratarea fenilcetonuriei sau a leucemiei.

Capitolul III. Sinteze biocatalitice mediate de *PcPAL* și *PaPAM*

III. 1. Investigarea stereoselectivității enzimei *PcPAL* în condiții neconvenționale

III. 1.1. Introducere

Fenilalanin amoniac-liaza din pătrunjel (*PcPAL*) face parte din clasa enzimelor care conțin gruparea prostetică 4-metilidenimidazol-5-ona (MIO) generată post-translațional din 3 resturi de aminoacizi Ala-Ser-Gly și este responsabilă pentru conversia L-fenilalaninei în acidul *trans*-cinamic. Reacțiile de aminare, în mod normal, sunt conduse în soluții de NH₄OH de concentrații 5-6 M și pH 10.0 iar cele de dezaminare sunt realizate în soluții tampon de Tris 100 mM, pH 8-9 la temperatura de 30°C. Conform literaturii de specialitate, sintezele mediate de PAL ale unor aminoacizi nenaturali au decurs cu excese enantiomerice de peste 98%.^{30,31,32}

Lovelock și *colab.* au studiat activitatea și enantioselectivitatea enzimei de origine bacteriană, *Anabaena variabilis* PAL (*AvPAL*) asupra unei game vaste de substraturi nenaturale și a comparat activitatea și selectivitatea acesteia cu cele ale enzimelor eucariote *RgPAL* și *PcPAL* în soluție de NH₄OH 5 M și pH 9.5.³³ Aceștia au observat, pentru toate cele trei enzime PAL testate, că excesele enantiomerice ale produșilor cu substituenți electron-atrăgători scad în timp, ceea ce sugerează faptul că enzimele sunt capabile să catalizeze și formarea D-enantiomerilor în cazul substraturilor cu deficit de electroni.³³

În studiul de față, am investigat efectul concentrației de amoniac asupra enantioselectivității *PcPAL* în sinteza *orto*-, *meta*- și *para*-nitro-fenilalaninei mediată atât de enzima purificată cât și de celule întregi. De asemenea, am analizat influența pH-ului asupra reacțiilor și a reacției catalizată de enzima având grupare MIO inactivă.

III. 1.2. Rezultate și discuție

III. 1.2.1. Exprimarea și purificarea PcPAL

Enzimele PcPAL native au fost supraexprimate în celulele *E. coli* BL21(DE3)pLysS, crescute în mediu LB și induse cu IPTG la 25°C timp de 18 ore. După 18 h, celulele au fost colectate prin centrifugare și purificate sau utilizate ca atare în biotransformări.

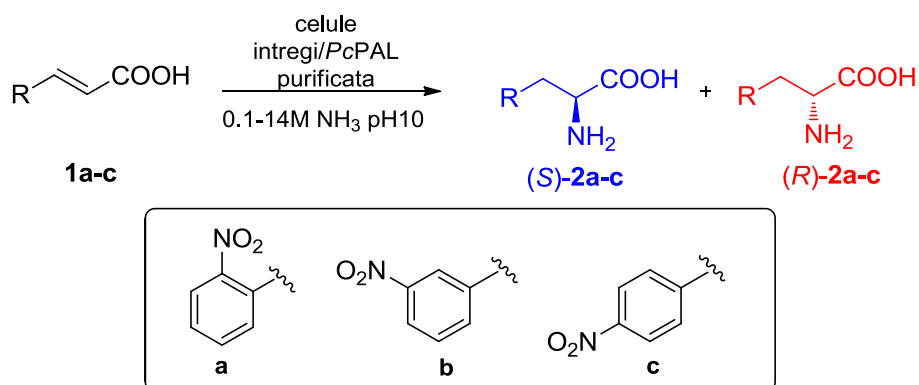
III. 1.2.2. Efectul concentrației de amoniac asupra reacției de aminare, catalizată de celule întregi și de PcPAL purificat

Mai întâi, a fost investigat efectul concentrației de amoniac asupra reacțiilor catalizate de celulele întregi și de enzima PcPAL purificată, (**Schema 6**). Reacțiile au fost monitorizate prin intermediul HPLC chiral.

Excesele enantiomerice au fost calculate prin integrarea ariilor semnalelor UV. Valorile obținute sunt date în **Tabelul 2** și **Tabelul 3**.

De asemenea, am observat că sinteza *orto*-, *meta*-, *para*-nitro-fenilalaninelor nu a decurs într-o manieră selectivă, sugerând faptul că PcPAL catalizează și formarea enantiomerului D pe lângă enantiomerul L, așa cum a descris Lovelock și colab. În mod surprinzător, excesul enantiomeric (*ee*) al produșilor aminoacizilor **2a-c** a scăzut semnificativ în prezența concentrațiilor scăzute de amoniac (0.1-5 M), atât în prezența celulelor întregi, cât și cu enzima PcPAL purificată. La concentrații de peste 5 M NH₃, valorile *ee* sunt aproape de maxim, iar la concentrații de peste 8 M NH₃ acestea nu se modifică semnificativ. Formarea D-aminoacidului este proeminentă în special pentru derivații *orto*- și *para*-nitro. La concentrații de amoniac de 0.5 și 1 M este predominantă formarea enantiomerului D. Valorile *ee* ale derivaților *orto*-nitro sunt mai mari în prezența PcPAL purificată, comparativ cu celulele întregi. În cazul compusului *para*-nitro, situația este inversă. PcPAL prezintă cea mai înaltă selectivitate când substratul este *meta*-nitro-cinamatul, în ambele cazuri.

Surprinzător, în cazul derivatului *para* substituit, transformarea catalizată de către enzima purificată prezintă o selectivitate mai mică în comparație cu transformarea mediată de celulele întregi. Excesele enantiomerice sunt prezentate în **Tabelul 2** și **Tabelul 3**.



