



**Universitatea Babeş-Bolyai**

**Cluj-Napoca**



**Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică**

**Școala Doctorală de Chimie**

**Ingineria proteică a fenilalanină amoniac-  
liazelor pentru sinteza aril-alaninelor de  
importanță ridicată**

**Rezumatul Tezei de Doctorat**

**Doctorand: Emma Zsófia Aletta Nagy**

**Conducător Științific: Prof. Habil. Dr. Ing. Csaba Paizs**

**Cluj Napoca**

**2021**



Babeş-Bolyai University

Cluj-Napoca



Faculty of Chemistry and Chemical Engineering

Doctoral School of Chemistry

**Protein engineering of phenylalanine ammonia-lyases for  
the synthesis of arylalanines of high synthetic importance**

PhD Thesis Abstract

**PhD** Emma Zsófia Aletta Nagy

**candidate:**

**President:** Prof. Dr. Cristian Sorin Silvestru – *member of the Romanian Academy, Babeş-Bolyai University, Cluj-Napoca*

**Scientific advisor:** Prof. Habil. Dr. Eng. Csaba Paizs – *Babeş-Bolyai University, Cluj-Napoca*

**Reviewers:** Prof. Dr. Ionel Mangalagiu – *„Alexandru Ioan Cuza” University of Iași*

Assoc. Prof. Dr. Mădălina Valentina Săndulescu-Tudorache – *University of Bucharest*

Prof. Dr. Ion Grosu – *corresponding member of Romanian Academy – Babeş-Bolyai University, Cluj-Napoca*

**Cluj Napoca**

**2021**

## Cuprins

1. Introducere.....	4
1.1. Aminoacizi optic puri.....	4
1.2. Fenilalanină amoniac-liaza din <i>Petroselinum crispum</i> (PcPAL).....	5
1.3. Cuplarea reacțiilor catalizate de PAL cu decarboxilarea catalizată de FDC1 .....	6
1.3.1. Decarboxilaza acidului ferulic (FDC1) din <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	7
2. Obiectivele studiului.....	8
3. Rezultate și discuții.....	11
3.1. Sinteza chimică a substraturilor și dezvoltarea metodelor analitice utilizate pentru monitorizarea reacțiilor enzimatiche.....	11
3.1.1. Sinteza chimică a aminoacizilor racemici <i>rac</i> -2a-1.....	11
3.1.2. Sinteza chimică a acizilor acrilici .....	11
3.1.3. Sinteza probei fluorogenice de diariltetrazol .....	12
3.1.4. Metode HPLC pentru determinarea conversiei biotransformărilor mediate de PAL .....	13
3.1.5. Metode HPLC pentru determinarea conversiei biotransformărilor mediate de FDC1 .....	13
3.2. Inginerie proteică bazată pe proiectare rațională a enzimei PAL din <i>Petroselinum crispum</i> .....	14
3.2.1. Generarea unei biblioteci de mutații PcPAL prin proiectare rațională.....	14
3.2.2. Screening-ul activității și selectivității bibliotecii mutante PcPAL.....	14
3.2.3. Măsurători cinetice ale reacțiilor enzimatiche .....	18
3.2.4. Aplicabilitatea sintetică a variantelor PcPAL proiectate.....	19
3.2.5. Studii de cristalizare.....	20
3.2.6. Concluzii .....	21
3.3. Dezvoltarea testului de activitate „high-throughput” a enzimei PAL aplicabil pentru ingineria proteică bazată pe evoluție direcționată.....	21
3.3.1. Explorarea și extinderea domeniului substratului decarboxilazei acidului ferulic pentru asigurarea compatibilității cu domeniul substratului enzimei PAL.....	22
3.3.2. Configurarea și validarea testului de activitate „high-throughput” fluorescent al enzimei cuplate...30	
4. Concluzii generale.....	36
5. Mulțumiri.....	37
6. Lista publicațiilor .....	38
7. Referințe .....	39

