

Universitatea Babeș-Bolyai
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică
Școala Doctorală de Chimie

**Fenilalanin amoniac-liaze native și
modificate rațional pentru sinteza L- și D-
aril-alaninelor nenaturale**

Rezumat Teză de Doctorat



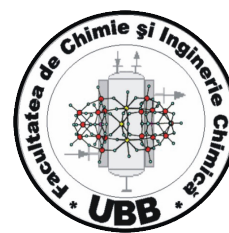
Doctorand: Alina FILIP

Conducător științific: Prof. Habil. Dr. Csaba PAIZS

Cluj-Napoca
2019



UNIVERSITATEA „BABEŞ-BOLYAI“
CLUJ-NAPOCA



FACULTATEA DE CHIMIE ȘI INGINERIE CHIMICĂ
Școala Doctorală de Chimie

Fenilalanin amoniac-liaze native și modificate rațional pentru sinteza L- și D-aril-alaninelor nenaturale

Rezumat Teză de Doctorat

Doctorand: Alina FILIP

Comisia:

Președinte: Prof. Dr. Florin-Dan IRIMIE – Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca

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

Referenți: Prof. Dr. Nicolaie DRAGOȘ – Facultatea de Biologie și Geologie, Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca

Prof. Dr. Dan SCUTARU – Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, Universitatea Tehnică Gheorghe Asachi, Iași

Prof. Dr. Valentin ZAHARIA – Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu, Cluj-Napoca

Susținere publică: 21 Iunie 2019, Cluj-Napoca

Cuprinsul tezei

Cuprins	3
Listă de abrevieri	9
Activitate științifică	15
Introducere	17
Obiectivele tezei	19
Capitolul I. Sisteme de exprimare și purificare	20
Subcapitol A. Exprimarea și purificarea fenilalanin amoniac-liazelor native și mutante originare din <i>Petroselinum crispum</i>	20
I. A.1. Studiu de literatură.....	20
I. A.1.1. Amoniac-liazele aromatice	20
I. A.1.2. Fenilalanin amoniac-liazele (PALs): surse și aplicații.....	21
I. A.1.3. Gruparea electrofilă MIO și alte caracteristici ale situsului catalitic	22
I. A.1.4. Mecanismul de acțiune al fenilalanin amoniac-liazelor.....	25
I. A.1.4.1. Eliminarea de tip E1cB	26
I. A.1.4.2. Atacul Friedel-Crafts	26
I. A.2. Rezultate și discuții.....	27
I. A.2.1. Mutageneza situs-direcționată.....	27
I. A.2.2. Exprimarea și purificarea proteinelor	30
I. A.2.2.1. Analiza SDS-PAGE.....	31
I. A.2.2.2. Cromatografia de excluziune sterică.....	32
I. A.2.3. Analiza denaturării termice a mutațiilor <i>PcPAL</i> folosind Prometheus NT.48..	33
I. A.3. Concluzii.....	36
I. A.4. Materiale și metode.....	37
I. A.4.1. Gene, vectori și enzime	37
I. A.4.2. Reactivi și materiale.....	37
I. A.4.3. Echipament pentru genetică și microbiologie, exprimare și purificare de enzime..	37
I. A.4.4. Mutageneza situs-direcționată.....	38
I. A.4.5. Multiplicarea celulelor competente XL1-Blue	41
I. A.4.6. Transformarea în celule gazdă <i>E. coli</i> XL1-Blue	41
I. A.4.7. Izolare de plasmidă, determinarea concentrației de ADN și secvențierea probelor	42
I. A.4.8. Multiplicarea celulelor competente Rosetta (DE3) pLyS	42
I. A.4.9. Transformarea în celule gazdă <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) pLyS	42
I. A.4.10. Exprimarea și purificarea proteinelor recombinare (native și mutante).....	44

I. A.4.10.1. Exprimarea și purificarea fenilalanin amoniac-liazelor	44
I. A.4.10.2. Liza celulară	44
I. A.4.10.3. Cromatografia de afinitate Ni-NTA	44
I. A.4.10.4. Cromatografia prin excluziune sterică	45
I. A.4.10.5. Determinarea concentrației de proteină.....	47
I. A.4.10.6. Analiza SDS-PAGE	48
I. A.4.11. Determinarea stabilității termice folosind tehnologia NanoDSF.....	48
Subcapitol B. Obținerea mutanților <i>PcPAL</i> fără eticheta 6xHis pentru cristalizarea proteinei în forma cea mai apropiată de cea naturală.....	50
I. B.1. Studiu de literatură. Proteaze. Proteaza Tobacco Etch Virus (TEV).....	50
I. B.2. Rezultate și discuții	52
I. B.2.1. Mutageneză situs-direcționată, izolarea și introducerea plasmidelor în celule competente	52
I. B.2.2. Identificarea, exprimarea și purificarea a <i>PcPAL</i> nativ și a patru mutanți de <i>PcPAL</i> cu îndepărtarea etichetei 6xHis	53
I. B.2.3. Exprimarea și purificarea enzimei TEV S219V.....	54
I. B.2.4. Îndepărtarea capătului 6xHis din forma nativă și din formele enzimatiche mutante prin digestie cu TEV S219V	56
I. B.2.5. Analiza stării de oligomerizare a enzimelor fără eticheta 6xHis prin cromatografie de excluziune sterică.....	57
I. B.2.6. Analizarea denaturării termice a mutanților <i>PcPAL</i> folosind Prometheus NT.48.....	60
I. B.2.7. Cristalizarea mutantului I460V- <i>PcPAL</i> fără eticheta 6xHis.....	61
I. B.3. Concluzii	63
I. B. 4. Materiale și metode.....	64
I. B.4.1. Celule gazdă și plasmide	64
I. B.4.2. Mutageneză situs-direcționată, izolarea și introducerea plasmidelor în celule competente	64
I. B.4.3. Exprimarea și purificarea a <i>PcPAL</i> nativ și a patru mutanți de <i>PcPAL</i> fără etichetă 6xHis.....	65
I. B.4.4. Exprimarea și purificarea enzimei TEV S219V.....	66
I. B.4.4.1. Liza celulară.....	66
I. B.4.4.2. Purificarea prin cromatografia de afinitate Ni-NTA.....	66
I. B.4.5. Îndepărtarea etichetei 6xHis din <i>PcPAL</i> prin digestia cu TEV S219V	67
I. B.4.6. Analiza Western Blot	68

Subcapitol C. Exprimarea și purificarea unor noi enzime MIO din <i>Pseudomonas fluorescens</i> R124	69
I. C.1. Studiu de literatură. Enzime MIO	
I. C.2. Rezultate și discuții	72
I. C.2.1. Exprimarea și purificarea fenilalanin 2,3-aminomutazelor aromatice (PAM), fenilalanin/histidin sau tirozin amoniac-liaze (XAL) și histidin amoniac-liaze (HAL), toate izolate din <i>Pseudomonas fluorescens</i> R124.....	72
I. C.2.1.1. Exprimarea și purificarea <i>PfPAM</i> , <i>PfXAL</i> și <i>PfHAL</i>	72
I. C.2.2. Temperatura de denaturare (T_m) și termostabilitatea globală a enzimelor <i>PfHAL</i> , <i>PfXAL</i> și <i>PfPAM</i>	74
I. C.3. Concluzii	76
I. C.4. Materiale și metode.....	77
I. C.4.1. Reactivi. Echipament. Material biologic.....	77
I. C.4.2. Exprimarea și purificarea enzimelor <i>PfHAL</i> , <i>PfXAL</i> și <i>PfPAM</i>	77
I. C.4.3. SDS-PAGE și caracterizarea termică a noilor enzime MIO	77
CAPITOLUL II. Sinteză chimică și biotransformări mediate de <i>wt-PcPAL</i> și variante mutante ale acesteia	78
Subcapitol A. Sinteză chimică a stiril-alaninelor ca substraturi noi pentru fenilalanin amoniac-liaze	78
II. A.1. Studiu de literatură	78
II. A.1.1. Metode chimice	78
II. A.1.2. Metode chemo-enzimatice.....	79
II. A.2. Rezultate și discuții	82
II. A.2.1. Sinteză chimică a substraturilor stiril-alaninice, <i>rac-1a-d</i> și <i>2a-d</i>	82
II. A.3. Concluzii	83
II. A.4. Materiale și metode	83
II. A.4.1. Reactivi și echipamente	83
II. A.4.2. Sinteză acrialaților (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-stirilici 2a-d (Schema 12).....	84
II. A.4.2.1 Sinteză esterilor stiril-acrilici 10a-d	84
II. A.4.2.2. Sinteză alcoolilor stirilici 8a-d	84
II. A.4.2.3. Sinteză acroleinelor stirilice 6a-d	84
II. A.4.2.4. Sinteză esterilor stiril-acrilici 4a-d	84
II. A.4.2.5. Sinteză acrialaților stirilici 2a-d	84
II. A.4.3. Sinteză aminoacizilor racemici <i>rac-1a-d</i>	86
II. A.4.3.1. Sinteză compușilor halogenați 9a-d	86
II. A.4.3.2. Sinteză derivaților de acid malonic 7a-d	68

II. A.4.3.3. Sinteza derivaților de acizi dicarboxilici 5a-d	87
II. A.4.3.4. Sinteza aminoacizilor racemici <i>rac-1a-d</i>	87
Subcapitol B. Extinderea domeniului de substraturi ale fenilalanin amoniac-liazelor din <i>Petroselinum crispum</i> spre stiril-alanine	88
II. B.1. Studiu de literatură: Importanța și aplicațiile enzimelor PAL și PAM.....	88
II. B.2. Rezultate și discuții.....	91
II. B.2.1. Studii inițiale privind activitatea <i>PcPAL</i> nativ și a mutațiilor F137X pentru stiril-alanine.....	91
II. B.2.2. CINETICĂ ENZIMATICĂ.....	93
II. B.2.3. Rezoluția cinetică și aplicațiile sintetice	94
II. B.2.4. Raționalizarea reacțiilor de stiril-alanine <i>rac-1a-d</i> catalizate de variante mutante de <i>PcPAL</i>	97
II. B.2.5. Producția de L-aril-alanine din acilații stirilici 2a-d în soluție apoasă de NH ₃ 6 M cu enzime <i>PcPAL</i>	98
II. B.3. Concluzii.....	99
Subcapitol C. Mutații ai fenilalanin amoniac-liazei construite rațional pentru sinteza L- și D-aril-alaninelor voluminoase	101
II. C.1. Studiu de literatură. Biocatalizatori PAL capabili de convertirea unei game voluminoase și valoroase din punct de vedere steric de L- și D-aril-alanine	101
II. C.2. Rezultate și discuții.....	104
II. C.2.1. Design rațional, stabilitatea și activitatea mutațiilor <i>PcPAL</i>	104
II. C.2.2. Testarea variantelor mutante singulare de <i>PcPAL</i> în reacțiile de eliminare a aril-alaninelor <i>rac-1a,e-l</i>	105
II. C.2.3. Testarea variantelor mutante singulare de <i>PcPAL</i> în reacțiile de adiție pe acizii cinamici 2a,e-l	105
II. C.2.4. Testarea variantelor mutante duble și triple de <i>PcPAL</i> în reacțiile de eliminare (<i>rac-1a,e-l</i>) și adiție (2a, e-l).....	107
II. C.2.5. Optimizarea tipului de biocatalizator utilizat și solubilizarea substraturilor testate.....	108
II. C.2.6. Aplicabilitatea preparativă a biotransformărilor mediate de <i>PcPAL</i>	109
II. C.2.7. Rezultatele computaționale și profilul depliei termice al <i>PcPAL</i> nativ și al F137A/I460V- <i>PcPAL</i> în prezența concentrațiilor mari de amoniac.....	111
II. C.2.8. Aplicabilitatea sintetică a mutațiilor raționale de <i>PcPAL</i> la scară preparativă	113
II. C.3. Concluzii.....	115
II. C.4. Materiale și metode pentru Subcapitolul B și Subcapitolul C	116
II. C.4.1. Materiale și metode.....	116

II. C.4.2. Instrumentația	116
II. C.4.3. Măsurători de activitate enzimatică (K_M , v_{max} , k_{cat}) - Subcapitol B.	117
II. C.4.5. Monitorizarea reacțiilor enzimatiche prin HPLC - Subcapitol B	118
II. C.4.5.1. Determinarea conversiei prin HPLC	118
II. C.4.5.2. Metode de HPLC pentru determinarea excesului enantiomeric (ee) al D- 1a-d	119
II. C.4.5.3. Analiza HPLC a produșilor finali de rezoluție cinetică ale <i>rac-1a-d</i> catalizate de F137V- <i>PcPAL</i>	120
II. C.4.5.4. Cromatogramă reprezentativă pentru L- 1a obținută pe coloană chirală HPLC Chiralpak Zwiix (+)	121
II. C.4.5.5. Reacția de eliminare a amoniacului din <i>rac-1a-d</i> la scară preparativă folosind <i>wt-PcPAL</i> și F137V- <i>PcPAL</i>	121
II. C.4.5.6. Investigarea adității de amoniac la acrilatii stirilici 2a-d folosind variante de <i>PcPAL</i> (nativ și mutante)	121
II. C.4.5.7. Tratarea <i>wt-PcPAL</i> cu borohidruță de sodiu	121
II. C.4.6. Metode analitice în cromatografia HPLC - Subcapitol C	122
II. C.4.6.1. Analiza denaturării termice la diferite concentrații de amoniac	122
II. C.4.6.2. Optimizarea sursei de amoniac în cazul adității de amoniac la 2f	122
II. C.4.6.3. Eliminarea amoniacului din <i>rac-1a,e-l</i> în condiții optimizate	122
II. C.4.6.4. Adiția de amoniac la 2a,e-k în condiții optimizate	123
II. C.4.6.5. Eliminarea amoniacului la scară preparativă din <i>rac-1a,e-g</i>	123
II. C.4.6.6. Adiția de amoniac la scară preparativă la 2a,e-g	124
II. C.4.7. Monitorizarea reacțiilor enzimatiche prin HPLC - Subcapitol C	124
II. C.4.7.1. Determinarea valorilor de conversie prin HPLC	124
II. C.4.7.2. Metode HPLC pentru determinarea excesului enantiomeric (ee) al D- și L- 1a,e-l	125
II. C.4.8. Efectul inhibitor al substratului 2l în reacția de eliminarea a amoniacului din L-Phe catalizată de <i>wt-PcPAL</i>	125
Concluzii generale	126
Supliment la teză	128
Referințe	160

Activitatea științifică

I. Articole pe baza cărora este construită teza

- 1. Filip A.,** ‡ Nagy E.Z.A., ‡ Tork S.D., Bánóczi G., Toşa M.I., Irimie F.D., Poppe L., Csaba P., Bencze L.C., Tailored mutants of phenylalanine ammonia-lyase from *Petroselinum crispum* for the synthesis of bulky L- and D-arylalanines, *ChemCatChem*, **2018**, *10*, 2627-2633. **IF 4.674**
ISSN 1867-3880
Scor relativ de influență = 1.899
- 2. Csuka P., Juhász V., Kohári Sz., Filip A., Varga A., Sátorhelyi P., Bencze P., Barton H.A., Paizs C., Poppe L.,** *Pseudomonas fluorescens* strain R124 encodes three different MIO-enzymes, *ChemBioChem*, **2018**, *19*, 411-418. **IF 2.774**
ISSN 1439-4227
Scor relativ de influență = 1.840
- 3. Bencze L.C., Filip A., Bánóczi G., Toşa M.I., Irimie F.D., Gellért Á., Poppe L., Paizs C.,** Expanding the substrate scope of phenylalanine ammonia-lyase from: *Petroselinum crispum* towards styrylalanines, *Organic and Biomolecular Chemistry*, **2017**, *15*, 3717-3727. **IF 3.423**
ISSN 1477-0520
Scor relativ de influență = 1.798
- 4. Dima N.A., Filip A., Bencze L.C., Oláh M., Sátorhelyi P., Vértessy B.G., Poppe L., Paizs C.,** Expression and purification of recombinant Phenylalanine ammonia-lyase from *Petroselinum crispum*, *Studia UBB Chemia*, **2016**, *LXI*, *2*, 21-34. **IF 0.244**
ISSN 1224-7154
Scor relativ de influență = 0.026
- 5. Filip A., Bencze L.C., Paizs C., Poppe L., Irimie F.D.,** MIO-enzyme toolbox: cloning, expression and purification of recombinant RtPAL, *Stud. Univ. Babeş-Bol. Sp. Iss.* **2015**, 39-43. BDI
Comunicare scurtă

‡ Autorii au contribuit în mod egal la această lucrare.