Schema 6. Reacțiile de aminare mediate de *PcPAL*

Tabel 2. Variația enantioselectivității cu concentrația de amoniac în biotransformări mediate de **celule întregi *PcPAL***, după 3 h

c NH₄OH (M) pH 10	(S)-2a <i>ee_S</i> (%)	(S)-2b <i>ee_S</i> (%)	(S)-2c <i>ee_S</i> (%)
0.1	-30.7	42.2	-23.2
0.5	-18.3	68.8	-7.7
1	9.1	74.4	19.0
2	46.3	82.2	47.4
3	63.3	80.1	57.9
4	64.6	80.9	58.0
5	65.3	81.3	69.7
6	82.2	82.5	70.5
8	84.3	84.9	72.7
14	88.7	85.6	73.9

Tabel 3. Variația enantioselectivității cu concentrația de amoniac în biotransformări mediate de ***PcPAL* purificată**, după 3 h.

c NH₄OH (M) pH10	(S)-2a <i>ee_S</i> (%)	(S)-2b <i>ee_S</i> (%)	(S)-2c <i>ee_S</i> (%)
0.1	-2.6	40.9	-38.9
0.5	13.9	49.8	-24.6
1	27.9	64.4	-8.2
2	54.9	70.2	6.9
3	56.7	70.8	35.3
4	58.1	76.6	34.7
5	69.6	76.7	37.7
6	73.9	80.7	44.2
8	79.5	80.6	51.7
14	85.0	84.7	54.7

III. 1.2.3. Influența pH-ului asupra reacției de aminare

A fost investigată, de asemenea, influența pH-ului asupra reacțiilor catalizate de PcPAL, folosind enzima purificată, la o concentrație de 1 M NH₃, în intervalul de pH 7.0-10. Prin coborârea nivelului pH-ului, enantioselectivitatea a crescut, dar viteza reacției a scăzut. La pH 7.0, enzima nu prezintă activitate după 12 h, doar la pH 7.5 derivatul *orto*-substituit a prezentat o oarecare activitate, în timp ce *meta*- și *para*-derivații au prezentat activitate doar la pH 8.5. Enzima a catalizat reacția, având o selectivitate maximă la pH 8, în cazul formării *orto*-nitro-fenilalaninei, în timp ce pentru formarea *meta*- și *para*-nitro-fenilalaninelor, pH-ul optim a fost 8.5. La valori mai mici ale pH-ului, reacțiile nu au pornit. În toate cazurile, atunci când pH-ul este mai mare de 8.5, are loc o scădere a selectivității enzimei.

Tabel 4. Influența pH-ului asupra selectivității în reacții de aminare (1a-c) mediate de PcPAL purificată, după 12h

(1M NH ₄ OH) pH	(S)-2a <i>ees</i> (%)	(S)-2b <i>ees</i> (%)	(S)-2c <i>ees</i> (%)
7.5	<95	-	-
8	89.7	-	-
8.5	74.3	87	73.95
9	40.6	84	50.8
9.5	29.7	53.2	26
10	24.6	46.2	-1.7

III. 1.2.4. Enzime PcPAL care conțin MIO și MIO redus

Pentru a investiga rolul grupării MIO în formarea enantiomerului D, gruparea MIO a fost redusă cu NaBH₄. Enzima care conține MIO redus, și-a pierdut complet activitatea pentru reacția de aminare a acidului cinamic și dezaminare a L-fenilalaninei, dar a prezentat o activitate mai scăzută pentru compușii nitro-substituiți.

Am monitorizat enantioselectivitatea *para*-nitro-fenilalaninei obținută în urma reacțiilor catalizate de enzima care conține gruparea MIO și cea care conține gruparea MIO redusă. Am observat că și enzima redusă catalizează reacția, prezentând enantioselectivitate mai înaltă decât enzima care conține MIO, dar cu o viteză de reacție mai mică.

Tabel 5. Reacția de aminare a *para*-nitro-cinamatului catalizată de *PcPAL* nativă și cea care conține MIO redus, după 12 h

NH ₃ (M) pH 10	wt- <i>PcPAL</i>	MIO _{inactiv} <i>PcPAL</i>
	<i>ee_s</i> (%)	<i>ee_s</i> (%)
	12 h	12 h
1	-9.64	73.51
3	61.03	80.92
8	67.51	83.80

III. 1.3. Concluzii

Pe baza rezultatelor obținute, condițiile de reacție au un efect semnificativ asupra *ee* al produșilor de reacție, sugerând faptul că *PcPAL* poate să catalizeze formarea atât a L- cât și a D-enantiomerilor structurilor deficitare în electroni.

Concentrația de amoniac și pH-ul, au un rol important în enantioselectivitatea enzimatică, la fel ca și prezența grupării prostetice MIO.

III. 2. Dezvoltarea unei noi metode pentru imobilizarea *PcPAL* – Agregate enzimatic reticulate de tip bis-epoxidic (CLEA)

III. 2.1. Introducere

Enzimele imobilizate posedă multe avantaje comparativ cu analogii lor solubili. Selectivitatea, specificitatea, activitate catalitică, și stabilitatea enzimatică sunt factorii cheie care afectează eficiența biocatalizatorilor.^{2,34,35} Prin utilizarea unor tehnici de imobilizare se pot îmbunătăți proprietățile enzimaticice în mai multe moduri, cum ar fi prin: creșterea rigidității enzimei, prevenirea disocierii subunităților prin tehnica multipunct, imobilizare și / sau prin generarea unui mediu favorabil pentru enzima.³⁶

Agregatele de enzime reticulate (CLEAs) au fost dezvoltate ca o tehnică simplă și robustă de imobilizare. CLEAs se formează prin precipitarea lor dintr-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 co-immobilizarea cu o altă proteină ca de exemplu BSA.³⁷

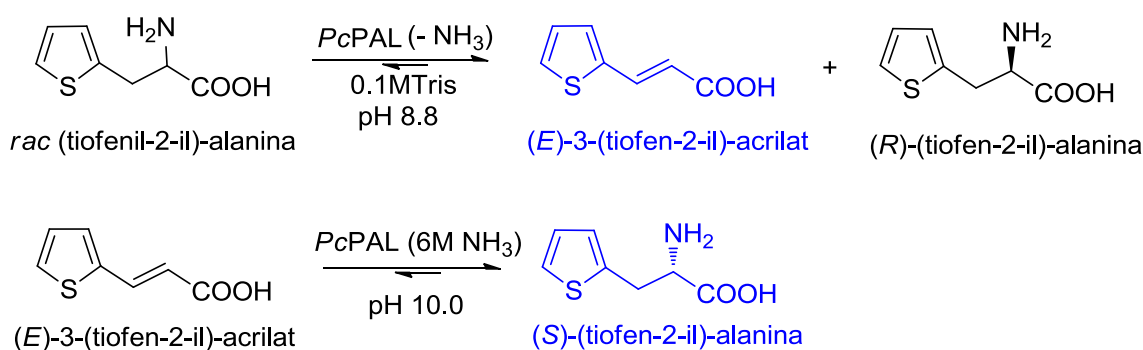
Pe de altă parte, poliglicidileterii ca și glicerol-diglicidileterul (GDE) sau polietilenglicol-diglicidil eterul sunt utilizați pe scară largă ca și aditivi pentru reticularea unor polimeri cu grupări aminice, hidroxilice sau carboxilice. Cu toate acestea ei nu au fost încă utilizați la obținerea CLEAs.