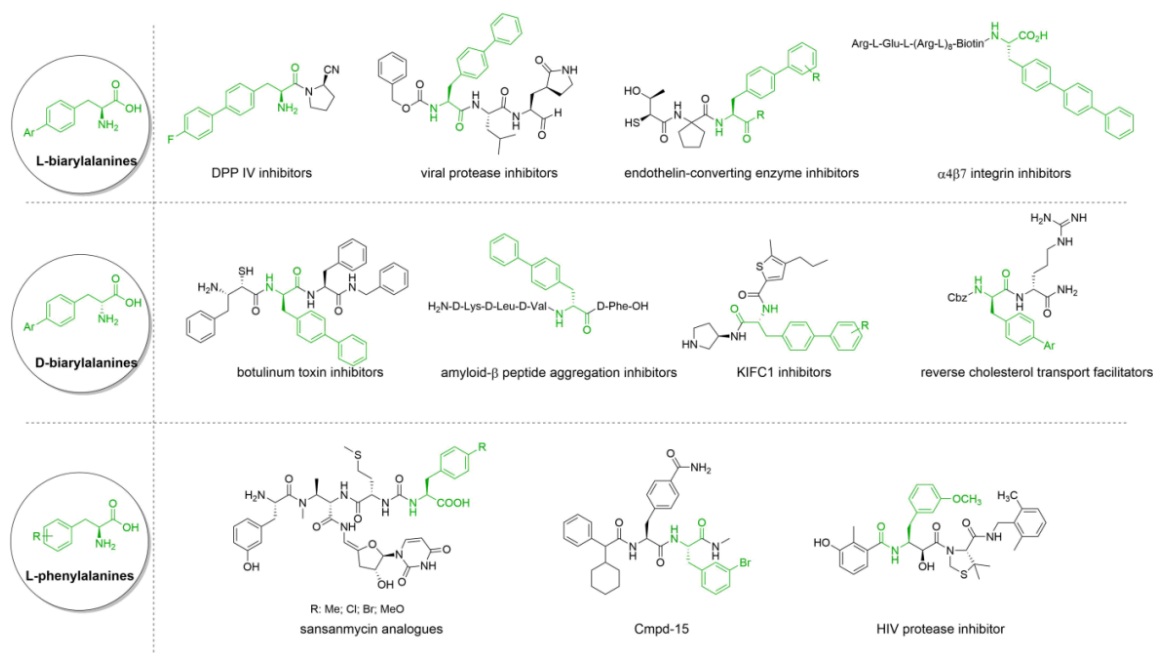
**Cuvinte cheie:** biocataliză, aminoacizi nenaturali, fenilalanin amoniac-liaza, decarboxilaza acidului ferlic, metode de activitate enzimatică high-throughput

## 1. Introducere

### 1.1. Aminoacizi optic puri

Aminoacizii enantiopuri nenaturali ( $ee > 99\%$ ) sunt elemente importante pentru sinteza multor medicamente, pentru prepararea de noi medicamente peptidice ciclice și liniare prin încorporarea lor în peptide non-ribozomale (PNR). L- și D-biarylalaninele sunt elemente cheie importante pentru prepararea mai multor inhibitori și a compușilor farmaceutic active (API), ambele cu implicații în dezvoltarea medicamentelor<sup>2</sup>. Aminoacizii heterociclici foarte îmbogățiti enantiomeric sunt, de asemenea, frecvent implicați pentru prepararea substanțelor utile. D-arylalaninele sunt intermediari importanți în sinteza medicamentelor antivirale, cum ar fi Fosamprenavirul și Saquinavirul, sau Clientide cu efect antineoplazic, Nateglinida antidiabetică și anticoagulantul Melagatran. L-sau D-fenilalanine para-substituite cu grupări electron-atrăgătoare, cum ar fi fluoro-, cloro- și nitro- sunt precursori ai Aprepitantului antiemetic, Abarelix antineoplazic și Zolmitriptan analgesic.<sup>3</sup> Incorporarea L-4-F-, 4-Br-, 4-Me- sau 4-MeO-fenilalaninelor în diferite structuri a condus la patru noi analogi de sansamicină, care sunt membri ai antibioticelor uridil-peptidice (UPA).<sup>4</sup> (Figura 1).

Teza actuală se concentrează pe utilizarea fenilalanină amoniac-liazelor (PAL) ca biocatalizatori utili pentru producerea derivaților optici puri ai D- și L-fenilalaninei.<sup>5</sup>