Cuvinte cheie: mutageneză situs-direcționată, exprimarea și purificarea proteinelor, fenilalanin-amoniac liaza, mutații proiectați rațional, enzime MIO, stiril-alanine, aril-alanine, biocataliză, rezoluție cinetică enzimatică.

Introducere

Aminoacizii sunt componente ale proteinelor, clasa de biomacromolecule cu funcționalitatea cea mai extinsă. Totodată, participarea lor la diferite secvențe metabolice îi implică în procese fundamentale ale organismului precum creștere, dezvoltare, reproducere, protecția imună și homeostazia celulară și a întregului organism.^{1, 2} Aceste rațiuni justifică numele de cărămizi ale vieții atribuit aminoacizilor.

Utilizarea practică a aminoacizilor naturali sau nenaturali, în direcții legate de obținerea de produse utile biologic sau de intermediari în industria organică de sinteză fină, reprezintă o continuă provocare orientată în primă instanță pe obținere.

Aminoacizii naturali pot fi accesibili prin izolarea lor din surse biologice sau prin sinteză chimică ori biochimică. Alternativa de obținere este cea determinată economic, și de durată. Aminoacizii nenaturali pot fi obținuți numai prin sinteză. Existența asimetriei moleculare, complexitatea structurii, dar și similaritatea cu aminoacizii naturali orientează sinteza către etape biocatalitice mai active, mai selective și mai compatibile cu ambientul și cu siguranță mai eficiente.

Utilizarea preparatelor enzimatiche mai mult sau mai puțin purificate, s-a impus ca practică atât în laboratoare de cercetare, dar și la scara industrială. Ea se bazează pe capacitatea acestora de a asista catalitic reacții, activ selectiv și curat o etapă de sinteză. Folosirea acestor biocatalizatori se bazează pe compromisul dihotomic dintre selectivitate și promiscuitate. Funcționarea unei anume enzime a fost optimizată de-a lungul milioanele de ani/generații prin secvențe repetitive mutație/selecție. O astfel de enzimă funcționează perfect pentru substratul său natural. Evident, performanțele acțiunii sale asupra unui analog nenatural vor fi inferioare. În condițiile în care utilizarea alternativei enzimatiche se impune, acest biocatalizator trebuie să fie adaptat noului substrat. Aceasta adaptare poate fi realizată fie prin mijloace raționale, utilizate în aceasta teză, fie prin mijloace evolutive. Fiecare dintre acestea prezintă plusuri și minusuri. Dată fiind complexitatea tabloului variabilelor independente, selecția este specifică.

Întreprinderea realizată a urmărit adaptarea, prin mijloace raționale, a funcționării **fenilalanin amoniac-liazei (PAL)** izolată din *Petroselinum crispum* la substraturi voluminoase. Inițial, paleta de substraturi acceptate de această enzimă, altele decât aminoacidul natural L-fenilalanina, era una modestă și cu randamente mici. Modificările de natură genetică aduse genei *pcpal*, reflectate în structura situsului catalitic au crescut toleranța enzimei pentru sinteza de L- și D -aril-alanine voluminoase și nu numai.^{3, 4}

Mutanții de fenilalanin amoniac-liază, ca F137V/A, I460V/A (mutanți singurari),⁵ mutanții multipli precum F137V/L138V, F137V/I460V, F137A/I460V sau F137V/L138V/I460V au îmbunătățit substanțial proprietățile catalitice comparativ cu enzima naturală.⁶

Substraturile voluminoase precum stiril-alaninele, (4-metoxifenil)-, (4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)-, ([1,1'-bifenil]-4-il)-, (naftalen-2-il)- și (5-feniltiofen-2-il)-alanine au fost acceptate în reacțiile de eliminare sau adiție de amoniac, producând o gamă largă de L- și D-aril-alanine.⁶

Pe lângă operațiile specifice sintezei organice a substraturilor, a proceselor biocatalitice, pe lângă procesele de inginerie genetică și de microbiologie aplicată, în scopul

înțelegerii efectelor obținute s-au utilizat și instrumente dedicate precum modelarea computațională, obținerea de difractograme X ale cristalelor unor mutanți în prezența diferitelor substraturi.

Datele obținute completează informațiile disponibile și deschid noi perspective privind zona de legare hidrofobă a enzimei PcPAL și corelarea între resturile de aminoacizi modificați și poziția substituentului voluminos.

Prin aceste rezultate, teza contribuie la cunoașterea enzimei **fenilalanin amoniac-liazei (PAL)** izolată din *Petroselinum crispum*, la extinderea spectrului de utilizare a acesteia, aducând contribuții metodologice particulare la întreg procesul de utilizare și adaptare a enzimei la structura substratului impus de utilizator.

Obiectivele tezei

Prezenta teză este structurată pe două mari capitole: Sisteme de exprimare și purificare, respectiv (I) Sinteza chimică a stiril-alaninelor și biotransformări mediate de *PcPAL* nativ și variantele mutante ale acesteia (II). Fiecare capitol este structurat pe trei subcapitole. Fiecare subcapitol este structurat în: studiu de literatură, materiale și metode, rezultate și discuții, respectiv concluzii.

1. Modificarea situsului catalitic al fenilalanin amoniac-liazei din *Petroselinum crispum* prin tehnici de inginerie genetică în vederea obținerii unor mutații cu activitate biocatalitică superioară (Subcapitol I A).
2. Îndepărtarea etichetei 6xHis în cazul a mai multor enzime mutante de *PcPAL* (I460V, F137A, F137A/I460V și Y110F/F137/I460V) folosind endopeptidaza TEV (Tobacco Etch Virus), în scopul obținerii de proteine cu grad mare de puritate pentru studii de cristalizare (Subchapter I B).
3. Exprimarea, izolarea și purificarea a trei noi enzime MIO: fenilalanin 2,3-amino-mutaza (*PfPAM*), fenilalanin/histidin/tirozin amoniac-liaza (*PfXAL*) și histidin amoniac-liaza (*PfHAL*) identificate în genomul bacteriei *Pseudomonas fluorescens* R124 (Subcapitol I C).
4. Sinteza chimică a stiril-alaninelor, noi substraturi pentru fenilalanin amoniac-liaza (Subcapitol II A).
5. Dezvoltarea rațională cu ajutorul mutagenzei situs-direcționate a unor mutații de *PcPAL* (F137/G/A/V-*PcPAL*) utili pentru sinteza L-stiril-alaninelor (Subcapitol II B).
6. Sinteza L- și D-arilalaninelor valoroase sintetic, folosind mutații de *PcPAL* proiectați rațional, care poartă mutații singulare sau multiple în regiunea hidrofobă de legare a substratului (Subcapitolul IIC).

CAPITOLUL I. Sisteme de exprimare și purificare

Subcapitol A. Exprimarea și purificarea fenilalanin amoniac-liazelor recombinante, native și mutante din *Petroselinum crispum*

I. A.2. Rezultate și discuții

I. A.2.1. Mutageneza situs-direcționată

Mutageneza situs-direcționată este o metodă rapidă și sigură, folosită pentru a modifica o genă la nivelul codonului dorit. Înlocuirea unui aminoacid cu unul dorit se realizează prin schimbarea unei nucleotide (două sau trei nucleotide) din codonul original cu o/unele nucleotide/nucleotidele corespunzătoare noului codon ce codifică aminoacidul dorit.

Alterarea de secvență este realizată prin reacții de PCR (reacția în lanț a polimerazei), folosind o pereche de amorse mutagenetice special concepute, care conțin nucleotida modificată.⁶

Figura 1 prezintă gelul de agaroză de 1% în care se pot observa spoturile corespunzătoare unor produși de polimerizare (conform descrierii), la aproximativ 8000 de perechi de baze.

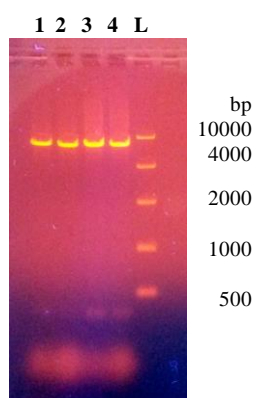


Figura 1. Electroforeza produșilor PCR în gel de agaroză din experimentele de mutageneză situs-direcționată: **1** – vectorul **pET-19b** care conține gena pentru *wt-PcPAL* (7817 kpb), **2** – reacția de PCR pentru mutantul **F137V-PcPAL**, **3** – reacția de PCR pentru mutantul **F137A-PcPAL**, **4** – reacția de PCR pentru mutantul **F137G-PcPAL**, **L** – ADN de control.

Produșii de polimerizare au fost transformați cu succes în celule competente *E.coli* XL1Blue pentru stocarea de plasmidă, urmând apoi extracția acesteia.

Confirmarea prezenței mutației dorite s-a realizat apelând la servicii externe de secvențiere a ADN-ului. După ce mutațiile au fost confirmate, plasmidele corespunzătoare au fost transformate cu succes în celule gazdă de exprimare *E.coli* Rossetta (DE3) pLysS.

I. A.2.2. Exprimarea și purificarea proteinelor

Pentru exprimarea fenilalanin amoniac-liazelor native și mutante s-au folosit celule gazdă *Escherichia coli* cu tulpina Rosetta (DE3) pLyS, utilizând ca vector de exprimare pET-19b *PcPAL* (**Figura 2a și 2b**).⁷

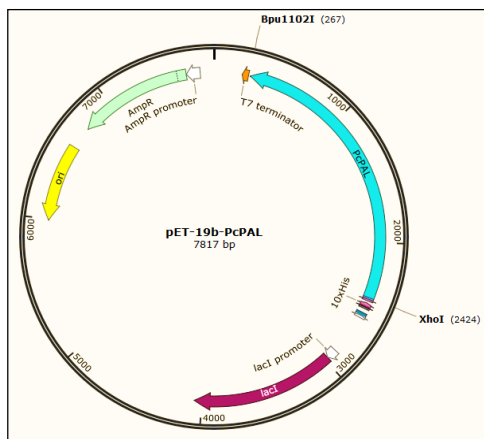


Figura 2a. Harta vectorului pET-19b-PcPAL.

```

MGHHHHHSGHIDDDDKHMLEMENGNGATTNGHVNGMDFCMKTEDPLY
WGIAAEAMTGSHLDEVKKMVAEYRKPVVKLGGETLTISQVA AISARDGSG
VTVELSEAAARAGVKASSDWMDSMNKGTDSYGVTTGFGATSHRRTKQGGA
LQKELIRFLNAGIFGNSSDNTLPHSATRAAMLVRIINTLLQGYSGIRFEIL
EAITKFLNQITPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPTG
VILSPEEAFKLAGVEGGFFELQPKEGLALVNGTAVGSGMASMVLFEANIL
AVLAEVMSAIFA EVMQ GKPEFTDHLTHK LKHHPGQIEAAAIMEHILDGSA
YVKAQK LHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRSSTKMIEREIN
SVNDNPLIDVSRNKAIHGGNFQGTPIGVSMDNTRLAIAAIGKLMFAQFSE
LVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLANPVTNH
VQS AEQHNQDVNSLGLISSRKTSEAVEILKLMSTFLVGLCQAIDLRHLE
ENLKSTVKNTVSSVAKRVLTMGVNDELHPSRFCEKDLLRVVDREYIFAYI
DDPCSATYPLMQKLRQTLVEHALKNGDNERNLSTSI FQKIATFEDELKAL
LPKEVESARA ALESGNPAI PNRIEECRSYPLYKFVRKELGTEYLTGEKVT
SPGEEFEKVF IAMS KGEI IDPLLESLESWNGAPLPIS-AEQ-LA-
PLGASKR
  
```

Figura 2b. Secvența de aminoacizi a wt-PcPAL-ului cu eticheta N-terminală 6×His (verde) și situsul de scindare enterokinazic (albastru).

Exprimarea proteinei a fost indusă cu IPTG (izopropil β-D-1-tiogalactopiranozidă) la OD₆₀₀ 0.7-0.8, fiind urmată de perfectarea fermentației peste noapte la 25 °C.

Purificarea s-a realizat prin cromatografie de afinitate Ni-NTA conform protocolului descris de producător. Proteina PcPAL etichetată cu secvența 6×His la capătul N-terminal a fost eluată cu o soluție de imidazol de 250 mM.

I. A.2.2.1. Analiza SDS-PAGE

Etapele de exprimare și purificare a enzimei au fost monitorizate prin SDS-PAGE și vizualizate cu Coomassie Blue R 250.

În coloana 13 a gelului de poliacrilamidă 10% (**Figura 3**) se poate observa o bandă pronunțată de puritate ridicată cu masa aproximativă de 80 kDa corespunzătoare monomerului PcPAL F137V.