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

III. 2.2. Rezultate și discuție

III. 2.2.1. Biotransformări stereoselective cu *PcPAL* CLEA

PAL-CLEA și PAL-BSA co-CLEA pur recombinant din *Petroselinum crispum* au fost testate în reacția de adiție a amoniacului la (*E*)-3-(tiofen-2-il)-acrilat cât și în reacția de eliminare a amoniacului din tiofen-2-il-alanina racemică. A fost aleasă tiofen-2-il-alanina drept substrat pentru că reacția de eliminare e mai rapidă decât pentru substratul natural, L-fenilalanina.³⁸



Schema 7. Biotransformarea *rac*-(tiofen-2-il)-alaninei și (*E*)-3-(tiofen-2-il)-acrilatului cu *PcPAL*

Deși ambele tipuri de agregate (GA- și GDE-PAL-CLEA) s-au dovedit active pentru reacția de eliminarea a amoniacului din L-fenilalanina sau *rac*-(tiofen-2-il)-alanina, 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 (**Figura 8.A**) cât și în cea de adiție (**Figura 8.B**).

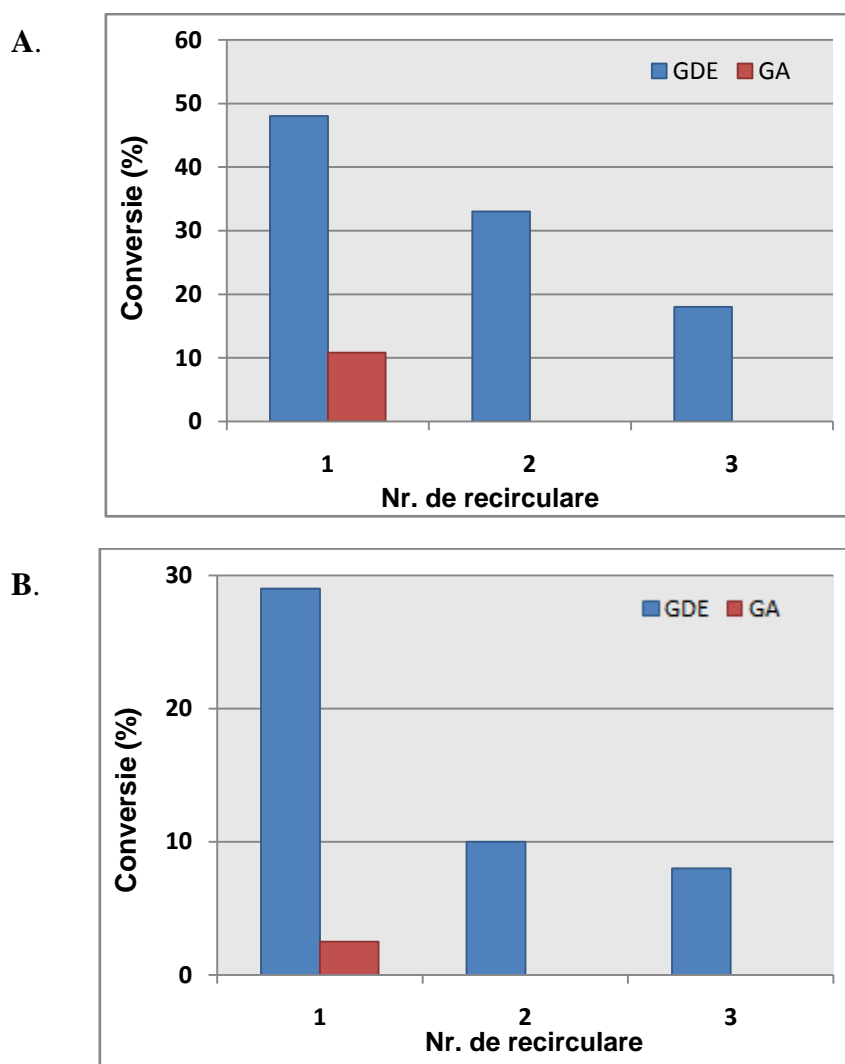


Figura 8. Recircularea coagregatului PAL-BSA reticulat cu GDE și GA în reacția de eliminare din *rac*-(tiofen-2-il)-alanina (A) și în reacția de adiție la (*E*)-3-(tiofen-2-il)-acrilat (B) a amoniacului

În ceea ce privește recircularea, s-a observat o diferență mare între stabilitatea coagregatelor reticulate (**Figura 8.**). Produsele obținute cu GDE ca agent de reticulare își mențin activitatea aproape nealterată și după 3 recirculări, chiar și în mediu puternic bazic

(Figura 8.B; 6 M NH₃, pH 10.0), în timp ce cele preparate GA sunt deja complet inactivate după prima utilizare.

III. 2.3. Concluzii

Se poate concluziona că reticularea cu glicerol-diglicidileterul (GDE) mărește nu doar stabilitatea mecanică, ci și stabilitatea operațională a enzimelor studiate.

De asemenea, enzimele reticulate cu GDE au fost biocatalizatori eficienți și robuști, depășind performanța CLEA obținute cu glutaraldehidă (GA). Utilizarea bis-epoxizilor pentru reticulări similare extinde domeniul de aplicare al tehnologiei de reticulare pentru imobilizarea enzimelor.

III. 3. Biotransformări catalizate de fenilalanin 2,3-aminomutaza din *Pantoea agglomerans* (PaPAM)

III. 3.1. Introducere

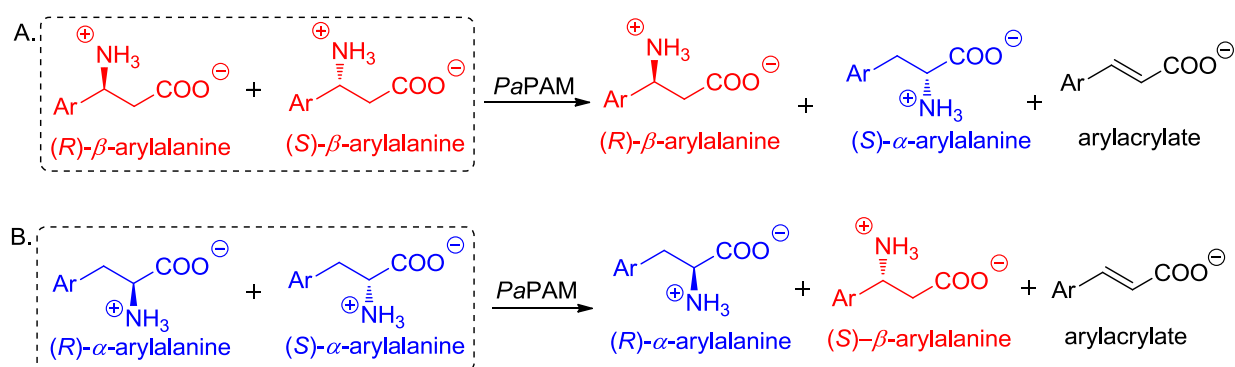
În prezent există o cerință în continuă creștere pentru producerea de β -aminoacizi sub formă optic pură datorită importanței acestora în industria farmaceutică și sinteza de peptide.^{39,40} S-au studiat numeroase metode de sinteză asimetrică a acestor compuși de interes.