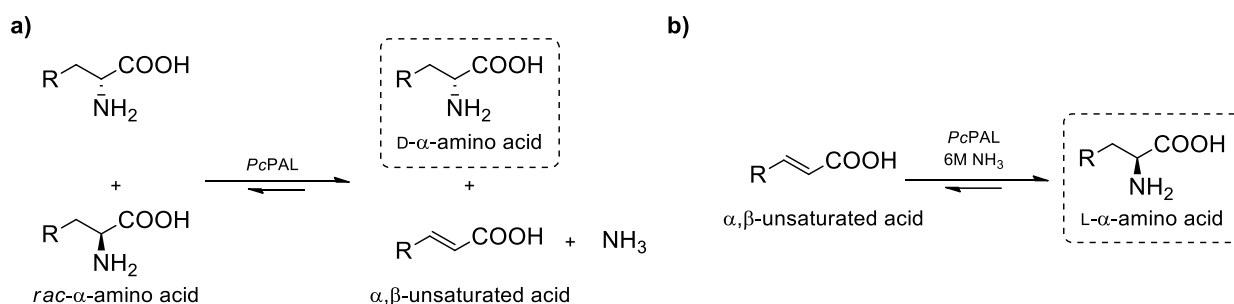


**Figura 1.** Aminoacizi non-naturali optic puri ca elemente de construcție chirale

## 1.2. Fenilalanină amoniac liaza din *Petroselinum crispum* (PcPAL)

Fenilalanină amoniac liaza (PAL), sub formă de diferite izoenzime, se găsește pe scară largă în plante, precum și în drojzii și ciuperci<sup>6</sup>. Datorită toleranței largi a substratului, fenilalanină amoniac liaza din *Petroselinum crispum* (PcPAL) este cea mai performantă amoniac liază MIO-dependentă.

PcPAL poate fi utilizat pentru sinteza stereoselectivă a aminoacizilor. În condiții naturale de reacție, pornind de la aminoacizi racemici ca substraturi, prin eliminarea amoniacului L-selectiv, D-aminoacizii nereactivi pot fi obținuți cu un randament teoretic maxim de 50%. Dimpotrivă, în prezența unei concentrații mari de amoniac, aceleași enzime pot media reacția inversă, și anume adăugare de amoniac pe acizi acrilici  $\alpha$ ,  $\beta$ -nesaturați, producând L-aminoacizi cu un randament teoretic maxim de 100% (**Figura 2.**).



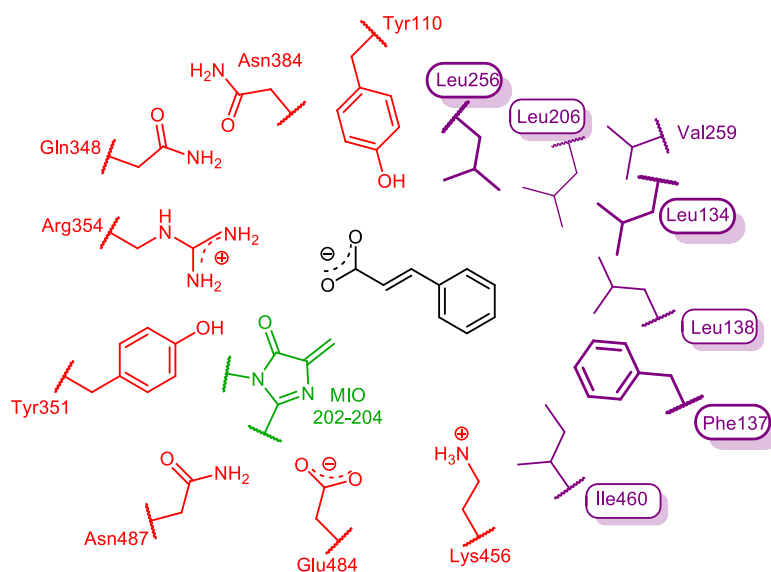
**Figura 2. a)** Eliminarea stereoselectivă catalizată de PcPAL cu un randament teoretic maxim de 50%.

**b)** Adăugare stereoselectivă catalizată de PcPAL cu un randament teoretic maxim de 100%.

Situsul activ al enzimei PcPAL conține o regiune de legare hidrofobă (marcată cu violet) și o regiune polară, de legare a grupărilor carboxil și amino (marcată cu roșu), precum și gruparea MIO (marcată cu verde) (**Figura 3.**)<sup>7</sup>.

Studiile mutaționale în regiunea de legare a grupărilor carboxilice și amino în situsul activ al enzimei au relevat lanțurile laterale esențiale ale aminoacizilor. De asemenea, s-au efectuat studii mutaționale în regiunea de legare hidrofobă (marcată cu violet) a enzimei, ceea ce duce la creșterea activității enzimei în comparație cu enzima sălbatică. Mutația restului Phe137 la Val a arătat creșterea vitezei de reacție în reacția de dezaminare și aminare a substraturilor L-Phe și L-*p*-NO<sub>2</sub>-Phe<sup>7</sup>.

Cu toate acestea, era încă discutabil dacă în timpul acomodării fragmentelor aril ale substraturilor în buzunarul de legare hidrofob al situsului catalitic, există vreo corelație între poziția (*orto*-, *meta*-, *para*-) substituenților inelului aril ai substraturilor și anumite resturi specifice de aminoacizi ale proteinei.