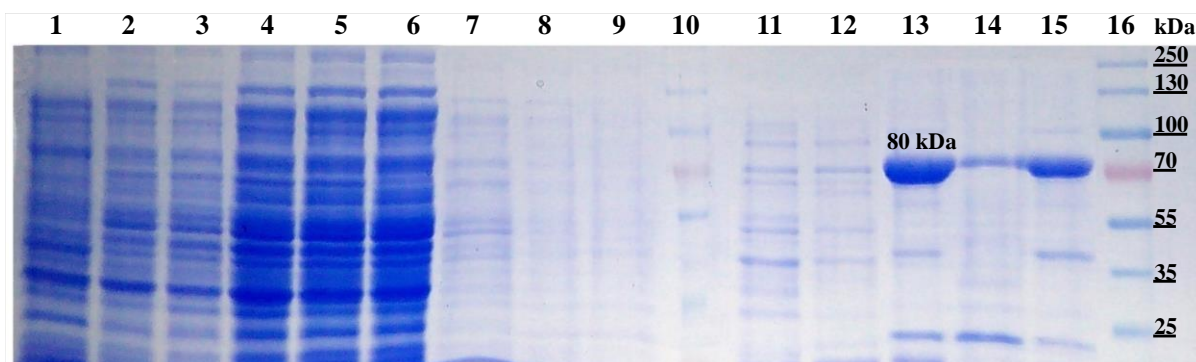


Figura 3. Gelul SDS-PAGE 10% al probelor din etapele de purificare a F137V-PcPAL. **1** – preinducție celulară **2** – postinducție celulară, **3** – lizat celular, **4** – reziduu lizat celular, **5** – supernatant după centrifugarea lizatului, ***6** – probă după trecerea supernatantului prin coloana de Ni-NTA, ***7** – eluare cu soluție slab salină (30 mM KCl și 50 mM HEPES), ***8** – eluare cu soluție puternic salină (300 mM KCl și 50 mM HEPES), ***9** – eluare cu soluție slab salină (30 mM KCl și 50 mM HEPES), ***10** – markeri moleculari (control), ***11** – fracția eluată cu imidazol 25 mM, ***12** – fracția eluată cu imidazol 50 mM, ***13** – fracția eluată cu imidazol 250 mM (fracție proteică pură), ***14** – fracția eluată cu imidazol 1 M, **15** – soluție enzimatică după dializă și **16** – markeri moleculari (control).

* probe din etapa de purificare folosind cromatografia de afinitate Ni-NTA

I. A.2.2.2. Cromatografia de excluziune sterică

Fiecare enzimă obținută a fost analizată prin cromatografie de excluziune sterică (utilizând o coloană analitică Superdex 200 5/150 GL). S-a recurs la purificarea la scară preparativă a enzimelor (cu o coloana preparativă Superdex 200 10/300 GL) în vederea efectuării studiilor cinetice ce impun utilizarea biocatalizatorilor cu un grad de puritate ridicat.

Majoritatea mutațiilor *PcPAL* obținuți au avut un grad ridicat de puritate așa cum reiese din cromatogramele de excluziune sterică a mutațiilor *PcPAL* I460V și *PcPAL* F137A/L138A/I460A prezentate în **Figura 4**.

Conform ecuației drepte a curbei de calibrare determinată în prealabil, semnalul dintre 1.3–1.6 mL cu o intensitate maximă la 1.48 mL, corespunde formei tetramerice a enzimelor *PcPAL*, cu masa moleculară de aproximativ 320 kDa.

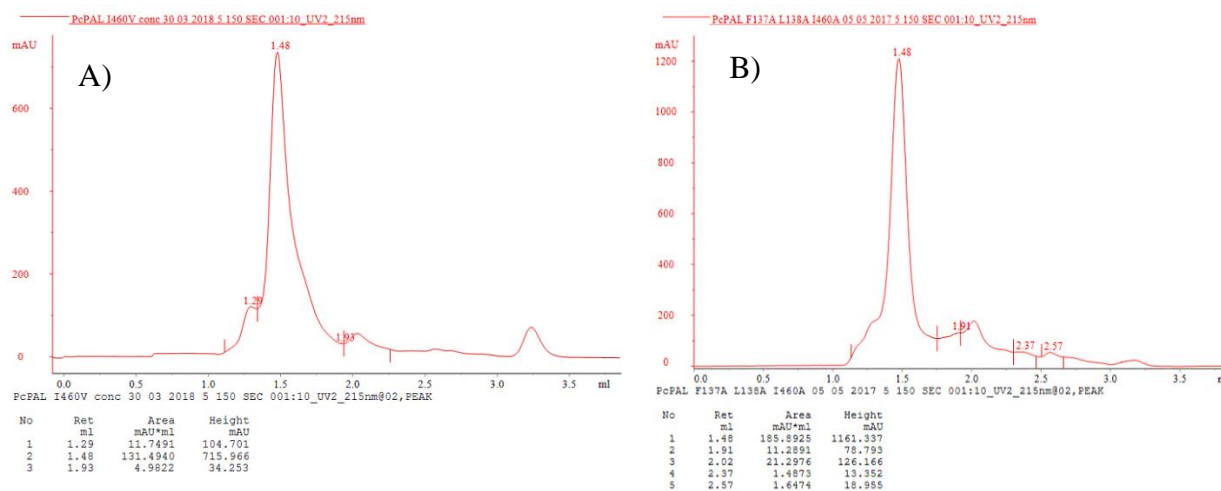


Figura 4. Cromatograme reprezentative obținute la analiza purității și stării de oligomerizare a enzimelor folosind coloana de excluziune sterică Superdex 200 5/150 GL: **A.** I460V-*PcPAL*, **B.** F137A/L138A/I460A-*PcPAL* purificate prin cromatografie de afinitate Ni-NTA, după dializă și concentrare (3 mg/mL).

I. A.2.3. Analiza denaturării termice a mutațiilor *PcPAL* folosind Prometheus NT.48

Pentru determinarea stabilității proteinei native *wt-PcPAL* și a mutațiilor acesteia a fost utilizată fluorimetria de scanare diferențială (NanoDSF)⁸, care permite determinarea temperaturii de denaturare (T_m) a proteinelor. Ca urmare a mutației, enzimele pot suferi schimbări structurale semnificative care pot fi evidențiate prin compararea valorii T_m specifice mutațiilor cu cea a enzimei native.

Tabelul 1. Temperatura de denaturare (T_m) a variantelor de *PcPAL*.

Nr. Crt.	<i>PcPAL</i>	T_m (°C)
1	nativ	75.1±0.2
2	L134A	70.2±0.5
3	L134V	72.6±0.2
4	F137G	74.2±0.3
5	F137A	76.2±0.2
6	F137V	73.5±0.4
7	L138A	72.3±0.2
8	L138V	68.4±0.3
9	L206A	72.6±0.8
10	L206V	74.4±0.5
11	L256A	72.9±0.7
12	L256V	73.1±0.5
13	I460A	51.3±0.8
14	I460V	74.2±0.2
15	F137A/I460V	74.4±0.4
16	F137A/I460A	51.8±0.9
17	F137V/I460A	51.8±0.8
18	F137V/I460V	71.7±0.3
19	F137A/L138V	70.9±0.4
20	F137A/L138A	75.3±0.3
21	F137V/L138A	73.0±0.3
22	F137V/L138V	71.1±0.5
23	L134V/F137A	73.8±0.2
24	F137V/L138V/I460V	70.7±0.6
25	F137A/L138V/I460V	72.3±0.2
26	F137A/L138A/I460V	69.8±0.5
27	F137A/L138A/I460A	62.1±0.7
28	F137A/L138V/I460A	52.2±0.9
29	F137A/S203A/I460V	72.2±0.2

Conform datelor din **Tabelul 1**, mutații au prezentat diferite grade de stabilitate termică. Temperatura de denaturare a enzimei native s-a înregistrat la 75 °C. F137A-*PcPAL* a prezentat o depliere la o temperatură puțin mai ridicată în comparație cu enzima nativă (76 °C vs. 75 °C), însă nesemnificativă din punct de vedere statistic.

Valorile T_m ale mutațiilor F137V-, F137A-, I460V- și F137A/I460V- *PcPAL* au fost mai scăzute doar cu 2-3 °C decât cea a *wt-PcPAL*-ului, acestea fiind și cele mai active enzime în transformarea substraturilor testate.

În schimb mutații I460A-, F137A/I460A-, F137V/I460A- și F137A/L138V/I460A *PcPAL*, caracterizați de o stabilitate termică redusă, respectiv scăderea T_m cu 23-24 °C față de

wt-PcPAL (**Figura 5**), s-au dovedit a fi mai puțin eficienți în biotransformarea analogilor nenaturali ai fenilalaninei.

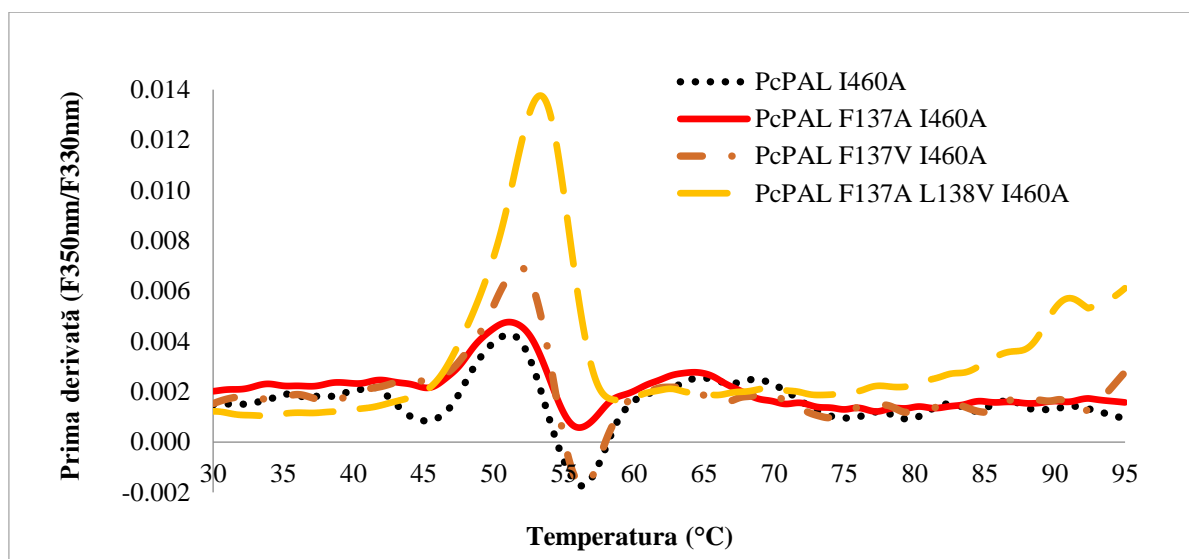


Figura 5. Denaturarea termică a variantelor de *PcPAL* ce conțin mutația I460A. Temperatura de denaturare (T_m) variază de la 51 la 52 °C.

Alte mutații singulare ale resturilor L134, L138, L206, L256 nu au provocat probabil o schimbare conformațională globală a proteinei; valorile T_m cuprinse între 69-74 °C fiind doar puțin scăzute față de enzima nativă.

I. A.3. Concluzii

S-a obținut o colecție de 28 forme mutante ale fenilalanin amoniac-liazei originară din *Petroselinum crispum*, prin mutageneză situs-direcționată. Toți mutații au fost exprimați și purificați cu puritate și omogenitate ridicată, așa cum s-a demonstrat prin SDS-PAGE și cromatografie de excluziune sterică.

Măsurătorile de fluorimetrie diferențială ale mutațiilor singulare sau multiple ce conțin restul I460A, au evidențiat o scădere semnificativă a T_m (51 °C) în comparație cu *PcPAL* nativ (75.1 °C ± 0.2). Cele mai active variante mutante ale *PcPAL*-ului prezintă o valoare de T_m cupinsă între 72-76 °C.

Subcapitol B. Obținerea mutațiilor *PcPAL* fără eticheta de hexa-histidină pentru cristalizarea proteinei în forma cea mai apropiată de cea naturală

I. B.2. Rezultate și discuții

I. B.2.1. Mutagenza situs-direcționată, izolarea și introducerea plasmidelor în celule competente

Plecând de la șablonul pET15b_*PcPAL*, care conține un situs de scindare pentru endopeptidaza TEV, am încercat să obținem patru tipuri diferite de mutații. Primerii mutagenetici utilizați au fost aceiași ca și în cazul șablonului pET19b_*PcPAL*.

Scopul a fost obținerea enzimelor mutante *PcPAL*, cu etichetă His detașabilă.

Gena *pcpal* recombinată introdusă în constructul plasmidic pET19b_*PcPAL*, conține la capătul *N*-terminal o secvență adițională, lungă de 21 aminoacizi incluzând eticheta 6xHis, care ar putea afecta plierea proteinei. Astfel, pentru studiile de cristalizare, am înlăturat cei 21 de aminoacizi de la capătul *N*-terminal al enzimei *PcPAL*, ca să o aducem mai aproape de structura originală a proteinei.

După expresia, purificarea și îndepărtarea etichetei 6xHis din *PcPAL* nativ și respectiv din *PcPAL*-urile mutante folosind endopeptidaza TEV, enzimele vor fi utilizate pentru cristalizarea lor în prezența mai multor analogi sintetici ai fenilalaninei sau a cinamaților corespunzători (de exemplu: stiril-, 4-metoxifenil-, 4-nitrofenil-, naftalen-2-il- sau bifenil-4-il), care au fost acceptate ca substraturi de către mutanți, dar nu au fost transformate de către *wt-PcPAL*, ceea ce ne poate oferi informații despre interacțiunile enzimă-substrat.

I. B.2.3. Exprimarea și purificarea enzimei TEV S219V

Exprimarea și purificarea enzimei a fost studiată prin tehnica SDS-PAGE. Enzima TEV, având o masă moleculară de aproximativ 29 kDa, a fost eluată cu o soluție de imidazol (300 mM-1M) de pe coloana de afinitate Ni-NTA cu o puritate mare (~ 90% pe SDS-PAGE, coloana 9 – **Figura 6**).

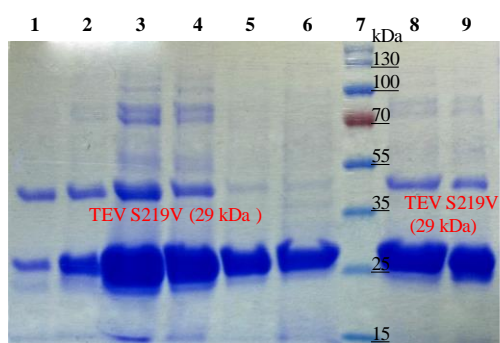


Figura 6. Etapele de eluare (optimizarea eluării) a enzimei **TEV S219V**. **1** – fracție eluată cu o soluție de imidazol de 100 mM, **2** – fracție eluată cu o soluție de imidazol de 200 mM, **3** – fracție eluată cu o soluție de imidazol de 300 mM, **4** – fracție eluată cu o soluție de imidazol de 400 mM, **5** – fracție eluată cu o soluție de imidazol de 500 mM, **6** – fracție eluată cu o soluție de imidazol de 1M, **7** – marker (control), **8** – amestecul fracțiilor **3**, **4** și **5** înainte de dializă, **9** – amestecul fracțiilor **3**, **4** și **5** după dializă.

Enzima a fost exprimată într-o cantitate mare (2 mg/mL) și utilizată imediat la îndepărtarea etichetelor histidinice a *wt-PcPAL*-ului sau a fost stocată la -80 °C în 20% glicerol.

I. B.2.4. Îndepărtarea capătului 6xHis a enzimelor *PcPAL* prin digestie cu TEV S219V

Eliminarea etichetei de afinitate a fost efectuată la 4 °C, folosind 2 mg de soluție de enzimă *PcPAL* și 0.2 mg de soluție de enzimă TEV aduse la un volum final de 2 mL cu soluție Tris (50 mM Tris și 300 mM NaCl, 20% glicerol, pH 8.0) fără agitare.

Soluția enzimatică de *PcPAL* fără eticheta 6xHis a fost purificată folosind o coloană de afinitate Ni-NTA, cu un randament de 50-55%, urmată de dializa acesteia într-o soluție de Tris 20 mM și NaCl 100 mM la pH 8.0.