O abordare atractivă de sinteză a β -aminoacizilor nenaturali optic puri constă în utilizarea enzimei fenilalanin-2,3-aminomutaza (PAM). Există două tipuri de enzime PAM în funcție de preferința stereochemică: cea care duce la formarea (*R*)- β -fenilalaninei (EC 5.4.3.10) de origine vegetală⁴¹ și cea care duce la formarea (*S*)- β -fenilalaninei (EC 5.4.3.11) de origine bacteriană.^{25,42}

Faptul că aceste enzime acceptă o paleta vastă de aminoacizi aromatici și heteroaromatici a fost exploatat pentru sinteza unor α - și β -aril- și heteroaril-aminoacizi nenaturali.^{43,44} Fenilalanin-2,3-aminomutaza din *Taxus canadensis* a fost utilizată pentru biotransformarea parțială a (*S*)- α -fenilalaninei și a derivaților săi în (*R*)- β -izomerii corespunzători⁴⁵ dar și pentru a cataliza reacția de aminare asimetrică a acidului (*E*)-cinamic conducând la obținerea unui amestec de (*S*)- α - și (*R*)- β -fenilalanină.^{14,46} Wanninayake și colab. au studiat o serie de aminoacizi nenaturali care au servit drept donori adecvați de grupare amino. Gruparea amino a acestor substraturi donoare a fost transferată intermolecular

la un derivat aril-acrilat cu ajutorul *TcPAM*, obținându-se amestecuri de α - și β -arilalanine. Mai recent, Weise și colab. au investigat EncP din *Streptomyces maritimus* în reacția de aminare a unor analogi aril-substituiți ai acidului cinamic. S-a observat faptul că EncP poate converti o serie de aril-acriilați în amestecuri de (*S*)- α - și (*S*)- β -arilalanine. Regioselectivitatea enzimei s-a dovedit a fi puternic influențată de natura și poziția substituenților inelului aromatic și a fost îmbunătățită prin tehnici de inginerie a proteinelor.

Specificitatea de substrat a fenilalanin-2,3-aminomutazei din *Pantoea agglomerans* (*PaPAM*) a fost testată pe o serie largă de (*S*)-arilalanine.⁴⁷ S-a demonstrat că eficiența catalitică a *PaPAM* și formarea aril-acriilaților ca produși secundari sunt influențate semnificativ de efectele electronice ale substituenților nucleului aromatic. S-a observat că (*S*)- α -fenilalaninele *meta*-substituite au fost transformate mai ușor în produși decât izomerii corespunzători *orto* și *para*. Recent, s-a arătat că celule întregi recombinante de *E. coli* capabile să exprime *PaPAM* pot de asemenea să producă (*S*)- β -arilalanine din (*S*)- α -arilalanine.⁴⁸



Schema 8. Biotransformări ale *rac*- α -arilalaninelor și *rac*- β -arilalaninelor mediate de *PaPAM*;

În studiul de față s-au identificat condițiile optime pentru a realiza exprimarea enzimei în *E. coli* cu nivel ridicat și s-a investigat activitatea catalitică a *PaPAM* pornind atât de la α -cât și de la β -arilalanine. S-au testat o serie de α - și β -(hetero)arilalanine, s-au analizat echilibrele reacțiilor și rapoartele substrat-produs utilizând spectroscopia RMN de ^1H și ^{19}F și puritățile optice au fost determinate utilizând cromatografia de lichide de înaltă performanță chirală (HPLC).

III. 3.2. Rezultate și discuție

III. 3.2.1. Optimizarea exprimării enzimei *PaPAM*

Inițial s-a investigat efectul unor condiții experimentale asupra exprimării enzimei *PaPAM* în scopul obținerii unui grad ridicat de puritate și a unui randament mare de producere a biocatalizatorului utilizat pentru sinteza unor (*S*)- β - și (*S*)- α -aminoacizi optic puri.

Rezultatele au arătat faptul că o concentrație de IPTG de 0.1 mM este suficientă pentru inducerea exprimării *PaPAM*, ceea ce reprezintă de 10 ori mai puțin decât concentrația utilizată în mod uzual. Totodată, un timp de 15 ore de incubare la 25°C după etapa de inducere este optim pentru producerea *PaPAM* cu nivel ridicat. Reducând concentrația de imidazol la 350 mM și adăugând un inhibitor pentru proteaze, s-a reușit creșterea stabilității enzimei. Enzima recombinantă *PaPAM* având puritate electroforetică avansată, a fost obținută prin cromatografie de afinitate cu Ni.

III. 3.2.2. Transformări ale α - și β -arilalaninelor racemice mediate de *PaPAM*

III. 3.2.2.1. Transformări ale α -arilalaninelor racemice mediate de *PaPAM*

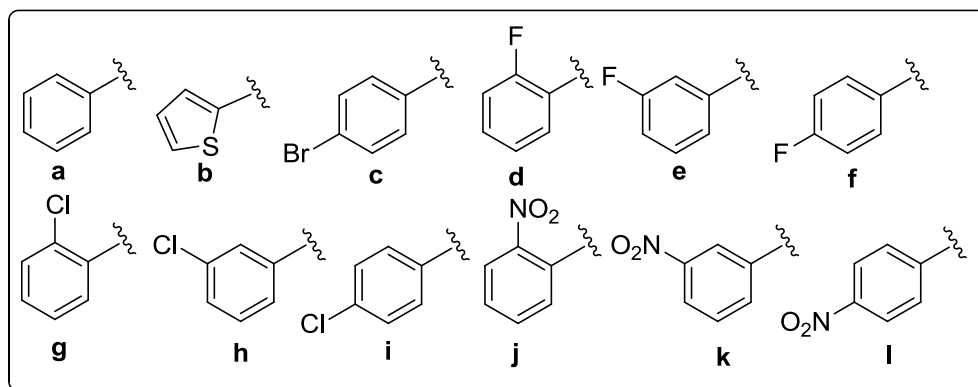
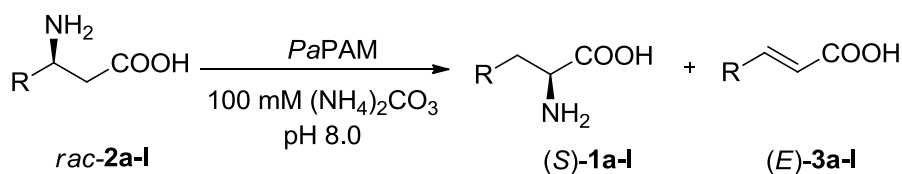
S-a investigat eficiența catalitică a fenilalanin 2,3-aminomutazei din *Pantoea agglomerans* pentru o serie de α -arilalanine (*rac-1a-l*).