**Figura 3.** Situl activ al enzimei *PcPAL* în conformitate cu modelul sitului activ al *PcPAL* (PDB ID 1W27) cu acid *trans*-cinamic modelat<sup>8</sup>

### 1.3. Cuplarea reacțiilor catalizate de PAL cu decarboxilarea catalizată de FDC1

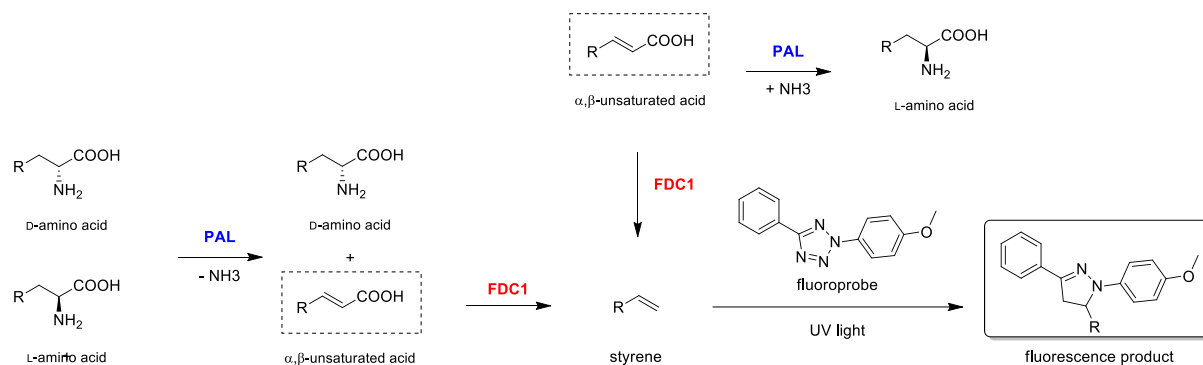
Biotransformările în cascadă câștigă teren în ultimul deceniu. Eficacitatea cuplării transformărilor catalizate de PAL cu alte reacții enzimatice, cum ar fi decarboxilarea mediată de decarboxilaza acidului ferulic (FDC1), au fost demonstrate pentru producerea mai multor substanțe chimice valoroase folosind biocatalizatori de celule întregi care conțin atât gene *pal* cât și *fdcI*<sup>9,10,11</sup>. Studiile primare s-au concentrat pe producția de stiren de către tandemul PAL-FDC1 pornind de la L-fenilalanina biosintetizată de aceeași celulă din glucoză printr-o cale shikimat intensificată<sup>12,13</sup>.

Pe de altă parte, studii recente au arătat că diariltetrazolul poate fi utilizat pentru sensibilitatea ridicată la detectarea alchenelor<sup>14,15,16</sup>, generând produși fluorescenți printr-o cicloadiție 1,3-dipolară fotoactivată. Mai mult, compatibilitatea detectării în cazul sistemelor biologice a fost demonstrată și de expresia cu succes a proteinelor care conțin alchenă în *E.coli*<sup>16</sup>.

Conoscând acestea, am propus dezvoltarea unei noi analize de activitate fluorescentă high-throughput cu enzimă cuplată pentru reacțiile catalizate de PAL utilizând decarboxilaza acidului ferulic (FDC1) pentru decarboxilarea acidului cinamic, produsul / substratul reacției naturală/inversă catalizată de PAL, urmată de reacția de cicloadiție între stirenul produs și o probă fluorogenă de tetrazol (**Figura4**).

Prin urmare, în cadrul analizei activității PAL, decarboxilaza acidului ferulic (FDC1) din *Saccharomyces cerevisiae* a fost prevăzută a fi utilizată ca enzimă cuplată. Prin urmare, a

trebuie evaluată compatibilitatea domeniului de substrat, cât și condiția de reacție a celor două enzime, *PcPAL* și *ScFDC1*.



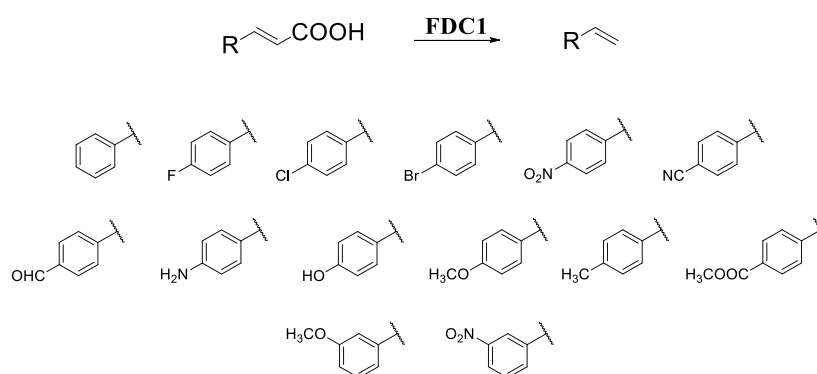
**Figura 4.** Testul de fluorescență propus pentru PAL și FDC1 cuplate

### 1.3.1. Decarboxilaza acidului ferulic (FDC1) din *Saccharomyces cerevisiae*

Reacția de decarboxilare catalizată de *ScFDC1* este prima reacție enzimatică descoperită care implică inițial o cicloadiție 1,3-dipolară între prFMN și dubla legătură a acidului fenilacrilic<sup>17</sup>.