I. B.2.5. Analiza stării de oligomerizare și cromatografia de excluziune sterică

Starea de oligomerizare⁹ a enzimelor obținute a fost verificată pe o coloană Superdex 200 5/150 GL. Profilul de eluție a proteinelor mutante poate fi observat în cromatogramele din **Figura 7**. Conform ecuației din curba de calibrare, semnalul cuprins între 1.4-1.6 mL, cu intensitatea maximă la 1.49 mL, corespunde formei tetramerice a enzimei *PcPAL* cu o masă moleculară de 320 kDa.

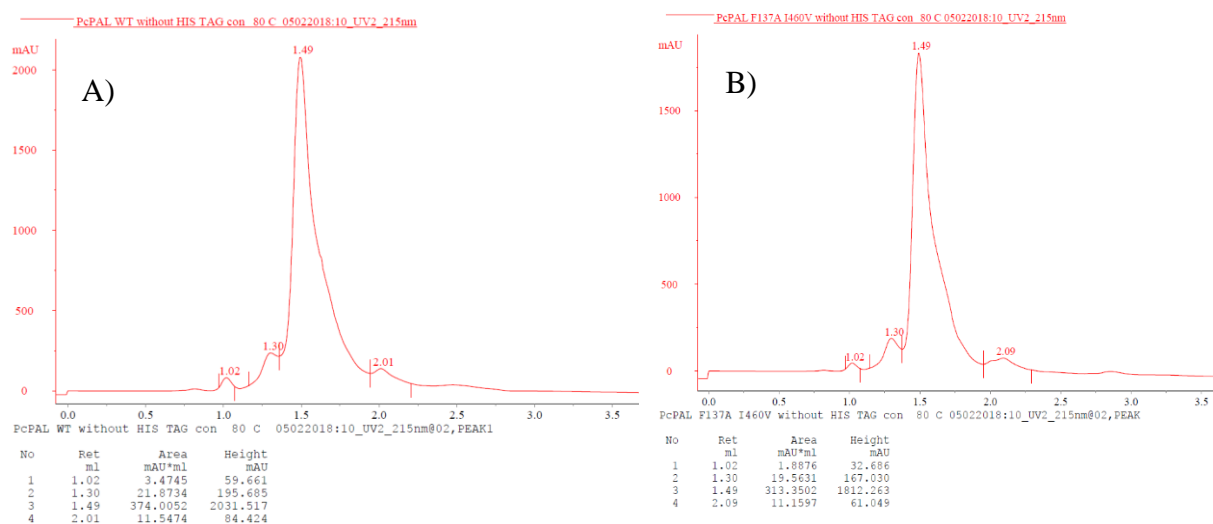


Figura 7. Cromatograma reprezentativă a enzimei după etapa de dializă și cea de concentrare utilizând coloana de excluziune sterică Superdex 200 5/150 GL: **A).** *wt-PcPAL* fără eticheta 6xHis (10 mg/mL) și **B)** F137A/I460V-*PcPAL* fără eticheta 6xHis (8 mg/mL).

I. B.2.6. Analizarea denaturării termice a mutațiilor *PcPAL* lipsiți de eticheta 6xHis

S-au determinat temperaturile de denaturarea a enzimei native *PcPAL* și a mutațiilor I460V-, F137A-, F137A/I460V- și Y110F/F137/I460V-*PcPAL* lipsiți de eticheta 6xHis în intervalul 73-74.6 °C. Se observă o scădere cu 2 °C pentru *PcPAL* nativ și F137A- *PcPAL* față de omologii lor cu capătul hexa-histidinic (**Tabelul 2**).

Tabelul 2. Temperaturile de denaturare (T_m) ale *wt*- și I460V-, F137A-, F137A/I460V- și Y110F/F137/I460V-*PcPAL*.

Nr.	<i>PcPAL</i>	T_m (°C)
1	nativ (<i>wt</i>)	73.0±0.2
2	I460V	74.2±0.5
3	F137A	74.6±0.5
4	F137A/I460V	73.7±0.2
5	Y110F/F137A/I460V	73.5±0.2

I. B.3. Concluzii

Expresia, purificarea și îndepărtarea etichetei 6xHis de la capătul *N*-terminal a fost realizată cu succes în cazul mai multor *PcPAL*-uri mutante, obținându-se șarje de soluții proteice cu grad ridicat de puritate și omogenitate. Nu au fost semnalate schimbări semnificative în stabilitatea termică a enzimelor după înlăturarea etichetei de afinitate.

Enzimele *PcPAL* lipsite de eticheta 6xHis au permis inițierea experimentelor de cristalizare a proteinelor cu diferiți liganzi.

Subcapitol C. Exprimarea și purificarea de noi enzime MIO din *Pseudomonas fluorescens* R124

I. C.2. Rezultate și discuții

I. C.2.1. Exprimarea și purificarea fenilalanin 2,3-aminomutazelor aromatice (PAM), fenilalanin/histidin sau tirozin amoniac-liazelor (XAL) și histidin amoniac-liazelor (HAL) din *Pseudomonas fluorescens* R124

I. C.2.1.1. Exprimarea și purificarea enzimelor PAM, XAL și HAL

Folosind metoda generală pentru fermentația, izolarea și purificarea enzimelor MIO-dependente, dar ușor adaptată, proteinele *PfHAL*, *PfXAL* și *PfPAM* cu capătul *N*-terminal His au fost obținute și depozitate în soluție apoasă cu un conținut de 15% glicerină la -20 °C fără pierderea activității. Puritya tuturor enzimelor a fost verificată pe gel de poliacrilamidă 12% (**Figura 8**).

Pentru fiecare enzimă fracțiunile eluate de pe coloana Ni-NTA corespunzătoare benzilor pronunțate cu masa de 60 kDa au fost analizate și prin eluarea lor pe o coloană cromatografică de excluziune sterică, pentru a verifica omogenitatea proteinelor (**Figura 9**). Toate enzimele exprimate și izolate au prezentat un grad înalt de puritate și omogenitate ~ > 85%.¹¹

Masa moleculară a enzimelor MIO a fost determinată pe baza curbei de calibrare determinată în prealabil (**Tabelul 3**).

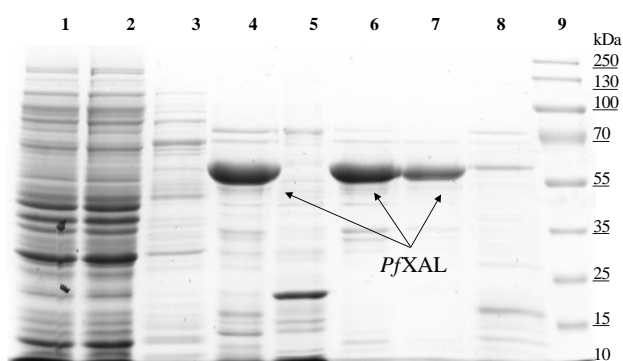


Figura 8. Gel SDS-PAGE al probelor din etapele de purificare a enzimei *PfXAL*. **1** – supernatant după centrifugarea lizatului celular, **2** – probă după trecerea supernatantului prin coloana de Ni-NTA, **3** – eluare cu soluție slab salină (30 mM KCl și 50 mM HEPES), **4** – fracție eluată cu o soluție de imidazol 300 mM, **5** – fracție eluată cu o soluție de imidazol 50 mM, **6** – prima sarjă de proteină dializată, **7** – a doua sarjă de proteină dializată, **8** – fracție eluată cu imidazol 1 M, **9** – marker (control).

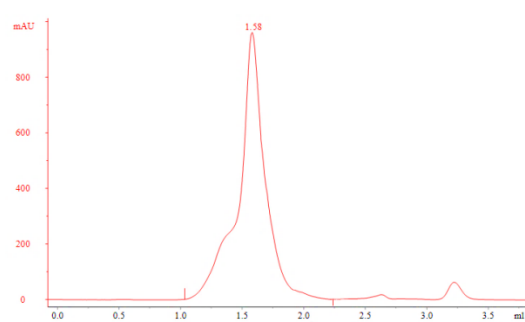


Figura 9. Cromatogramă reprezentativă a enzimei *PfHAL*, folosind coloana de excluziune sterică Superdex 200 5/150 GL. Frația cu volumul de retenție de 1.2-1.5 mL reprezintă forma agregată a enzimei, iar fracția cu volum de retenție de 1.5-1.8 mL reprezintă forma nativă, tetramerică.

Tabelul 3. Rezultatele analizei cromatografice de excluziune sterică folosind coloana Superdex 200 150/5 GL pentru determinarea masei moleculare a enzimelor *Pf*-MIO.

Cod	Masa moleculară determinată experimental (Daltoni)	Masa moleculară calculată a tetramerului (Daltoni)	Masa moleculară calculată a monomerului (Daltoni)
<i>Pf</i> HAL	204046	222000	55500
<i>Pf</i> XAL	211948	228000	57000
<i>Pf</i> PAM	228681	233600	58400

I. C.2.2. Temperatura de denaturare (T_m) a enzimelor *Pf*HAL, *Pf*XAL și *Pf*PAM

Tabelul 4. Temperatura de topire (T_m) a *Pf*HAL, *Pf*XAL și *Pf*PAM-ului

Enzima	T_m (°C)
<i>Pf</i> PAM	81.8 ±0.3
<i>Pf</i> XAL	87.0±0.4
<i>Pf</i> HAL	>90 nu poate fi determinat

I. C.3. Concluzii

Enzimele MIO: fenilalanin 2,3-aminomutaza (PAM), fenilalanin/histidin sau tirozin amoniac-liaza (XAL) și histidin amoniac-liaza (HAL) identificate în genomul bacteriei *Pseudomonas fluorescens* R124 au fost exprimate și izolate cu succes folosind celule *Escherichia coli*, tulpina Rosetta (DE3) pLyS.

CAPITOLUL II. Sinteza chimică și biotransformări mediate de *wt-PcPAL* și variante mutante ale acesteia

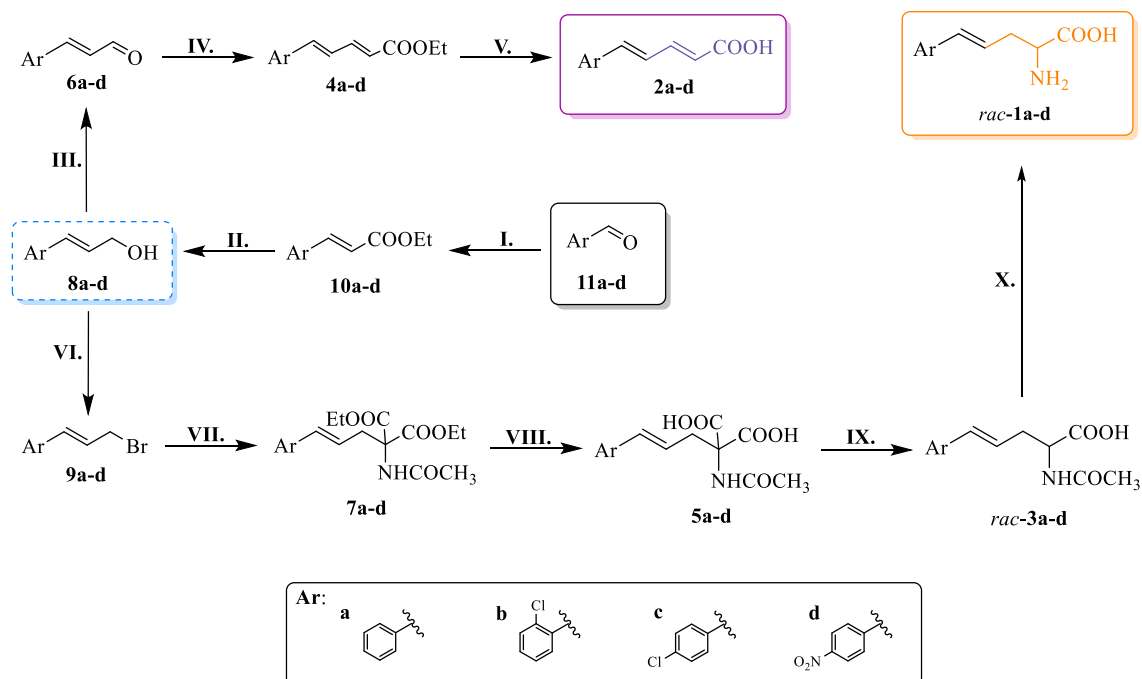
Subcapitol A. Sinteza chimică a stiril-alaninelor racemice ca substraturi noi pentru fenilalanin amoniac-liaze

II. A.2. Rezultate și discuții

II. A.2.1. Sinteza chimică a substraturilor stiril-alaninice *rac-1a-d* și *2a-d*

Aldehidele disponibile comercial **11a-d** au fost transformate prin reacția Wittig în esterii acrilici **10a-d**. Prin reducerea lor cu DIBAL-H s-au obținut (*E*)-3-fenilprop-2-en-1-olii **8a-d** care au fost oxidați cu dioxid de mangan la stirilaldehydele **6a-d**. Din aceștia, cu ajutorul reacției Wittig s-au sintetizat esterii etilici ai stirilacrilatilor **4a-d**. Hidroliza alcalină a acestora, urmată de acidifierea mediului de reacție a permis izolarea acizilor stiril acrilici **2a-d**.

Compușii bromurați **9a-d** obținuți din alcoolii stirilici **8a-d** au servit ca agenți de alchilare a 2-*N*-acetamido-dietil-malonatului. Prin hidroliza chemoselectivă bazică a produșilor de cuplare formați **7a-d** s-au pus în liberate acizii malonici 2-disubstituiți **5a-d**, din care prin decarboxilare termică s-au format racemații stirilalaninelor *N*-acilate *rac-3a-d*. În final, stirilalaninele racemice *rac-1a-d* au fost obținute prin hidroliza acidă a grupărilor amidice din *rac-3a-d*. (Schema 1)



Schema 1. Sinteza acrilatilor (*2E,4E*) stirilici **2a-d**. Reactivi și condiții: **I.** $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{Et}$, toluen, reflux, 24 ore; **II.** DIBAL-H/ CH_2Cl_2 la -60°C , 1 ore; **III.** $\text{MnO}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 25°C , 48 ore; **IV.** $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{Et}$, toluen, reflux, 24 ore; **V.** 10% KOH, reflux, 20 ore, cu acidifiere la pH 1.0. Sinteza stiril-alaninelor racemice *rac-1a-d*. Reactivi și condiții: **VI.** $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{Et}$, $\text{C}_4\text{H}_4\text{BrNO}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 25°C , 2 ore; **VII.** NaH, $\text{CH}_3\text{CONHCH}(\text{CO}_2\text{Et})_2/\text{DMF}$, 60°C , 3 ore; **VIII.** 10% NaOH în apă/MeOH, 60°C , 5 ore; **IX.** toluen, reflux, 20 h; **X.** dioxan/18% HCl, reflux, 4 ore.

II. A.3. Concluzii

A fost realizată sinteza chimică a acrilatilor stirilici **2a-d** și a aminoacizilor racemici corespunzători *rac-1a-d*, care au fost apoi testați ca substraturi potențiale în reacțiile de eliminare și de adiție a amoniacului catalizate de *wt-PcPAL* și formele mutante F137X-*PcPAL*.