Conform rezultatelor anterioare, aparent *PaPAM* nu a catalizat transformarea (*S*)- α -fenilalaninelor *orto*-substituite.⁴⁷ Acest studiu confirmă validitatea acestei observații pentru substraturile investigate *rac-1a-l* (**Schema 9, Tabel 6**). Pentru substraturile α -(*orto*-clorofenil)- (*rac-1h*) și α -(*orto*-nitrofenil)alanină (*rac-1k*) nu s-au detectat produși formați. Pe de altă parte, în cazul α -(*orto*-fluorofenil)alaninei (*rac-1e*) care poartă ca substituent cel mai mic atom de halogen, fluorul, s-a observat o activitate mutazică moderată care a condus la formarea (*S*)- β -(*orto*-fluorofenil)alaninei [(*S*)-**2e**].

(tiofen-2-il)alanină (*rac-1b*) conversia reacției mediate de *PaPAM* a fost similară cu a *rac- α* -fenilalaninei (*rac-1a*).

III. 3.2.2.2. Transformarea β -arilalaninelor racemice cu *PaPAM*

Pentru a testa disponibilitatea de sinteză a produșilor enantiomerici opuși, studiul nostru a fost extins și asupra reacțiilor care folosesc ca și substraturi β -arilalaninele racemice *rac-2a-l* (Schema 10 și Tabel 8). Spre deosebire de α -fenilalaninele *orto*-substituite, care conțin substituenți mari (*rac-1g,j*), și care aparent nu au fost acceptate ca substraturi de către *PaPAM*, toate β -fenilalaninele *orto*-substituite folosite în acest studiu (*rac-1d,g,j*), au fost transformate fără probleme. Pe de altă parte, *PaPAM* a fost aparent inactivă în transformarea β -fenilalaninelor *meta*- și *para*-substituite cu substituenți electronoatrăgători mari (*rac-2h,i,k,l*). Conversiile β -(tiofen-2-il)alaninei racemice (*rac-2b*) și a *meta*-fluoro- β -fenilalaninei racemice (*rac-2e*), obținute în urma reacțiilor catalizate de *PaPAM*, au fost mai mari decât cele obținute pentru β -fenilalanina racemică (*rac-2b*). *para*-fluoro- β -fenilalanina racemică (*rac-2f*) a fost transformată în mod asemănător cu β -fenilalanina racemică (*rac-2a*), în timp ce *para*-bromo- β -fenilalanina (*rac-2c*) a fost transformată în izomerul α (*S*)-**1c** și o cantitate mică de *para*-bromocinamat (**3c**), la o conversie semnificativ mai mică decât *rac-2a*. În toate cazurile, exceptând 2-nitro- β -fenilalanina racemică (*rac-2j*), reacțiile catalizate de către *PaPAM* au decurs cu formarea unei cantități mici de arilacrilat, ca produs secundar (**3a-g**) pe lângă izomerul enantiopur (*ee* >98%) (*S*)- α [(*S*)-**3a-g**]. Transformarea pornind de la *orto*-nitro- β -fenilalanina racemică (*rac-2j*) a fost deosebită nu doar din cauza lipsei produsului secundar (**3j**), ci și datorită lipsei stereospecificității în timpul izomerizării, rezultând produs cu enantiopuritate scăzută (*ee*_{(*S*)-1j} = 92%).



Schema 10. Transformarea β -arilalaninelor catalizată de către PaPAM

Tabel 8. Compoziția amestecului de reacție catalizată de PaPAM a *rac-2a-l* β -arilalaninelor (după 20 h, investigate la RMN)

Nr.	Substrat	x_2	$x_{(S)-1}^a$	x_3
1	<i>rac-2a</i>	0.78	0.20	0.02
2	<i>rac-2b</i>	0.69	0.27	0.04
3	<i>rac-2c</i>	0.91	0.08	0.01
4	<i>rac-2d</i>	0.61	0.37	0.02
5	<i>rac-2e</i>	0.68	0.25	0.07
6	<i>rac-2f</i>	0.76	0.23	0.01
7	<i>rac-2g</i>	0.54	0.40	0.06
8	<i>rac-2h</i>	1	0	0
9	<i>rac-2i</i>	1	0	0
10	<i>rac-2j</i>	0.87	0.13 ^b	0
11	<i>rac-2k</i>	1	0	0
12	<i>rac-2l</i>	1	0	0

^a *ee* >98%; ^b *ee* = 92%

III. 3.2.2.3. Efectul pH-ului și al concentrației de amoniac asupra reacției catalizate de PaPAM a α - și β -(tiofen-2-il)alaninelor racemice

Substraturile α - și β -(tiofen-2-il)alaninice (*rac-1b* și *rac-2b*) au fost investigate mai departe, prin modificarea pH-ului sau a concentrației de amoniac în biotransformări. Modificarea pH-ului soluției tampon în intervalul 7-9, nu a produs modificări semnificative

ale conversiilor (rezultatele nu sunt prezentate), spre deosebire de concentrația de amoniac între 50-1000 mM, care a avut influență asupra compoziției reacției (**Tabel 9**).

Tabel 9. Compoziția amestecurilor de reacție obținute pornind de la α - sau β -(tiofen-2-il)alaninele racemice (*rac-1b* sau *rac-2b*) sau acidul (*E*)-3-(tiofen-2-il)acrilic **3b** în prezența PaPAM, la diferite concentrații de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (după 20 h, determinate prin RMN)

Nr.	Substrat	$c_{(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3}$ (mM)	x_{1b}	x_{2b}	x_{3b}
1	<i>rac-1b</i>	50	0.68	0.17	0.15
2	<i>rac-2b</i>	50	0.19	0.76	0.05
3	<i>rac-1b</i>	100	0.68	0.17	0.15
4	<i>rac-2b</i>	100	0.27	0.69	0.04
5	<i>rac-1b</i>	200	0.72	0.16	0.12
6	<i>rac-2b</i>	200	0.23	0.75	0.02
7	<i>rac-1b</i>	1000	0.76	0.12	0.12
8	<i>rac-2b</i>	1000	0.13	0.84	0.03

Analiza reacțiilor catalizate de PaPAM ale α -(tiofen-2-il)alaninei racemice (*rac-1b*) la diferite concentrații ale $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ după 20 h, au arătat că, prin creșterea concentrației de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ peste 100 mM, se obține o conversie scăzută a (*S*)- β -(tiofen-2-il)alaninei (*S*)-**2b** și produsul de eliminare **3b**. La o concentrație de 1M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, atât producerea (*S*)- β -(tiofen-2-il)alaninei (*S*)-**2b** cât și a arilacrilatului (**3b**) scad la 12 %.