- **Domeniul de substrat**

Utilitatea biocatalitică a acestei enzime a fost demonstrată doar pe puțini acizicinanmici para-substituiți, așa cum se arată în **Figura 5**<sup>17</sup>.



**Figura 5.** Regiunea substratului studiat a enzimei *ScFDC1*

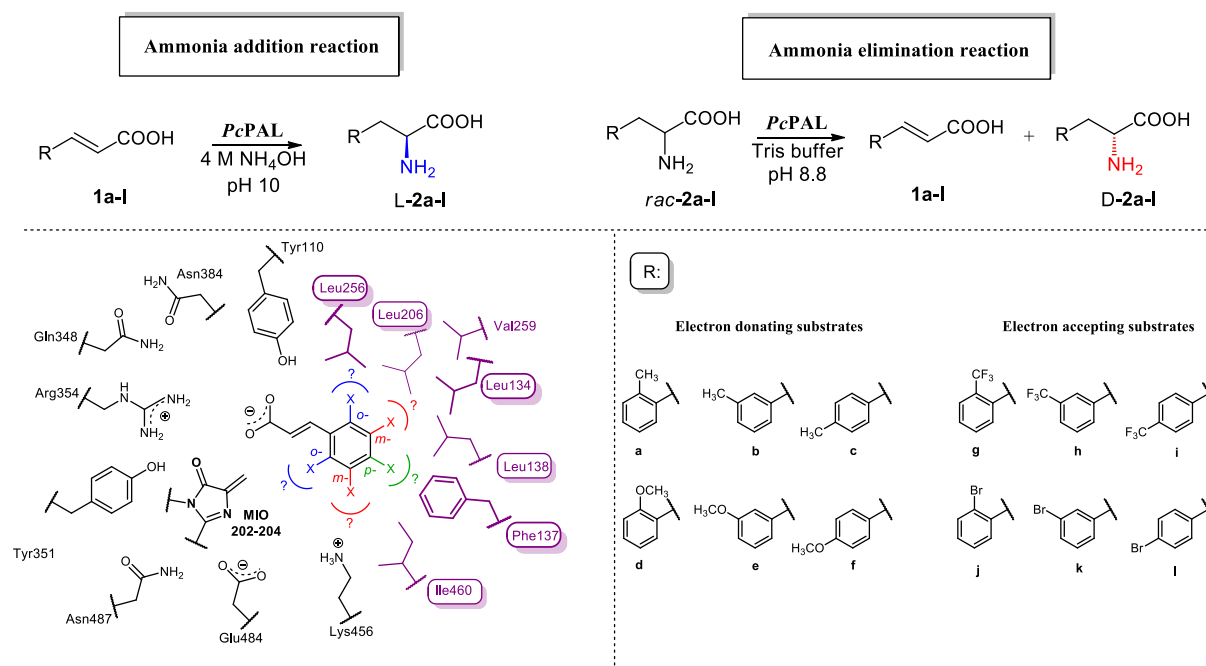
Cu toate acestea, sfera mai largă a substratului enzimei *ScFDC1* era încă neexplorată. Pentru dezvoltarea unui test de activitate versatil și de încredere, a enzimei PAL asistată de FDC1, valabil pentru o gamă largă de substrat, este obligatorie verificarea suprapunerii domeniilor substratului celor două enzime.

## 2. Scopurile studiului

Scopul principal al tezei este dezvoltarea biocatalizatorilor PAL utili pentru sinteza mai multor analogi non-naturali ai fenilalaninei. Pentru îndeplinirea obiectivului vizat, au fost avute în vedere rezultatele de succes ale următoarelor obiective:

**Obiectiv 1. Sinteza chimică a substraturilor și dezvoltarea metodelor analitice utilizate pentru monitorizarea reacțiilor enzimatiche.** Sinteza analogilor fenil, heteroaril voluminos sau biaril ai fenilalaninei și acid cinamic diferit substituiți (*orto*-, *meta*-, *para*-), servind drept substraturi pentru reacțiile PAL (Ob. 2. și 3.1.), dar și pentru decarboxilări mediate de decarboxilaza acidului ferulic (Ob. 3.2.). Pentru fiecare reacție enzimatică vor fi dezvoltate metode HPLC pentru monitorizarea activităților enzimatiche prin determinări de conversie și / sau stereoselectivitate, prin determinarea excesului enantiomeric.