Subcapitol B. Includerea stiril-alaninelor în domeniul de substraturi al *PcPAL*-ului prin modificarea structurii native a enzimei prin tehnici de mutagenză situs-direcționată

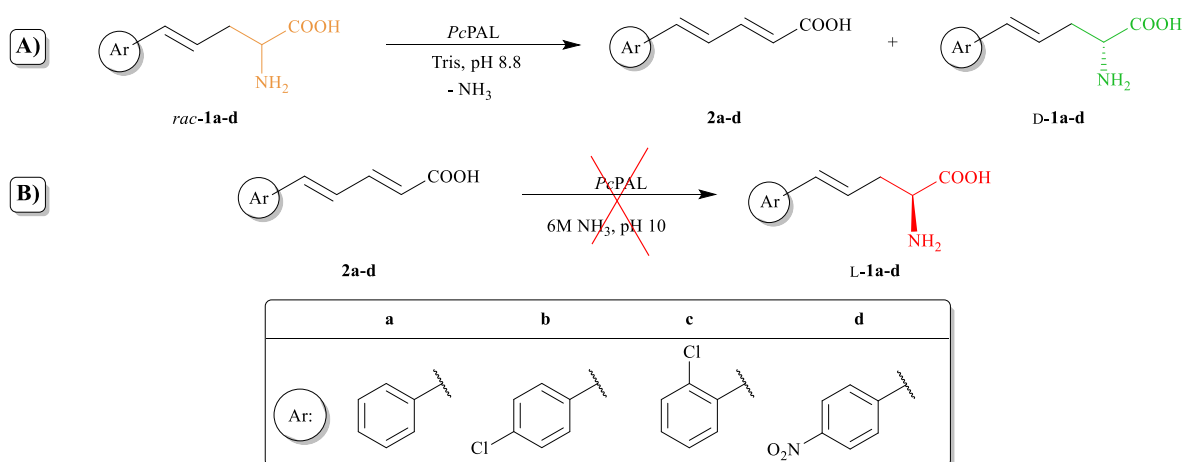
II. B.2. Rezultate și discuții

II. B.2.1. Studii inițiale ale interacției *wt-* și F137X-*PcPAL*-ului cu stiril-alanine

Datorită abilității enzimei *PcPAL* de a transforma o gamă largă de aril-alanine și hetero-arilalanine, în vederea extinderii domeniului de substrat al acestei enzime și pentru compușii cu substituenți voluminoși și cu lungime extinsă, s-a testat în prima etapă interacția stiril-alaninelor (*rac-1a-d*) cu *wt-PcPAL*.

Mai întâi s-au efectuat studii de cinetică Michaelis-Menten pentru reacția de eliminare a amoniacului din L-stiril-alanina **L-1a** catalizată de *wt-PAL*. S-a monitorizat viteza de formare a produsului obținut (acidul (2*E*, 4*E*)-5-fenilpenta-2,4-dienic (**2a**)) prin spectroscopie UV, dar și prin cromatografie HPLC. Mai mult, prezența produsului **2a** în mediul de reacție a fost evidențiată și prin spectrometrie ¹H-RMN.

Pentru reacția de eliminare a amoniacului din **L-1a** valoarea k_{cat} a fost de 14 ori mai mică decât cea obținută în prezența substratului natural L-Phe, în timp ce valoarea raportului k_{cat}/K_M pentru transformarea **L-1a** a fost de 777 de ori mai mică decât cea calculată pentru deaminarea L-Phe (**Tabelul 5**).



Scheme 2. (A) Sinteza enantiomer selectivă a D-stiril-alaninelor (**D-1a-d**) prin reacția de deaminare a *rac-1a-d* și (B) a **L-1a-d** prin adiția amoniacului la acrilatii stirilici **2a-d**, mediată de *PcPAL* nativ și mutați.

Datele de modelare moleculară au oferit o explicație pentru activitatea enzimatică scăzută în prezența noului substrat, respectiv interacțiunea dezavantajoasă dintre inelul aromatic al intermediarului de reacție *N-MIO-L-1a* și gruparea fenil a fenilalaninei F137, parte a buzunarului hidrofob al situsului catalitic din *wt-PcPAL*.

Imaginile **A** și **B** din **Figura 10** ilustrează trei aranjamente posibile ale intermediarului *N*-MIO-L-**1a**, dintre care două sunt aparent active și amintesc de legarea substratului natural, fenilalanina, la situsul activ al *PcPAL*-ului.⁵

Astfel, produsul (*2E,4E*)-dienic se poate obține din doi conformeri ai intermediarului *N*-MIO și anume, din cel *s-cis* [denumit *pro-s-cis* (*psc*)] - abreviat L-**1a**_{psc} respectiv din cel *s-trans* [denumit *pro-s-trans* (*pst*)] - abreviat L-**1a**_{pst}.

Din al treilea conformer (L-**1a**_u) ilustrat în imaginea **B**, care adoptă o aranjare mai relaxată, restul stiliric al substratului fiind mai îndepărtat de F137 s-ar obține acidului (*2Z,4E*)-5-fenilpenta-2,4-dienic, produs care nu a fost însă detectat în amestecul de reacție. Astfel, L-**1a**_u poate fi considerată o stare neproductivă.

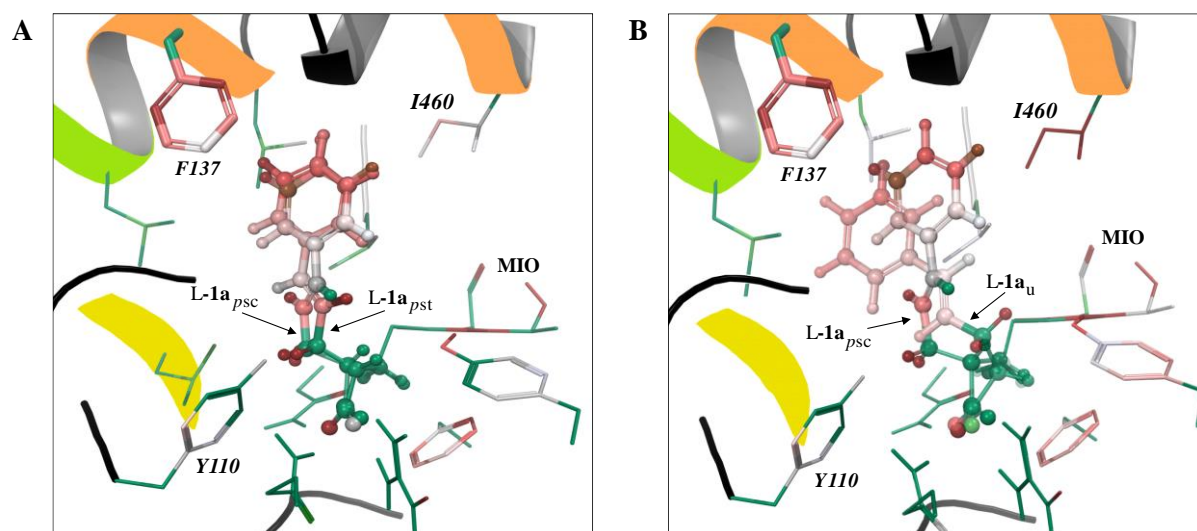


Figura 10. Modelul celor trei conformeri ai intermediarului de reacție L-**1a**-*N*-MIO în situsul catalitic al *wt-PcPAL*. Culoarea verde indică contribuția diferiților atomi la energia totală a sistemului: culoarea verde indică o contribuție benefică (≤ -5 kcal mol⁻¹), iar culoarea roșie denotă o contribuție defavorabilă (≥ 2 kcal mol⁻¹). (A) Cei doi conformeri productivi: L-**1a**_{psc} adoptă un aranjament sinperiplanar, iar L-**1a**_{pst} adoptă un aranjament antiperiplanar. Din ambii conformeri se poate obține produsul **2a** “all-*trans*”. (B) Conformerul neproductiv L-**1a**_u este cel mai favorizat energetic prin comparație cu conformerul L-**1a**_{psc} tensionat.

Se poate concluziona că repulsia dintre inelul aromatic al intermediarului *N*-MIO-L-**1a** și restul F137 al enzimei este responsabil de scăderea vitezei reacției mediată de *wt-PcPAL*.

Pentru lărgirea cavității buzunarului hidrofob și implicit pentru detensionarea interacției intermediarului L-**1a**-*N*-MIO cu F137 din *wt-PcPAL* s-a propus înlocuirea acestui aminoacid cu alți trei aminoacizi și anume, Val, Ala și Gly care posedă resturi hidrofobe de dimensiuni mai mici în comparație cu restul benzilic din F137. Crearea mutațiilor F137V-, F137A- și respectiv F137G-*PcPAL* a fost justificată și de faptul că enzimele F137X-*PcPAL* s-au dovedit biocatalizatori eficienți în adiția amoniacului la cinamații *para*-substituiți.⁴

II. B.2.2. Cinetica enzimatică

Eficacitatea catalitică sau constanta de specificitate a unei enzime este dată de raportul k_{cat}/K_M care indică eficiența biocatalizatorului în transformarea unui substrat (natural/natural) sau a unui anume substrat în cazul substraturilor concurente.¹²

Eficiența catalitică a enzimei native și a formelor sale mutante față de L-Phe și L-**1a** este prezentată în **Tabelul 5**.

Se observă o eficiență catalitică remarcabilă în cazul transformării L-**1a** catalizată de F137V-PcPAL, k_{cat}/K_M fiind de 240 de ori mai mare decât cel calculat pentru *wt*-PcPAL.

Tabelul 5. Parametrii cinetici pentru reacțiile de eliminare a amoniacului cu *wt*-PcPAL și mutații F137X-PcPAL pentru L-fenilalanină și pentru L-stiril-alanină (L-**1a**).

PcPAL	L- fenilalanina			L-stiril-alanina		
	K_M (μM)	$k_{\text{cat}} \times 10^{-3}$ (s^{-1})	$k_{\text{cat}}/K_M \times 10^{-3}$ ($\text{nM}^{-1} \text{s}^{-1}$)	K_M (μM)	$k_{\text{cat}} \times 10^{-3}$ (s^{-1})	$k_{\text{cat}}/K_M \times 10^{-3}$ ($\text{nM}^{-1} \text{s}^{-1}$)
<i>wt</i>	83 \pm 5	694 \pm 20	8361 \pm 291	4384 \pm 158	47.1 \pm 0.3	10.7 \pm 0.4
F137V	86 \pm 10	173 \pm 1	2011 \pm 131	186 \pm 6	422 \pm 28	2269 \pm 168
F137A	1732 \pm 15	283 \pm 1	163 \pm 2	1173 \pm 70	132 \pm 2.6	112.5 \pm 7.2
F137G	4969 \pm 153	52 \pm 3	10.4 \pm 0.9	4120 \pm 270	34.5 \pm 3.8	8.3 \pm 0.2

Tabelul 6. Parametrii cinetici pentru reacțiile de eliminare a amoniacului cu *wt*- și F137V-PcPAL pentru stiril-alaninele racemice *rac-1a-d*.

Substrat	<i>wt</i> -PcPAL			F137V-PcPAL		
	K_M (μM)	$k_{\text{cat}} \times 10^{-3}$ (s^{-1})	$k_{\text{cat}}/K_M \times 10^{-3}$ ($\text{nM}^{-1} \text{s}^{-1}$)	K_M (μM)	$k_{\text{cat}} \times 10^{-3}$ (s^{-1})	$k_{\text{cat}}/K_M \times 10^{-3}$ ($\text{nM}^{-1} \text{s}^{-1}$)
<i>rac-1a</i>	395 \pm 6	6.2 \pm 0.7	15.6 \pm 0.9	201 \pm 12	276 \pm 13	1373 \pm 97
<i>rac-1b</i>	154 \pm 7	0.24 \pm 0.01	1.5 \pm 0.03	78.3 \pm 2	78.6 \pm 4.4	1004 \pm 86
<i>rac-1c</i>	28 \pm 1	0.34 \pm 0.02	12.1 \pm 0.6	94.7 \pm 2	156.7 \pm 0.02	1667 \pm 10
<i>rac-1d</i>	287 \pm 3	3.2 \pm 0.03	11.1 \pm 0.5	326 \pm 10	9.9 \pm 0.01	30.2 \pm 1.9

Pentru eliminarea amoniacului din L-**1a**, mutantul F137V-PcPAL a avut un k_{cat} de 9 ori mai mare, iar mutantul F137A-PcPAL unul de 2.8 ori mai mare decât cel al *wt*-PAL-ului. Mutația F137G s-a dovedit ineficientă din punct de vedere al capacității catalitice a enzimei.

Așa cum se poate observa în imaginea **A** din **Figura 10**, în situsul activ al enzimei native, fragmentul aromatic al intermediarului *N*-MIO-L-**1a**_{psc} este deplasat în direcția restului I460, ceea ce determină schimbarea conformațională a acestuia. La rândul său această schimbare conformațională locală se poate propaga asupra arhitecturii întregului situs catalitic, și poate conduce la scăderea nivelului energetic al intermediarului de reacție *N*-MIO-L-**1a**_{psc}. Datorită mutației F137V, restul stirilic este mai relaxat și nivelul energetic al intermediarului va fi implicit mai scăzut. Mutația F137V nu influențează dispunerea spațială a restului alanil din L-**1a** în situsul catalitic al F137V-PcPAL comparativ cu cel din *wt*-PAL.

II. B.2.3. Rezoluția cinetică și aplicațiile sintetice

Atât datele obținute în studiile cinetice pentru deaminarea L-**1a**, cât și rezultatele studiilor de modelare moleculară referitoare la energetica intermediarului L-**1a**-*N*-MIO au calificat mutantul F137V-PcPAL ca și biocatalizator eficient pentru obținerea la scară preparativă a stiril-alaninelor enantiopure (**Panoul A**, **Figura 10**).

Stiril-alaninele *rac-1a-d* au fost substraturi în reacțiile de eliminare a amoniacului atât în prezența *wt*-PcPAL-ului cât și cu F137V-PcPAL. Din nefericire, aceiași biocatalizatori au fost inactivi în reacțiile inverse, de adiție a amoniacului la stiril-acrilati **2a-d**. În consecință, experimentele s-au limitat numai la investigarea reacțiilor de eliminare a amoniacului folosind stiril-alaninele racemice ca substraturi.

Utilizând metodele dezvoltate de detecție UV selectivă a acumulării în timp a produșilor stiril-acrilici, s-au determinat parametrii cinetici ai eliminării amoniacului asistată de *wt*-PcPAL și F137V-PcPAL prin incubarea acestor enzime cu *rac-1a-d* (**Tabelul 7**).

În toate cazurile, mutantul F137V-*PcPAL* s-a dovedit a fi o alternativă superioară față de enzima nativă, *turnover number* (k_{cat}) și constanta specificității (k_{cat}/K_M) fiind semnificativ îmbunătățite în cazul utilizării mutantului (**Tabelul 7**).

Pentru a confirma utilitatea sintetică a mutantului F137V-*PcPAL* în rezoluția cinetică a stiril-alaninelor racemice *rac-1a-d*, reacțiile de deaminare au fost efectuate și la scară semipreparativă pornind de la 0.1 mmol substrat racemic la o concentrație de 5 mM în prezența a 0.5-1 mg de *wt*- și F137V-*PcPAL* purificate (**Tabelul 7**).