E interesant faptul că, atunci când biotransformările au început de la β -(tiofen-2-il)alanina racemică (*rac-2b*), cea mai bună conversie la (*S*)- α -(tiofen-2-il)alanină (*S*)-**1b** (27 %) a fost obținută la concentrații ale soluției tampon de 100 mM. La concentrații mai mari ale $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ s-au observat conversii scăzute ale (*S*)- α -(tiofen-2-il)alaninei (*S*)-**1b** și a produsului de eliminare **3b**.

III. 3.3. Concluzii

În concluzie, putem spune, pe baza rezultatelor obținute, ca selectivitatea și activitatea PaPAM asupra α - și β -arilalaninelor este influențată în mare parte de poziția substituenților pe inelul fenilic. Enzima a catalizat sinteza enantiomerilor (*S*)- β ai α -fenilalaninelor *para*- și *meta*-substituie, mult mai bine decât sinteza celor *orto*-substituie, pe când în cazul compușilor *rac*- β -corespunzători a fost total inactivă pentru derivații *meta*- și *para*-substituiți, dar analogii *orto*- β - au fost transformați cu conversii bune.

Lista de publicații

Publicații științifice:

1. A. Varga, G. Bánóczy, B. Nagy, L. C. Bencze, Á. Gellért, F. D. Irimie, J. Rétey, L. Poppe, C. Paizs. Influence of the aromatic moiety in α - and β -arylalanines on their biotransformations with phenylalanine 2,3-aminomutase from *Pantoea agglomerans*, *Amino Acids*, **2016**. – submitted.
2. A. Varga, A. Filip, L. C. Bencze, P. Sátorhelyi, E. Bell, B. G. Vértessy, L. Poppe, C. Paizs. Expression and purification of recombinant phenylalanine 2,3-aminomutase from *Pantoea agglomerans*, *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Chemia*, **2016**. – accepted.
3. D. Weiser, A. Varga, K. Kovács, F. Nagy, A. Szilágyi, B. G. Vértessy, C. Paizs, L. Poppe, Bisepoxide cross-linked enzyme aggregates - New immobilized biocatalysts for selective biotransformations, *ChemCatChem*, **2014**, 6:1463-1469.
4. K. Kovács, G. Bánóczy, A. Varga, I. Szabó, A. Holczinger, G. Hornyánszky, I. Zagyva, C. Paizs, B. G. Vértessy, L. Poppe. Expression and Properties of the Highly Alkalophilic Phenylalanine Ammonia-Lyase of Thermophilic *Rubrobacter xylanophilus*, *PLoS ONE*, **2014**, 9:e85943

Conferințe:

1. A. Varga, B. Nagy, M. Miklós, F. D. Irimie, L. Poppe, C. Paizs, *29th Annual Symposium of The Protein Society*, 22th-26th July, **2015**, Barcelona, Spain.
2. A. Varga, B. Nagy, F. D. Irimie, C. Paizs, *14th Symposium and Summer School on Bioanalysis*, 28th of June - 6th of July, **2014**, Bratislava-Smolenice, Slovakia.
3. A. Varga, B. Nagy, C. Paizs, L. Poppe, *COST Action CM1303 "SysBiocat" Training School*, 28th May-1st June, **2014**, Certosa di Pontignano, Italy. – oral presentation.
4. A. Varga, B. Nagy, C. Paizs, L. Poppe, *COST Action CM1303 "SysBiocat" Kick-off Workshop*, 10th-14th April, **2014**, Madrid, Spain
5. A. Varga, A. Radu, E. Kókai, G. B. Vértessy, L. Poppe, C. Paizs, *19th International Conference on Chemistry*, 21th - 24th November, **2013**, Baia-Mare, Romania.- oral presentation
6. A. Varga, E. Kókai, B. G. Vértessy, L. Poppe, C. Paizs, *Budapest Biostruct Course on Basics in Protein Crystallization and Crystallography*, 30th August - 3th September, **2013**, Budapest, Hungary.-oral presentation
7. A. Mantu, A. Varga, B. Nagy, M. I. Toşa, F. D. Irimie, C. Paizs, *13th Symposium and Summer School on Bioanalysis*, 27th June – 7th July, **2013**, Debrecen, Hungary.

Mulțumiri

Aș dori să mulțumesc tuturor celor care au contribuit într-o formă sau alta la munca prezentată în această teză.

Mai întâi, aș dori să-mi exprim cele mai sincere mulțumiri conducătorului meu de doctorat Prof. Habil. Dr. Ing Paizs Csaba, pentru ajutorul, răbdarea, motivarea și coordonarea oferită de-a lungul studiilor mele de doctorat.

Mulțumiri speciale Prof. Ing. Florin-Dan Irimie, Conf. Ing. Habil. Monica Ioana Toșa, Conf. Dr. Gabriel Katona, Lect. Paula Veronica Podea, Asist. Univ. László-Csaba Bencze, Dr. Ing. Jürgen Brem, Tehn. Ibolya Varga și Tehn. Ing. Ioan Bodea pentru că au împărtășit din cunoștințele lor și pentru atitudinea lor pozitivă de-a lungul studiilor mele doctorale.

Sincerele mele mulțumiri merg și către colaboratori noștri Prof. Beáta G. Vértessy, Prof. László Poppe și Ing. Klaudia Kovács de la Institutul de Enzimologie, Centrul de Cercetare a Științelor Vieții de la Academia Maghiară de Științe, Budapesta și Universitatea de Tehnologie și Economie Budapesta, pentru oportunitățile de stagii în cadrul grupurilor lor de cercetare și pentru că m-au introdus în proiectele care implică studiul PAL.

Aș dori să mulțumesc membrilor comisiei Dr. Mihai Ciubotaru, Prof. Dr. Ing. Ștefan Eugen Szedlacek și Conf. Dr. Niculina Hădade pentru interesul acordat tezei mele.

De asemenea, sunt profund recunoscătoare colegilor mei pentru ajutorul acordat la realizarea de experimente, pentru prietenia și sfaturile utile acordate, și nu în ultimul rând pentru că au creat un mediu de lucru propice și agreabil: Dr. Mara Ana Naghi, Dr. Alexandra Radu (Mantu), Judith-Hajnal Bartha-Vári, Botond Nagy, Norbert-Arthur Dima, Alina Filip, Mădălina-Elena Moisă, Dr. Laura-Mihaela Ardelean (Chiș), Dr. Melinda Füstös. Mă simt norocoasă că v-am cunoscut!

Mulțumesc pentru suportul financiar de la Programul Operațional Sectorial de Dezvoltare a Resurselor Umane 2007-2013, co-finanțat de către Fondul Social European, în cadrul proiectului POSDRU/159/1.5/S/137750 și pentru suportul financiar acordat de Ministerul Român al Educației și Cercetării (PN-II-ID-PCE- 3-0799/2011).