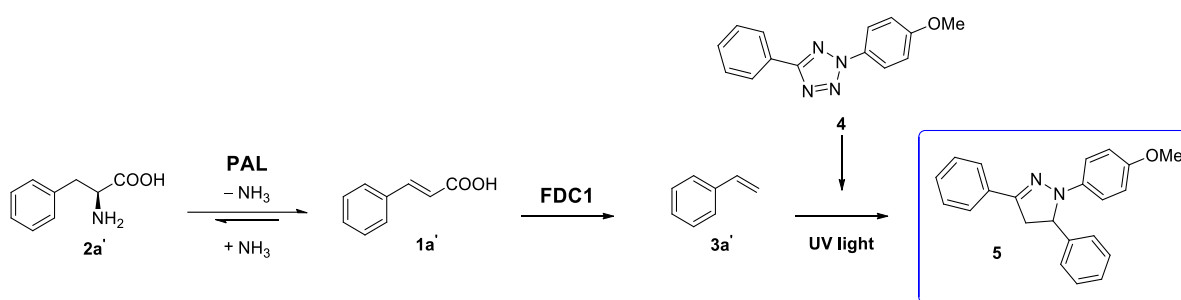
**Obiectiv 2. Ingineria proteinei bazată pe design rational a PAL din *Petroselinum crispum*.** Pe baza informațiilor structurale existente ale enzimelor PAL, am avut în vedere cartografierea situsului activ al *PcPAL* prin analiza mutațională, pentru a identifica posibile corelații sterice dintre substituenții atașați în diferite poziții (*orto*-, *meta*-, *para*-) la inelul aril a substratului și resturilor specifice ale sitului activ din regiunea de legare hidrofobă a enzimei (**Figura 6.**).



**Figura 6.** Redesign rațională a *PcPAL* și aplicabilitatea sa pentru sinteza fenilalaninei și a analogilor acidului cinamic de mare valoare sintetică

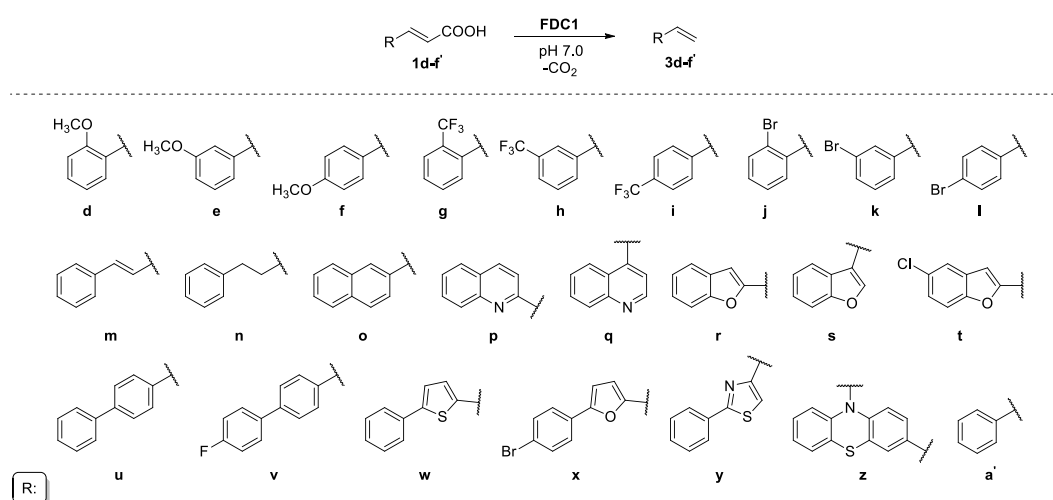


**Obiectivul 3. Dezvoltarea unei noi analize de activitate high-throughput a enzimei PAL, aplicabilă pentru ingineria proteică bazată pe evoluție direcționată.** În timp ce s-a dezvoltat analiza de activitate high-throughput a enzimei PAL<sup>16</sup>, aplicabilitatea lor generală era încă limitată. În consecință, ne-am propus să dezvoltăm o analiză fluorescentă cu enzimă cuplată, aplicabilă pentru screening-ul de activitate al enzimei PAL la nivelul celulei întregi, care implică decarboxilarea acidului trans-cinamic (produsul reacției PAL) prin decarboxilaza acidului ferulic (FDC1) și o reacție fotochimică a stirenului produs **3a'** cu un diariltetrazol **4**, care generează un produs detectabil, fluorescent de pirazolină **5** (Figura 7.).