Tabelul 7. Conversia stiril-alaninelor *rac-1a-d* și excesele enantiomerice ale produșilor D-**1a-d** în reacția de eliminare a amoniacului catalizată de variantele *PcPAL*.

Nr. Crt.	<i>PcPAL</i>	Substrat	Timp (ore)	<i>c</i> (%)	<i>ee</i> _{teor} (%) ^a	<i>ee</i> _{obs} (%)
1	F137V	<i>rac-1a</i>	24	50	100	>99
2		<i>rac-1b</i>	274	50	100	>99
3		<i>rac-1c</i>	134	50	100	>99
4		<i>rac-1d</i>	300	50	100	>99
5	<i>nativ (wt)</i>	<i>rac-1a</i>	274	50	100	>98
6		<i>rac-1b</i>	504	29	41	41
7		<i>rac-1c</i>	600	36	56	55
8		<i>rac-1d</i>	600	31	45	41

^a $ee_{teor} = c/(1-c)$ pentru o rezoluție cinetică ideală

În **Figura 11** sunt prezentate variațiile conversiilor în timp pentru transformarea stiril-alaninelor racemice *rac-1a-d*; valorile exceselor enantiomerice (*ee*) pentru compușii D-**1a-d** obținuți prin eliminarea amoniacului din L-**1a-d** catalizată de cele două *PcPAL*-uri sunt redată în **Tabelul 7**.

Pentru a compensa inactivarea în timp a enzimei din cauza condițiilor de reacție folosite, la intervale de 48 de ore s-a adăugat o nouă șarjă de enzimă în amestecurile de reacție. În toate cazurile, progresul reacțiilor a fost monitorizat prin metode HPLC.

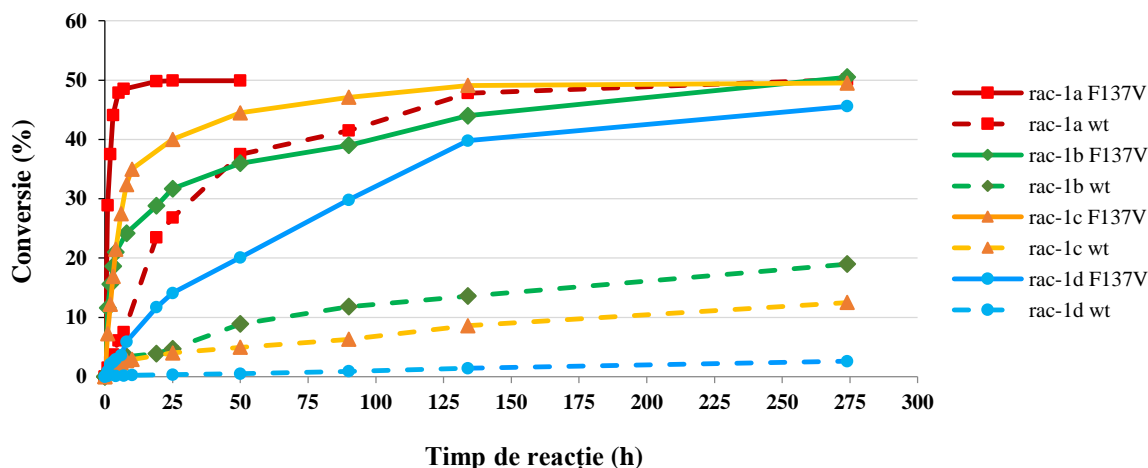


Figura 11. Profilul variației conversiilor în timp pentru transformarea enzimatică a *rac-1a-d* în prezența enzimelor *wt-PcPAL* (linii întrerupte) și F137V-*PcPAL* (linii continue).

Profilul conversiilor *rac-1a-d* în timp (**Figura 11**) a evidențiat superioritatea catalitică a mutantului F137V-*PcPAL* față de *wt-PcPAL*, confirmat de altfel și de măsurătorile cinetice Michaelis-Menten.

În prezența F137V-*PcPAL*-ului, s-a realizat rezoluția cinetică total enantioselectivă a *rac-1a* cu o conversie de ~ 50% în 24 de ore, a *rac-1c* după 134 ore și a *rac-1b,d* după o perioadă mai lungă din timp (274, respectiv 300 ore).

Wt-PcPAL s-a dovedit eficientă numai pentru rezoluția cinetică a *rac-1a* (**Tabelul 7, Nr. Crt. 5**). În cazul stiril-alaninele substituie *rac-1b-d* activitatea acestei enzime a fost mult mai mică, înregistrându-se valori reduse ale conversiilor chiar și după timpi lungi de reacție (**Figura 11, Tabelul 7, Nr. Crt. 6-8**).

Este important de menționat caracterul stereoselectiv total al biotransformării L-**1a-c**, valorile măsurate ale exceselor enantiomerice ale D-**1a-c** la o conversie dată fiind în concordanță cu valorile teoretice calculate a ee-rilor corespunzătoare conversiei măsurate în raport cu concentrațiile *rac-1a-d* inițiale.

În cazul sintezei asistate de *wt-PAL*, puritatea enantiomerică a D-**1d** a fost mai mică decât valoarea sa teoretică, calculată din conversia măsurată, de altfel în concordanță cu rezultatele obținute care demonstrează stereoselectivitatea redusă a diverselor fenilalanin amoniac-liaze în sinteza ambilor enantiomeri ai nitrofenilalaninelor.

Trebuie subliniat faptul că procesarea substraturilor *rac-1a-d* mediată de F137V-*PcPAL* a permis izolarea compușilor D-**1a-d** cu excese enantiomerice mai mari de 99%. Acest rezultat este în acord cu profilurile variației conversiilor în timp, care tind asimptotic la valoarea de 50%.

În concluzie, F137V-*PcPAL* s-a dovedit un biocatalizator activ și stereoselectiv pentru sinteza enantiomerilor D ai stiril-alaninelor.

Comparând datele cinetice obținute pentru reacția mediată de *wt-PcPAL* și F137V-*PcPAL* utilizând ca substrat L-**1a** (**Tabelul 5**), respectiv *rac-1a* (**Tabelul 6**), se poate observa că eliminarea amoniacului din stiril-alanina L-**1a** este inhibată de prezența D-stiril-alaninei.

Dacă D-**1a** nu ar fi un inhibitor competitiv al enzimelor, atunci constanta K_M determinată pentru *rac-1a* ar fi comparabilă ca valoare cu cea obținută pentru L-**1a**, iar k_{cat} calculat pentru ambele cazuri ar trebui să fie similare, însă datele cinetice înregistrate în prezența *wt-PcPAL* certifică o scădere cu un ordin de mărime a valorii K_M , respectiv o scădere de 7.6 ori a v_{max} și implicit a k_{cat} , atunci când enzima e incubată cu *rac-1a* în loc de L-**1a**.

În cazul incubării F137V-*PcPAL*-ului cu racemat s-a observat o scădere de numai 1.5 ori a valorii k_{cat} în comparație cu cel determinat în prezența L-**1a**. Datele experimentale obținute în cazul sintezei la scară semipreparativă mediate de F137V-*PcPAL* a D-**1a-c** cu ee > 99% la conversii de ~50% în raport cu substanțele de pornire *rac-1a-c* (**Tabelul 7**) certifică faptul că D-**1a-c** nu sunt procesați de către enzimă. Acest fapt sugerează că D-**1a**, dar probabil și D-**1b-d**, acționează ca inhibitori reversibili, formând intermediari neproductivi de tipul D-**1a-d-N-MIO-F137V-PcPAL**.

Calcululele de modelare moleculară certifică posibilitatea de formare a intermediarului D-**1a-N-MIO**. Structurile suprapuse a intermediarului L-**1a_{pst}-N-MIO** cu intermediarul covalent neproductiv D-**1a-N-MIO** în situsul catalitic al *wt-PcPAL*-ului sunt prezentate în imaginea **B** din **Figura 12**.

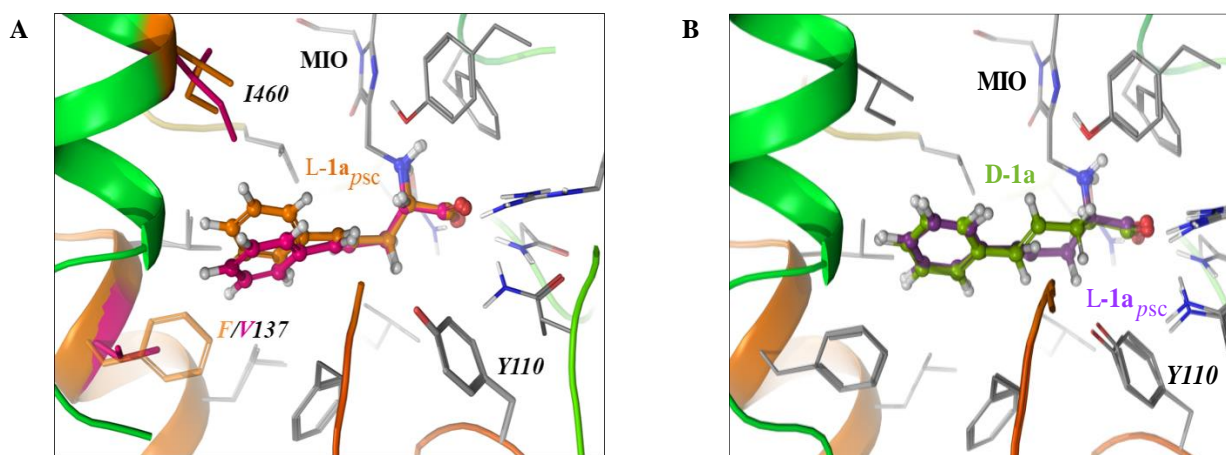


Figura 12. Dispunerea spațială a intermediarilor covalenți **1a-N-MIO** în situsul catalitic al variantelor *PcPAL*. **(A)** Conformerul **L-1a_{psc}-N-MIO** în situsul catalitic al *wt-PcPAL* și *F137V-PcPAL*. Se pot observa diferențele conformaționale a restului **I460** în cele două enzime. **(B)** Diferența de dispunere spațială dintre intermediarul covalent neproductiv **D-1a-wt-PcPAL** (verde) și cel al intermediarului covalent productiv **L-1a_{psc}-wt-PcPAL** (mov).

II. B.2.5. Studiul adității amoniacului la stiril-acrilații **2a-d** mediată de *PcPAL* în scopul sintezei *L*-aril-alaninelor

Nici una din enzimele *wt*- și *F137V/A/G-PcPAL* nu s-au dovedit potrivite pentru aditia amoniacului la stiril-acrilații **2a-d**. Potențialii produși de reacție **1a-d** nu au putut fi detectați prin metode HPLC nici după 20 de zile de reacție.

Studiile de modelare moleculară nu au putut oferi o explicație univocă a rezultatelor experimentale. Motivele plauzibile ar fi: afinitățile slabe a stiril-acrilaților **2a-d** față de enzimă sau ancorarea lor de situsul catalitic în stări neproductive.

Legarea slabă a stiril-acrilaților de situsul catalitic al enzimei *wt-PcPAL*, dar mai puternică în cazul *F137V-PcPAL*-ului a fost confirmată prin calcularea energiilor relative de legare.

II. B.3. Concluzii

Cinetica Michaelis-Menten a arătat că valoarea k_{cat} pentru reacția de eliminare a amoniacului din *L*-stiril-alanina **L-1a** folosind enzima *wt-PcPAL* a fost de 14 ori mai mică față de k_{cat} obținut în prezența substratului natural *L*-fenilalanina, în timp ce valoarea k_{cat}/K_M pentru transformarea **L-1a** a fost de 777 de ori mai mică decât cea calculată pentru deaminarea *L*-fenilalaninei.

Datele de modelare moleculară au ilustrat trei aranjamente posibile (**L-1a_{psc}**, **L-1a_{pst}** – stări productive și **L-1a_n** - stare neproductivă) a intermediarului *N-MIO-L-1a* în situsul activ al *wt-PcPAL*-ului și au permis evidențierea repulsiei dintre inelul aromatic al intermediarului de reacție *N-MIO-L-1a* și gruparea fenil a fenilalaninei **F137** din buzunarul hidrofob al situsului catalitic al *wt-PcPAL*-ului.

S-a concluzionat că această interacțiune este responsabilă pentru activitatea scăzută afișată de *wt-PcPAL* față de **L-1a**. Înlocuirea restului **F137** cu aminoacizi hidrofobi mai mici (valina, alanina și glicina) a condus la lărgirea buzunarului de legare hidrofob al enzimei și în consecință, la creșterea afinității mutanților față de **L-1a**.

Mutantul *F137V-PcPAL* s-a dovedit a fi cel mai eficient biocatalizator pentru eliminarea amoniacului din stiril-alanina **L-1a**, precum și din *rac-1a-d*.

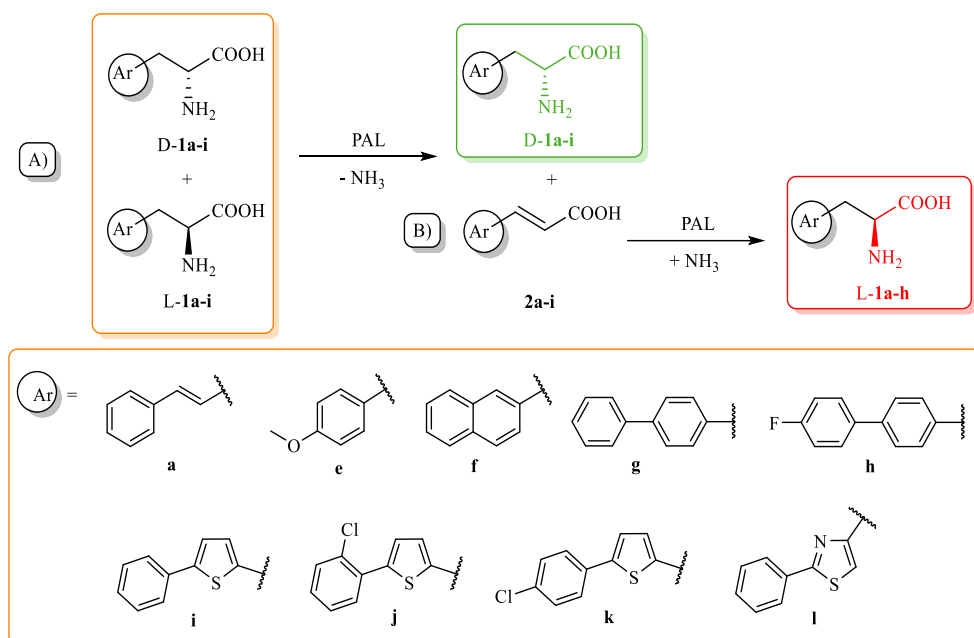
Cu toate acestea, nici enzima nativă, nici variantele mutante nu au fost active în reacțiile de adiție a amoniacului la (*E*)-stiril-acrilații **2a-d**. Se presupune că motivul principal pentru acest inconvenient este formarea unor stări de legare neproductive ale compușilor **2a-d** în situsul catalitic al enzimei.