În cele din urmă, am cea mai adâncă recunoștință pentru familia mea, pentru atitudinea lor iubitoare, încurajatoare și răbdătoare de-a lungul vieții mele.

Referințe

-
- ¹ B. M. Nestl, S. C. Hammer, B. A. Nebel, and B. Hauer, New Generation of Biocatalysts for Organic Synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*:3070–3095
- ² U. T. Bornscheuer: Immobilizing Enzymes: How to Create More Suitable Biocatalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*:3336 – 3337
- ³ K. Faber, Biotransformations in Organic Chemistry A Textbook, 6th Edition, **2011**
- ⁴ <http://cleatechnologies.com/technology/biocatalysis>
- ⁵ P. Grunwald, Industrial Biocatalysis, Vol. 1, **2015**
- ⁶ L. Poppe, J. Rétey, Properties and Synthetic Applications of Ammonia-Lyases, *Curr Org Chem* **2003**, *7*, 1297–1315
- ⁷ B. Wu, W. Szymanski, S. de Wildeman, G.J. Poelarends, B.L. Feringa, D.B. Janssen, Efficient Tandem Biocatalytic Process for the Kinetic Resolution of Aromatic β -Amino Acids, *Adv Synth Catal* **2010**, *352*:1409-1412.
- ⁸ J. G. Mahdi, D. R. Kelly, *In Biotechnology*, 2nd Ed.; D.R. Kelly, Ed. VCH: Weinheim-New York, **2000**, Vol. *8b*, 41–171.
- ⁹ J. A. Kyndt, T. E. Meyer, M. ammonia lyase, a biosynthetic enzyme for the photoactive yellow protein. *FEBS Lett.* **2002**, *512*:240-255.
- ⁹ M. Baedeker, G. E. Schulz, Structures of two histidine ammonia-lyase modifications and implications for the catalytic mechanism. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*:1790-1797.
- ⁹ M. J. MacDonald, G. B. D_Cunha, A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochem. Cell Biol.* **2007**, *85*:273-282.
- ⁹ H. A. Cooke, S. D. Bruner, Probing the active site of MIO-dependent aminomutases, key catalysts in the biosynthesis of beta-amino acids incorporated in secondary metabolites. *Biopolymers.* **2010**, *93*:802-810.
- ⁹ J. Koukol, E. E. Conn, Metabolism of aromatic compounds in higher plants. *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*:2692-2698.
- ⁹ B. Wu, W. Szymanski, P. Wietzes, S. de Wildeman, G. J. Poelarends, B. L. Feringa and D. B. Janssen, Enzymatic Synthesis of Enantiopure α - and β -Amino Acids by Phenylalanine Aminomutase-Catalysed Amination of Cinnamic Acid Derivatives. *ChemBioChem* **2009**, *10*:338 – 344
- ⁹ B. Nestl, B. Nebel, B. Hauer, Recent progress in industrial biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology.* **2011**, *15*: 187-193.
- ⁹ K. Walker, K. Klettke, T. Akiyama, R. Croteau. Cloning, heterologous expression, and characterization of a phenylalanine aminomutase involved in Taxol biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 2004, *279*: 53947-53954.
- ⁹ N. Ratnayake, U. Wanninayake, J. Geiger, K. Walker, Stereochemistry and Mechanism of a Microbial Phenylalanine Aminomutase. *J. Amer. Chem. Soc.* **2011**, *133*:8531-8533.
- ⁹ H. Ritter, G. E. Schulz. Structural Basis for the Entrance into the Phenylpropanoid Metabolism Catalyzed by Phenylalanine Ammonia-Lyase. *Plant Cell*, **2004**, *16*:3426–3436. A. Cusanovich, J. J. Van Beumen, Characterization of a bacterial tyrosine

-
- ammonia lyase, a biosynthetic enzyme for the photoactive yellow protein. *FEBS Lett.* **2002**, *512*:240-255.
- ¹⁰ M. Baedeker, G. E. Schulz, Structures of two histidine ammonia-lyase modifications and implications for the catalytic mechanism. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*:1790-1797.
- ¹¹ M. J. MacDonald, G. B. D_Cunha, A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochem. Cell Biol.* **2007**, *85*:273-282.
- ¹² H. A. Cooke, S. D. Bruner, Probing the active site of MIO-dependent aminomutases, key catalysts in the biosynthesis of beta-amino acids incorporated in secondary metabolites. *Biopolymers.* **2010**, *93*:802-810.
- ¹³ J. Koukol, E. E. Conn, Metabolism of aromatic compounds in higher plants. *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*:2692-2698.
- ¹⁴ B. Wu, W. Szymanski, P. Wietzes, S. de Wildeman, G. J. Poelarends, B. L. Feringa and D. B. Janssen, Enzymatic Synthesis of Enantiopure α - and β -Amino Acids by Phenylalanine Aminomutase-Catalysed Amination of Cinnamic Acid Derivatives. *ChemBioChem* **2009**, *10*:338 – 344
- ¹⁵ B. Nestl, B. Nebel, B. Hauer, Recent progress in industrial biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology.* **2011**, *15*: 187-193.
- ¹⁶ K. Walker, K. Klettke, T. Akiyama, R. Croteau. Cloning, heterologous expression, and characterization of a phenylalanine aminomutase involved in Taxol biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 2004, *279*: 53947-53954.
- ¹⁷ N. Ratnayake, U. Wanninayake, J. Geiger, K. Walker, Stereochemistry and Mechanism of a Microbial Phenylalanine Aminomutase. *J. Amer. Chem. Soc.* **2011**, *133*:8531-8533.
- ¹⁸ H. Ritter, G. E. Schulz. Structural Basis for the Entrance into the Phenylpropanoid Metabolism Catalyzed by Phenylalanine Ammonia-Lyase. *Plant Cell*, **2004**, *16*:3426–3436.
- ¹⁹ G. V. Louie, M. E. Bowman, M. C. Moffitt, T. J. Baiga, B. S. Moore, J. P. Noel, Structural determinants and modulation of substrate specificity in phenylalanine-tyrosine ammonia-lyases. *Chem. Biol.* **2006**, *13*:1327–1338
- ²⁰ M. C. Moffitt, G. V. Louie, M. E. Bowman, J. Pence, J. P. Noel, *et al.* Characterization, Structural Discovery of Two Cyanobacterial Phenylalanine Ammonia Lyases: Kinetic and Structural Characterization. *Biochemistry*, **2007**, *46*:1004–1012.
- ²¹ T. F. Schwede, J. Rétey, G. E. Schulz, Crystal structure of histidine ammonia-lyase revealing a novel polypeptide modification as the catalytic electrophile. *Biochemistry.* **1999**, *38*:5355–5361.