**Figure 7.** Test fluorescent propus cu enzima cuplată aplicabil pentru screening de activitate PAL

**Obiectivul 3.1. Explorarea și extinderea domeniului de substrat al decarboxilazei acidului ferulic pentru asigurarea compatibilității sale cu domeniul de substrat al enzimei PAL.** Domeniul substratului ScFDC1 a fost testat folosind analogi de acid cinamic care pot fi obținuți din reacțiile PAL. Un domeniu larg de substrat al ScFDC1 ar oferi aplicabilitate generală a analizei cu enzima cuplată față de activitățile PAL pentru diferite substraturi (Figura 8.).



**Figura 8.** Explorarea domeniului de substrat al ScFDC1 folosind analogi de acid cinamic care pot fi obținuți din reacțiile PAL

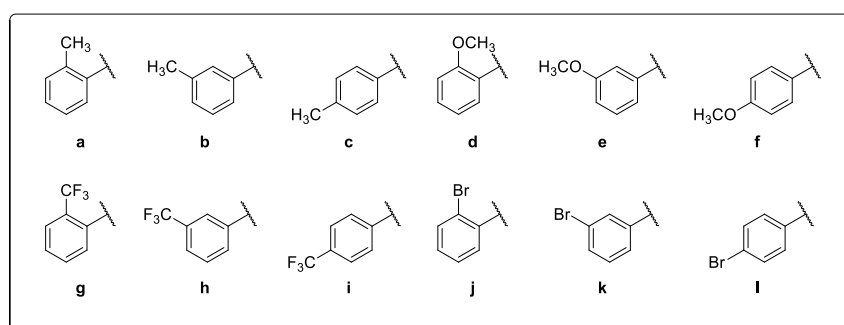
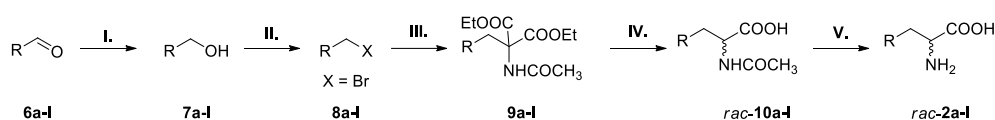
**Obiectivul 3.2. Organizarea și validarea testului de activitate high-throughput fluorescent al enzimei cuplate pentru reacția PAL naturală.** Testul cuplurilor enzimatic dezvoltat a fost folosit în cadrul analizelor de activitate ale marilor biblioteci mutante de PAL-uri (obținute în cadrul Obiectivului 1) în prezența substraturilor nenaturale de interes. Mai mult, a fost studiată și aplicabilitatea generală a testului fluorescent pentru PAL-uri de origine diferită, precum și versatilitatea sa pentru detectarea activității tirozin amoniac-liazei (TAL).

### 3. Rezultate și discuții

#### 3.1. Sinteza chimică a substraturilor și dezvoltarea metodelor analitice utilizate pentru monitorizarea reacțiilor enzimatic

##### 3.1.1. Sinteza chimică a aminoacizilor racemici *rac-2a-l*

Aminoacizii racemici *rac-2a-l* au fost obținuți printr-o cale de sinteză pornind de la aldehydele disponibile în comerț **6a-l**. Aldehydele **6a-l** au fost reduse la alcooli primari **7a-l** folosind NaBH<sub>4</sub>. Alcoolii primari **7a-l** au fost halogenați, iar din compușii bromurați **8a-l** prin cuplare cu acid malonic s-au obținut dietil acetamidomalonati **9a-l**. Printr-o hidroliză alcalină ușoară a **9a-l**, urmată de o reacție de decarboxilare, s-au obținut aminoacizii N-acilați *rac-10a-l*. În cele din urmă, aminoacizii racemici *rac-2a-l* au fost obținuți prin deprotejarea *rac-10a-l* utilizând hidroliza acidă (**Figura 9**). Compușii sintetizați *rac-2a-l* au fost caracterizați prin măsurători <sup>1</sup>H RMN și <sup>13</sup>C RMN.