Subcapitol C. Mutanți ai fenilalanin amoniac-liazei din *Petroselinum crispum* croiți pentru sinteza L- și D-aril-alaninelor voluminoase

II. C.2. Rezultate și discuții

II. C.2.1. Proiectarea rațională, stabilitatea și activitatea de noi mutanți PcPAL

Unele substraturi, mai exact acizii stiril- (**2a**), 4-metoxifenil (**2e**), naftalen-2-il- (**2f**) și bifenil-4-il (**2g**) acrilici prezentați în **Schema 3**, au fost testați inițial cu enzima *wild-type* PcPAL, dar s-au obținut conversii fie foarte mici, nule sau compușii țintă s-au dovedit a fi inhibitori enzimatici.^{4, 5, 14, 15}



Schema 3. Reacțiile de eliminare (A) și adiție (B) a amoniacului testat de variantele PcPAL.

În al doilea subcapitol am văzut că nu se cunoaște nici o variantă mutantă de PcPAL care să prezinte activitate catalitică în reacția de adiție a amoniacului, exceptând cazul dezaminării stiril-alaninelor, unde mutantul F137V a prezentat activitate.⁵

Pentru a obține biocatalizatori PAL capabili să transforme a serie de L- și D-aril-alanine voluminoase și cu impedimente sterice valoroase, am urmărit în continuare analiza mutațională și design-ul rațional al buzunarului hidrofobic de legare al PcPAL-ului.

În conformitate cu extinderea domeniului de substrat al enzimelor PAL raportat inițial, bazat pe conceptul reducerii impedimentelor sterice,^{4,5} am selectat câteva resturi de aminoacizi din situsul hidrofobic de legare al PAL-ului din *Petroselinum crispum*, și anume resturile L134, F137, L138, L206, L256 și I460 (foarte conservat), pe care le-am schimbat cu aminoacizi mai mici precum valina sau alanina, pentru a obține atât mutanți singulari, cât și mutanți dubli/tripli ai PcPAL-ului (**Figura 13**).

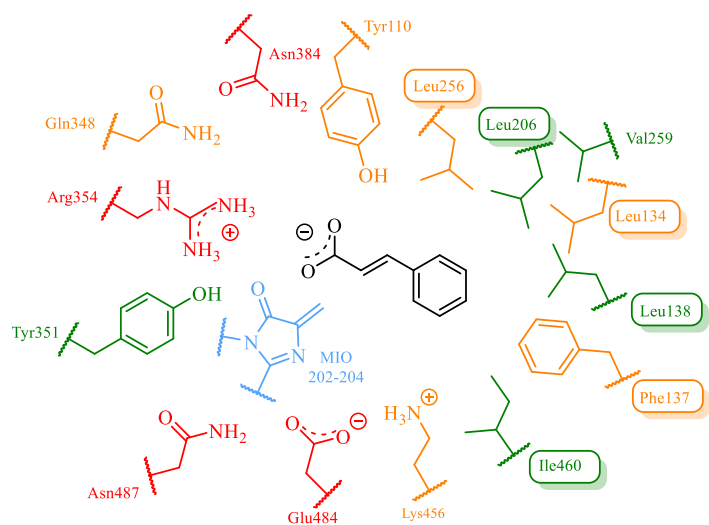


Figura 13. Modelul centrului activ al *PcPAL*-ului cu acid (*E*)-cinamic ca substrat. Distanța dintre catenele laterale ale aminoacizilor învecinați și substrat este mai mică de 5 Å. Poziția acestor resturi, raportat la planul ligandului, este diferențiată prin utilizarea unor culori cu următoarea semnificație: **negru** și **roșu** – în interior, **verde** – dedesubt și **portocaliu** – deasupra planului. Gruparea **MIO** este deasupra planului. Aminoacizii hidrofobi încadrați au fost înlocuiți cu aminoacizi hidrofobi mai mici, precum valina și alanina, fie independent fie în combinație.

II. C.2.2. Testarea variantelor mutante singulare ale *PcPAL*-ului în reacțiile de eliminare a aril-alaninelor *rac-1a,e-l*

Activitatea mutațiilor *PcPAL* generați a fost testată atât în reacțiile de eliminare a amoniacului din aril-alaninele racemice *rac-1a,e-l* (Schema 3A), cât și în reacțiile de adiție a amoniacului la cinamații **2a,e-l** (Schema 3B). Pe lângă efectele benefice cunoscute ale mutației F137V/A,⁵ în reacțiile de deaminare a *rac-1a,e-l*, s-a demonstrat și importanța schimbării restului de izoleucină puternic conservat din buzunarul hidrofob (poziția 460 în *PcPAL*) cu aminoacizi apolari mai puțin voluminoși V și A.

Prin urmare, în comparație cu *wt-PcPAL*, I460V-*PcPAL* a prezentat o activitate catalitică semnificativ îmbunătățită față de toate substraturile testate (Tabel 8).

Astfel, mutațiile F137V/A- și I460V-*PcPAL* s-au dovedit a fi biocatalizatori eficienți în procesarea aminoacizilor racemici (c=35% pentru *rac-1g*; c=50% pentru *rac-1a,j,k* după 16 ore timp de reacție; Tabel 8). Asemănarea structurală dintre *rac-1l* și benzo[*b*]furan-3-il-, respectiv benzo[*b*]tiofen-3-il-alanină, inhibitori cunoscuți ai *wt-PAL*-ului,¹⁶ a calificat acest aminoacid ca inhibitor competitiv al enzimei *wt-PcPAL*, dar și a mutațiilor F137V- și I460V-*PcPAL*.

În mod surprinzător F137A-*PcPAL* s-a dovedit activ în reacția de eliminare a amoniacului din *rac-1l*, dar conversia a fost foarte scăzută (c=6%), chiar și după un timp lung de reacție.

Tabelul 8. Biotransformarea *rac-1a,e-l* asistată de *wt*-, F137V/A- și I460V-*PcPAL*

Substrat	Gruparea Ar.	Forme <i>PcPAL</i> ^[a]	<i>c</i> (%)	Substrat	Gruparea Ar.	Forme <i>PcPAL</i> ^[a]	<i>c</i> (%)
<i>rac-1a</i>	stiril	<i>wt</i>	<1	<i>rac-1i</i>	5-feniltiofen-2-il	<i>wt</i>	<1
<i>rac-1a</i>	stiril	I460V	~50	<i>rac-1i</i>	5-feniltiofen-2-il	F137V	35
<i>rac-1a</i>	stiril	F137V	~50	<i>rac-1i</i>	5-feniltiofen-2-il	F137A	44
<i>rac-1e</i>	4-metoxi	<i>wt</i>	3	<i>rac-1j</i>	5'-(2-clorofenil)-tiofen-2-il	<i>wt</i>	<1
<i>rac-1e</i>	4-metoxi	F137V	37	<i>rac-1j</i>	5'-(2-clorofenil)-tiofen-2-il	F137V	19
<i>rac-1e</i>	4-metoxi	I460V	39	<i>rac-1j</i>	5'-(2-clorofenil)-tiofen-2-il	F137A	~50
<i>rac-1f</i>	naftalen-2-il	<i>wt</i>	6	<i>rac-1k</i>	5'-(4-clorofenil)-tiofen-2-il	<i>wt</i>	<1
<i>rac-1f</i>	naftalen-2-il	I460V	37	<i>rac-1k</i>	5'-(4-clorofenil)-tiofen-2-il	I460V	10
<i>rac-1f</i>	naftalen-2-il	F137V	39	<i>rac-1k</i>	5'-(4-clorofenil)-tiofen-2-il	F137A	~50
<i>rac-1g</i>	bifenil-4-il	<i>wt</i>	<1	<i>rac-1l</i>	2-feniltiazol-4-il	<i>wt</i>	<1
<i>rac-1g</i>	bifenil-4-il	I460V	8	<i>rac-1l</i>	2-feniltiazol-4-il	F137A	6
<i>rac-1g</i>	bifenil-4-il	F137A	15				
<i>rac-1h</i>	4'-fluorobifenil-4-il	<i>wt</i>	<1				
<i>rac-1h</i>	4'-fluorobifenil-4-il	F137V	37				
<i>rac-1h</i>	4'-fluorobifenil-4-il	F137A	39				

[a] Condiții: 50 μg enzimă în 500 μL tampon Tris (100 mM Tris.HCl, pH 8.8, 20 mM β-ciclodextrină, 1 mM substrat, timp de reacție 16 ore.

II. C.2.3. Testarea variantelor mutante singulare ale *PcPAL*-ului în reacțiile de adiție la acizii cinamici **2a,e-l**

Mutații singulare de *PcPAL* au fost în general catalizatori puțin activi în reacțiile de adiție a amoniacului la cinamații **2a,e-k**. Au existat două excepții, și anume aminările 4-metoxicinamatului **2e** catalizată de I460V-*PcPAL* (*c*=29%) și a naftalen-2-il-acrilatului **2f** asistată de F137V-*PcPAL* (*c*=55%, **Tabelul 9**).

Este de menționat faptul că mutațiile individuale ale resturilor L138, L134, L206, L256 la valină sau alanină, nu au îmbunătățit performanța catalitică a enzimei native în nici unul din cazurile investigate (**Tabelul 9**).

Tabelul 9. Valorile conversiei în reacțiile de adiție a amoniacului la substraturile **2a,e-l** după 20 ore.

Nr.	<i>PcPAL</i> ^a	Conversie (%)								
		2a	2e	2f	2g	2h	2i	2j	2k	2l
1	<i>wild-type</i>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
2	F137A	<1	<1	<1	<1	<1	4	<1	<1	<1
3	F137V	<1	26	55	<1	<1	2	<1	<1	<1
4	I460V	<1	29	50	<1	<1	<1	<1	<1	<1
5	F137A/I460V	4	4	9	27	8	6	3	2	<1
6	F137A/I460A	<1	<1	<1	8	<1	<1	<1	<1	<1
7	F137V/I460A	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
8	F137V/I460V	22	32	39	9	<1	3	<1	<1	<1
9	F137A/L138V	<1	<1	<1	<1	<1	2	<1	<1	<1
10	F137V/L138V/I460V	14	27	21	4	<1	<1	<1	<1	<1
11	F137A/L138V/I460V	<1	3	<1	8	<1	3	<1	<1	<1

^a Mutațiile singulare L134A, L134V, F137G, L138A, L138V, L206A, L206V, L256A, L256V, I460A, duble F137A/L138A, F137V/L138A, F137V/L138V, L134V/F137A și triple F137A/L138A/I460V, F137A/L138A/I460A, F137A/L138V/I460A s-au dovedit total ineficiente în transformarea substraturilor **2a,e-l**.

II. C.2.4. Testarea variantelor mutante duble și triple ale *PcPAL*-ului în reacțiile de eliminare (*rac-1a,e-l*) și adiție (**2a, e-l**)

În reacțiile de eliminare ale *rac-1a,e-l* mutații dubli și tripli ai *PcPAL* au îmbunătățit conversia numai în cazul a două substraturi : 4'-fluorobifenil-4-il-alanina, *rac-1h* (de la 15% cu F137A-*PcPAL* (**Tabelul 8**) la 39% cu mutantul F137A/I460V) și 5-feniltiofen-2-il-alanina *rac-1i* (de la 44% cu F137A-*PcPAL* (**Tabelul 8**) la 48% cu F137A/L138V)

În cazul reacțiilor de adiție a amoniacului la acrilatii **2a,e-l** mutații dubli F137V-A/I460V au prezentat activitate crescută în cazul transformării **2a** și **2g** (**Tabel 10**) față de care toți mutații singulare s-au dovedit a fi inactivi (**Tabelul 9**). Acest rezultat se poate explica printr-un efect cooperativ puternic, non-aditiv al mutațiilor singulare a resturilor învecinate F137 și I460.

Tabel 10. Compararea activității *wt-PcPAL* cu cei mai performanți mutanți în reacțiile de adiție a amoniacului la **2a,e-l**.

Substrat	Grupare R	Forma <i>PcPAL</i> ^[a]	<i>c</i> (%)	Substrat	Grupare R	Forma <i>PcPAL</i> ^[a]	<i>c</i> (%)
2a	stiril	<i>wt</i>	<1	2h	4'-fluorobifenil-4-il	<i>wt</i>	<1
2a	stiril	F137V/I460V	22	2h	4'-fluorobifenil-4-il	F137A/I460V	8
2e	4-metoxi	<i>wt</i>	<1	2i	5-feniltiofen-2-il	<i>wt</i>	<1
2e	4-metoxi	F137V/I460V	32	2i	5-feniltiofen-2-il	F137A/I460V	6
2f	naftalen-2-il	<i>wt</i>	<1	2j	5'-(2-clorofenil)-tiofen-2-il	<i>wt</i>	<1
2f	naftalen-2-il	F137V	55	2j	5'-(2-clorofenil)-tiofen-2-il	F137A/I460V	3
2g	bifenil-4-il	<i>wt</i>	<1	2k	5'-(4-clorofenil)-tiofen-2-il	<i>wt</i>	<1
2g	bifenil-4-il	F137A/I460V	27	2k	5'-(4-clorofenil)-tiofen-2-il	F137A/I460V	2

[a] Condiții: 50 μg enzimă în 500 μL tampon reaction: 6 M NH₃ (pH 10, ajustat cu CO₂); concentrația de substrat: 1 mM; reacția a avut loc în sticlute închise etanș de 1.5 mL la 30 °C, 200 rpm, timp de 20 ore.

Din păcate enzima F137A/I460V s-a dovedit prea puțin activă în prezența substraturilor **2h-k** (*c*=3-8% după 20 ore, (Tabelul 9). Mai mult, utilizarea de enzime *PcPAL* cu mutații multiple nu a determinat nici o creștere semnificativă a conversiei față de mutații singulare *PcPAL* în cazul acrilajilor **2e** și **2f** (Tabelul 9), iar acidul 2-feniltiazol-4-il-acrilic **2l** (Tabelul 9) nu a fost transformat de nici una dintre enzime.

Combinarea mutației L138V/A cu F137V/A sau/și cu I460A/V pentru a da naștere unor mutanți dubli și tripli, nu a determinat creșterea activității catalitice în niciuna din reacțiile de eliminare sau adiție a amoniacului. Aceste rezultate subliniază importanța restului I460 în obținerea unui mutant *PcPAL* cu activitate catalitică ridicată, iar combinarea acestuia cu mutația aminoacidului F137, a generat biocatalizatori valoroși pentru reacțiile de adiție a amoniacului cu obținerea L-arilalaninelor importante în sinteza produșilor biolog activi.

După selecția celor mai performanți mutanți (conversii și excese enantiomerice ridicate), s-a trecut la optimizarea condițiilor de reacție, utilizând ca substrat model bifenil-4-il-alanina *rac*-**1g** în reacțiile de eliminare a amoniacului și acidul naftalen-2-il-acrilic **2f** în reacțiile de adiție a amoniacului.