-
- ²² K. R. Hanson, E. A. Havir. L-Phenylalanine ammonia-lyase: IV. Evidence that the prosthetic group contains a dehydroalanyl residue and mechanism of action. *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, *141*:1-17
- ²³ B. Wu, W. Szymanski, H. J. Wijma, C. G. Crismaru, S. de Wildeman, G. J. Poelarends, B. L. Feringa and D. B. Janssen. Engineering of an enantioselective tyrosine aminomutase by mutation of a single active site residue in phenylalanine aminomutase. *Chem. Commun.* **2010**, *46*:8157–8159
- ²⁴ N. J. Turner. Ammonia lyases and aminomutases as biocatalysts for the synthesis of alpha-amino and beta-amino acids. *Curr.Chem.Biol.* **2011**, *15*:234–240
- ²⁵ Susan Strom, Udayanga Wanninayake, Nishanka Dilini Ratnayake, Kevin D. Walker and James H. Geiger. Insights into the Mechanistic Pathway of the Pantoea agglomerans Phenylalanine Aminomutase. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 2952 –2956
- ²⁶ C. V. Christianson, T. J. Montavon, S. G. Van Lanen, B. Shen, S. D. Bruner. The Structure of L-Tyrosine 2,3-Aminomutase from the C-1027 Eneidyne Antitumor Antibiotic Biosynthetic Pathway *Biochemistry*, **2007**, *46*:7205-7214.
- ²⁷ M. Langer, A. Pauling, J. Rétey. The Role of Dehydroalanine in the Catalysis by Histidine Ammonia-Lyase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*:1464-1465.
- ²⁸ H. L. Levy. Phenylketonuria: old disease, new approach to treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* **1999**, *96*:1811-1813.
- ²⁹ D. Röther, D. Merkel, J. Rétey. Spectroscopic Evidence for a 4-Methylidene Imidazol-5-one in Histidine and Phenylalanine Ammonia-Lyases. *Angew Chem Int Ed.* **2000**, *39*:2462–2464.
- ³⁰ A. Gloge, J. Zon, A. Kövári, L. Poppe, J. Rétey. Phenylalanine Ammonia-Lyase: The Use of Its Broad Substrate Specificity for Mechanistic Investigations and Biocatalysis—Synthesis of L-Arylalanines. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*:3386–3390
- ³¹ S. Bartsch, U. T. Bornscheuer, Mutational analysis of phenylalanine lyase to improve reaction rates for various substrates. *Protein Engineering, Design and Selection* **2010**, *23*, 929-933.
- ³² C. Paizs, A. Katona, J. Rétey. Chemoenzymatic one-pot synthesis of enantiopure L-arylalanine from arylaldehydes. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1113-1116.
- ³³ S. L. Lovelock, R. C. Lloyd, and N. J. Turner, Phenylalanine Ammonia Lyase Catalyzed Synthesis of Amino Acids by an MIO-Cofactor Independent Pathway. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*:4652–4656
- ³⁴ a) L. Poppe, L. Novák, *Selective Biocatalysis: A Synthetic Approach*, VCH, Weinheim, 1992; b) *Biotechnology: Biotransformations I and II*, Vols. 8a and 8b, 2nd ed. (Eds.: H. J. Rehm, G. Reed, A. Puhler, P. Stadler, D. R Kelly), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**;
- ³⁵ a) J. Lalonde, A. Margolin in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Vol. 1 (Eds.: K. Drauz, H. Waldmann), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, pp. 172– 193; b) M. Biselli, U. Kragl, C. Wandrey in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Vol. 1 (Eds.: K. Drauz, H. Waldmann), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, pp. 194–258.

-
- ³⁶ R. C. Rodrigues, C. Ortiz, A. B. Murcia, R. Torres, R. F. Lafuente, Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*:6290–6307
- ³⁷ H. W. Yu, H. Chen, X. Wang, Y. Y. Yang, C. B. Ching, Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) with Controlled Particles: Application to *Candida Rugosa* Lipase. *J. Mol. Catal. B.* **2006**, *43*:124–127;
- ³⁸ C. Paizs, A. Katona, J. Rétey, The interaction of heteroaryl-acrylates and alanines with phenylalanine ammonia-lyase from parsley. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*:2739–2744
- ³⁹ F. Fülöp, T. A. Martinek, G. K. Tóth, Application of alicyclic β -amino acids in peptide chemistry. *Chem Soc Rev*, **2006**, *35*:323-334
- ⁴⁰ D. Seebach, J. Gardiner, β -Peptidic Peptidomimetics. *Acc Chem Res.* **2008**, *41*:1366-1375
- ⁴¹ L. Feng, U. Wanninayake, S. Strom, J. Geiger, and K. D. Walker, Mechanistic, mutational, and structural evaluation of a *Taxus* phenylalanine aminomutase. *Biochemistry.* **2011**, *50*:2919–2930.
- ⁴² C. Chesters, M. Wilding, M. Goodall and J. Micklefield, Thermal Bifunctionality of Bacterial Phenylalanine Aminomutase and Ammonia Lyase Enzymes. *Angew. Chem.* **2012**, *124*:4420–4424
- ⁴³ M.M. Heberling, B. Wu, S. Bartschand, B.D. Janssen, Priming ammonia lyases and aminomutases for industrial and therapeutic applications. *Current Opinion in Chemical Biology* **2013**, *17*:250–260.
- ⁴⁴ L. Poppe, C. Paizs, K. Kovács, F. D. Irimie, B. Vértessy, Preparation of unnatural amino acids with ammonia-lyases and 2,3-aminomutases. *Methods Mol Biol.* **2012**, *794*:3–19
- ⁴⁵ K. L. Klettke, S. Sanyal, W. Mutatu, and K. D. Walker, β -Styryl- and β -Aryl- β -alanine Products of Phenylalanine Aminomutase Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*: 6988-6989
- ⁴⁶ B. Wu, W. Szymanyski, G. G. Wybenga, M. M. Heberling, S. Bartsch, S. de Wildeman, G. J. Poelarends, B. L. Feringa, B. W. Dijkstra and D. B. Janssen. Mechanism-Inspired Engineering of Phenylalanine Aminomutase for Enhanced β -Regioselective Asymmetric Amination of Cinnamates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*:482–486
- ⁴⁷ N. D. Ratnayake, N. Liu, L. A. Kuhn, K. D. Walker, Ring-Substituted α -Arylalanines for Probing Substituent Effect on the Isomerization Reaction Catalyzed by an Aminomutase. *ACS Catal.* **2014**, *4*:3077-3090.
- ⁴⁸ N. D. Ratnayake, C. Theisen, T. Walter, K.D. Walker, Whole-cell biocatalytic production of variously substituted β -aryl- and β -heteroaryl- β -amino acids. *J Biotechnol.* **2016**, *217*:12-21.