II. C.2.7. Rezultatele computaționale și profilul deplierii termice a *PcPAL*-ului nativ și a F137A/I460V-*PcPAL*-ului în prezența concentrațiilor mari de amoniac

Potrivit analizelor computaționale anterioare, rezultatele mai bune obținute pentru substraturile L-**1a,e-k** în ceea ce privește conversia și ee sunt posibile datorită unei afinități îmbunătățite a variantelor corespunzătoare mutațiilor *PcPAL* față de acești compuși, dar și datorită unei stabilizări mai bune a stărilor de tranziție caracteristice reacțiilor, aspecte observabile prin obținerea unor *turnover number* mai mari.⁵ Această creștere a afinității pentru substrat a fost confirmată/analizată prin modelarea moleculară a intermediarilor de reacție covalenți *N*-MIO enzimă-substrat.

În Figura 14 sunt ilustrate trei situații pentru vizualizarea afinității mărite a L-**1h** față de F137A/I460V-*PcPAL* în comparație cu *wt*-PAL. Sunt prezentate atașarea substratul L-**1h** de situsul catalitic a enzimei native (Figura 14A) și de F137A/I460V-*PcPAL* (Figura 14C).

Mutația dublă a determinat lărgirea buzunarului hidrofob al situsului catalitic cu formarea unui intermediar *N*-MIO mai relaxat steric.

Figura 14B ilustrează o suprapunere a celor două situații descrise anterior, fiind vizibilă o deplasare semnificativă a restului biarilic în buzunarul hidrofob lărgit al F137A/I460V-*PcPAL*-ului față de poziția acestuia împiedicată steric în situsul catalitic al *wt*-*PcPAL*-ului.

Aceeași analiză în cazul *L*-aril-alaninele **L-1f-g,i-k** a condus la situații similare cu excepția **L-1e**, a cărui afinitate față de enzimă a fost mai puțin modificată ca urmare a mutațiilor.

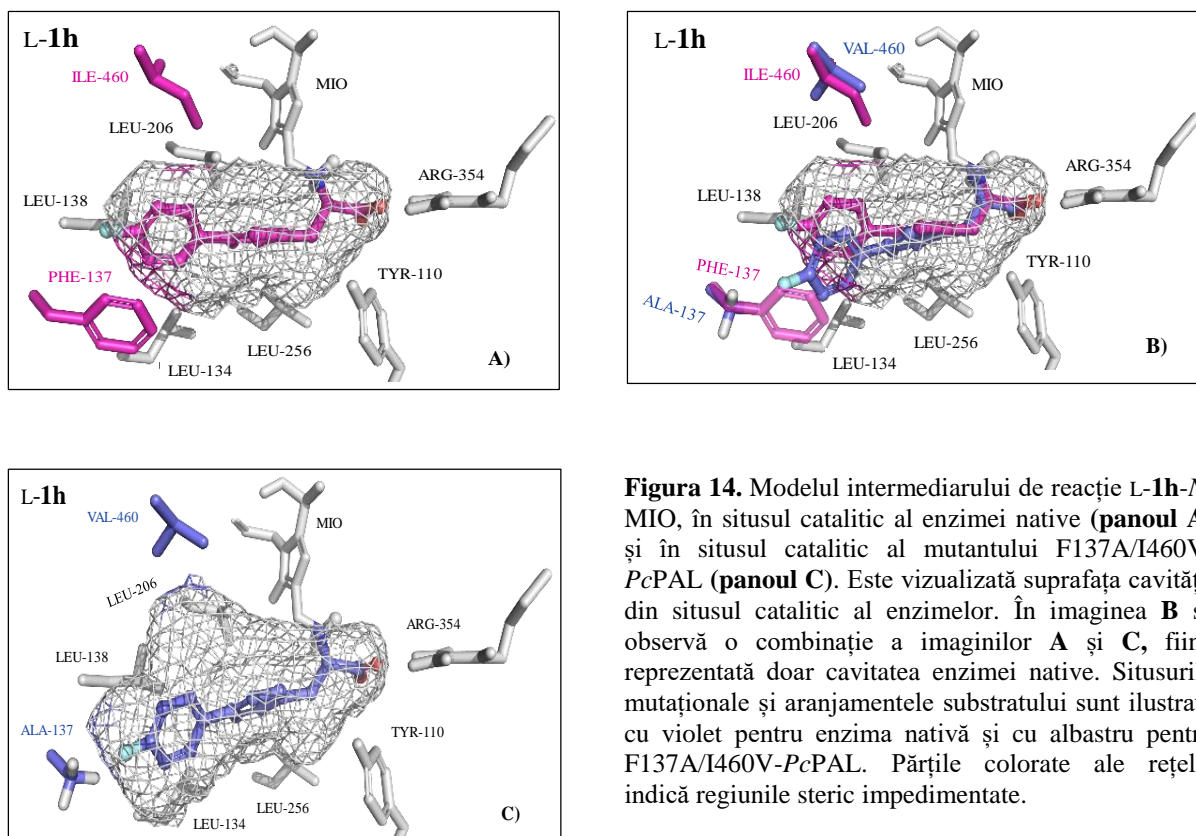


Figura 14. Modelul intermediarului de reacție **L-1h-N-MIO**, în situsul catalitic al enzimei native (**panoul A**) și în situsul catalitic al mutantului F137A/I460V-*PcPAL* (**panoul C**). Este vizualizată suprafața cavității din situsul catalitic al enzimelor. În imaginea **B** se observă o combinație a imaginilor **A** și **C**, fiind reprezentată doar cavitatea enzimei native. Siturile mutaționale și aranjamentele substratului sunt ilustrate cu violet pentru enzima nativă și cu albastru pentru F137A/I460V-*PcPAL*. Părțile colorate ale rețelei indică regiunile steric impedimentate.

Prin analiza profilului de depliere termică ale *PcPAL* nativ-ului și ale mutațiilor F137A/I460V-*PcPAL*, se poate observa scăderea temperaturii de denaturare odată cu creșterea concentrației amoniacului (**Figura 15 și 16**). S-a constatat o scădere a temperaturii de denaturare cu până la 20 °C pentru enzima nativă și o scădere de 13 °C pentru mutantul dublu, comparativ cu temperaturile de 74-75 °C măsurate pentru enzime în soluție tampon 0.1 M Tris (**Tabelul 11**).

Enzimele adoptă, cel mai probabil, o altă conformație, motiv pentru care rezultatele computaționale obținute nu pot fi corelate cu experimentele de termostabilitate a proteinelor.

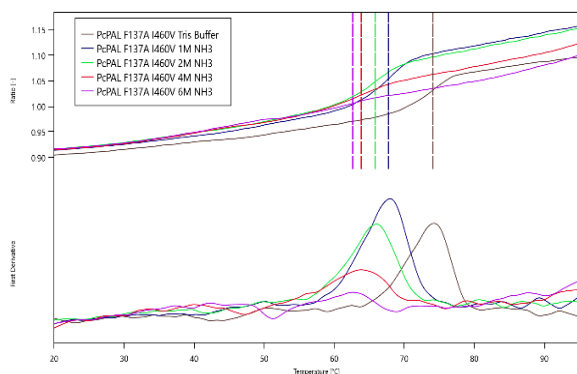


Figura 15. Deplierea termică a F137A/I460V-*PcPAL* în soluții cu diferite concentrații de amoniac.

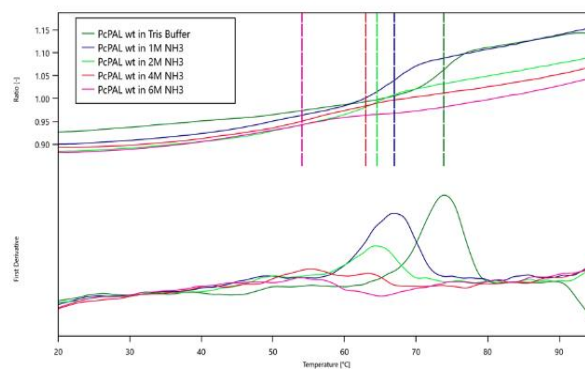


Figura 16. Deplierea termică a *wt-PcPAL* în soluții cu diferite concentrații de amoniac.

Tabelul 11. Temperatura de denaturare (T_m) a *PcPAL* nativ și a mutațiilor F137A/I460V-*PcPAL* în soluții cu diferite concentrații de amoniac.

Soluția tampon	T_m (°C) <i>wt-PcPAL</i>	T_m (°C) F137A/I460V- <i>PcPAL</i>
0.1 M Tris	75.1±0.2	74.4±0.4
1 M NH ₃	68.9±0.2	67.0±0.2
2 M NH ₃	64.7±0.5	65.1±0.2
4 M NH ₃	55.1±0.5	63.4±0.3
6 M NH ₃	54.4±0.9	61.9±0.7

II. C.3. Concluzii

Schimbarea unui aminoacid voluminos (F137 sau I460) cu un aminoacid hidrofob de dimensiuni mai mici a condus la creșterea activității catalitice a *PcPAL*-ului în reacțiile de deaminare.

Înlocuirea simultană a F137 și I460 cu alanină și valină, cu efect favorabil non-aditiv, a permis crearea de biocatalizatori eficienți pentru reacțiile de adiție stereoselectivă a amoniacului la aril-acrilații voluminoși.

În timp ce importanța aminoacidului F137 și a variantelor modificate ale acestuia asupra toleranței enzimei față de diverse substraturi nenaturale a fost investigată anterior, s-a pus în evidență efectul cooperativ, non-aditiv a mutației restului I460, ceea ce a permis îmbunătățirea activității catalitice a *PcPAL*-ului pentru analogii de fenilalanină investigați.

Noii mutații F137V/A- și I460V/A- *PcPAL* sunt biocatalizatori remarcabili, care permit sinteza enantiomerilor D- și L- ai analogilor mai voluminoși ai fenilalaninei, precum (naftalen-2-il)-alanina **1f** și 4-metoxi-fenil-alanina **1e**.

Concluzii generale

1. S-a utilizat mutageneza situs-direcționată pentru a obține un număr considerabil de variante mutante ale *PcPAL*-ului. Măsurătorile de stabilitate termică au demonstrat că temperatura de topire (T_m) a enzimelor mutante a fost influențată doar de mutația I460A ($T_m = 74 \rightarrow 51$ °C), fără repercursiuni asupra activității sale catalitice.
2. Clivarea etichetei 6×His *N*-terminale în cazul *Wt-PcPAL* și a variantelor sale mutante (F137A, I460V, F137A/I460V și Y110F/F137A/I460V) a fost realizată cu ajutorul endopeptidazei TEV S219V. Enzimele lipsite de eticheta 6xHis au fost utilizate în studii de cristalografie proteică.
3. Colecția de enzime MIO-dependente relevante din punct de vedere biocatalic, a fost extinsă cu o fenilalanin 2,3-aminomutază (PAM), o fenilalanin/histidin sau tirozin amoniac-liază (XAL) și o histidin amoniac liază (HAL), originale din *Pseudomonas fluorescens* R124.
4. A fost realizată sinteza chimică a unor noi substraturi pentru *PcPAL* de tipul acizilor stiril-acrilici **2a-d** și stiril-alaninelor racemice, *rac-1a-d*.
5. Datele de modelare moleculară au statuat interacțiunile de respingere între restul F137 al *PcPAL* și inelul aromatic al L-stiril-alaninei L-**1a** în cazul formării intermediarului *N*-MIO-L-**1a**. S-a creat o colecție de mutații F137X-*PcPAL* (X reprezentând valină, alanină sau glicină), dintre care mutantul F137V-*PcPAL* s-a dovedit eficient în reacția de deaminare a L-**1a**, dar și a stiril-alaninelor racemice *rac-1a-d*. Spre deosebire de enzima nativă, mutantul F137V-*PcPAL* s-a dovedit un biocatalizator util pentru sinteza preparativă a D- stiril-alaninelor cu puritate enantiomerică ridicată.
6. S-au utilizat mutații singulare pentru a favoriza crearea intermediarilor enzimă-substrat mai relaxați energetic în cazul analogilor voluminoși ai fenilalaninei. S-a demonstrat că înlocuirea resturilor F137 și I460 cu aminoacizi hidrofobi cu dimensiuni mai reduse a facilitat eliminarea amoniacului din aril-alanine voluminoase într-o manieră stereoselectivă. Pentru a facilita adiția stereoselectivă a amoniacului la cinamații voluminoși corespunzători a fost necesară înlocuirea simultană a resturilor F137 și I460. Astfel s-au dezvoltat biocatalizatori activi și stereoselectivi pentru sinteza a D- și L-([1,1'-bifenil]-4-il)-alaninei și D-(5-feniltiofen-2-il)-alaninei, intermediari cheie în sinteza unor compuși cu activitate farmaceutică.

Bibliografie selectivă

- [1] K. Tujioka, S. Okuyama, H. Yokogoshi, Y. Fukaya, K. Hayase, K. Horie, M. Kim, *Springer-Verlag* **2006**, 32, 255–260.
- [2] R. Suenaga, S. Tomonaga, H. Yamane, I. Kurauchi, Y. Tsuneyoshi, H. Sato, D.M. Denbow, M. Furuse, *Springer-Verlag* **2007**, 35, 139–146.
- [3] S. Bartsch, U.T. Bornscheuer, *PEDS* **2010**, 23, 929–933.
- [4] S.T. Ahmed, F. Parmeggiani, N.J. Weise, S.L. Flitsch, N.J. Turner, *ACS Catal.* **2015**, 5, 5410–5413.
- [5] L.C. Bencze, A. Filip, G. Bánóczy, M.I. Toşa, F.D. Irimie, Á. Gellért, L. Poppe, C. Paizs, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 3717–3727.
- [6] Filip A., Nagy E.Z.A., Tork S.D., Bánóczy G., Toşa M.I., Irimie F.D., Poppe L., Csaba P., Bencze L.C., *ChemCatChem*, **2018**, 10, 2627–2633.
- [7] C. Papworth, J.C. Bauer, J. Braman, D.A. Wright, *Strategies*, **1996**, 9, 3–4
- [8] a) M. Maschberger, H.M. Resch, S. Duhr, D. Breitsprecher, **2015** NanoTemper Technologies GmbH; b) Prometheus NT.48 nanoDSF Report, 08.04.2016
- [9] E.R.S. Kunji, M. Harding, P.J.G. Butler, P. Akamine, *Methods* 2008, 46, 62.
- [10] L.D. Cabrita, G.Dimitri, A.L. Robertson, Y. Dehouck, M. Rooman, S.P. Bottomley, *Journal List Protein Sci* **2007**, 16, 2360–2367.
- [11] P. Csuka, V. Juhász, S. Kohári, A. Filip, A. Varga, P. Sátorhelyi, L.C. Bencze, H. Barton, C. Paizs, L. Poppe, *ChemBioChem* 2018, 19, 1–9.
- [12] R. Eisenthal, M.J. Danson, D.W. Hough, *Trends Biotechnol.* **2007**, 25, 247–249.
- [13] K.R. Hanson, E.A. Havir, *Arch. Biochem. Biophys.* 1970, 141, 1–17
- [14] A. Dreßen, T. Hilberath, U. Mackfeld, A. Billmeier, J. Rudat, M. Pohl, *J. Biotechnol.* **2017**, 258, 148–157.
- [15] W. Liu, US Pat 5,981,239, to Great Lakes Chemical Co. *Chem. Abstr.* **1999**, 131, 321632.
- [16] C. Paizs, M.I. Toşa, L.C. Bencze, J. Brem, F.D. Irimie, *Heterocycles* **2011**, 82, 1217–1228