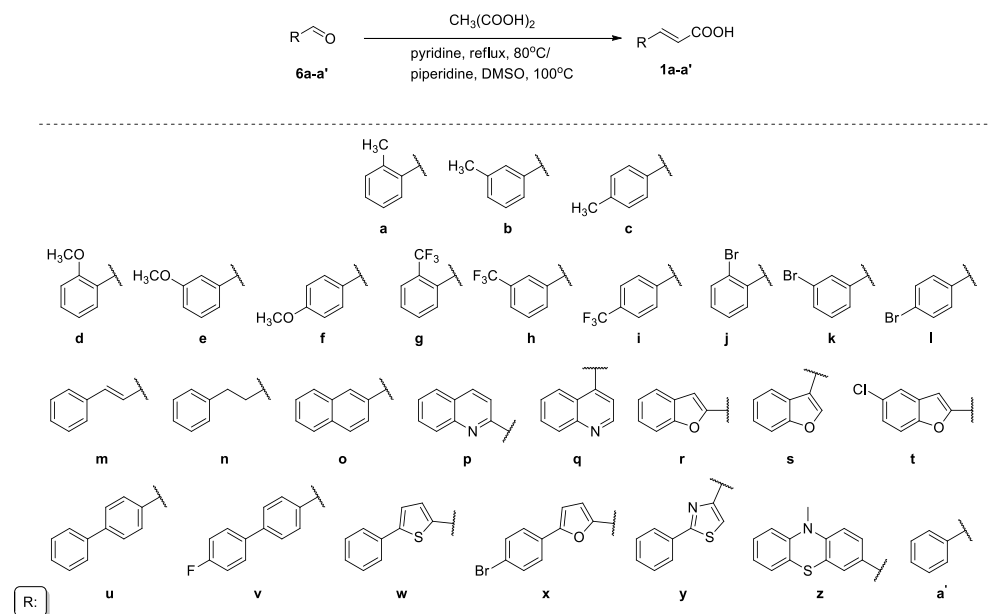


I. NaBH<sub>4</sub>, MeOH, r.t; II. N-bromosuccinimide, PPh<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t; III. NaH, CH<sub>3</sub>CONH(CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub>, DMF, 60°C; IV. a) 10% NaOH, MeOH, reflux; b) toluene, reflux; V. 18% HCl, 1,4-dioxane, reflux

**Figura9.** Sinteza aminoacizilor racemic *rac-2a-l*

##### 3.1.2. Sinteza chimică a acizilor acrilici

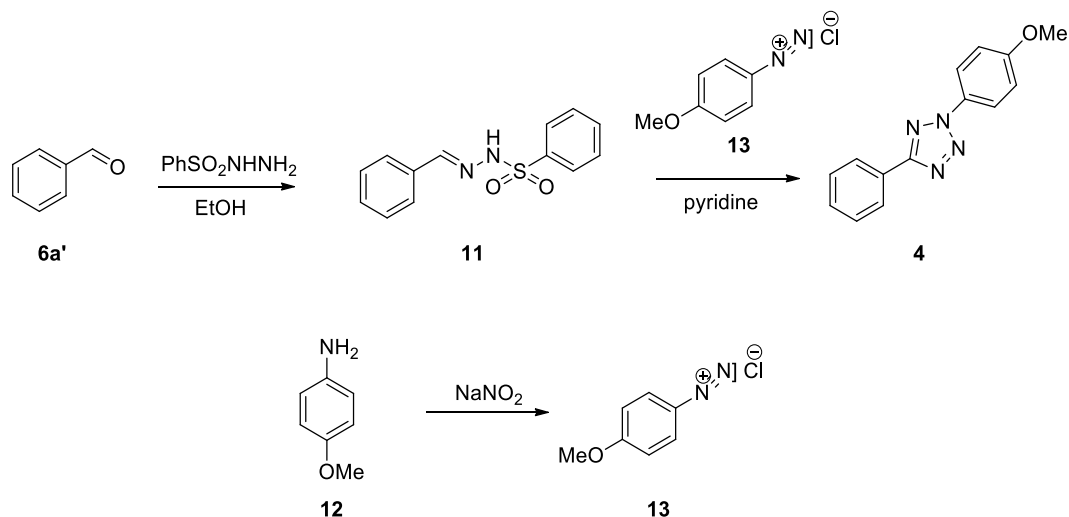
Sinteza derivaților acrilici **1a-z**, **1a'** fost realizată folosind aldehydele corespunzătoare **6a-a'** ca material de pornire, prin reacția Knoevenagel-Doebner (**Figura 10**). Compușii sintetizați **1a-z**, **1a'** au fost caracterizați prin măsurători <sup>1</sup>H RMN și <sup>13</sup>C RMN.



**Figura 10.** Sinteza derivaților acidului acrilic **1a-z**, **1a'**

### 3.1.3. Sinteza probei fluorogenice de diariltetrazol

Proba fluorogenică tetrazol **4**, utilă pentru dezvoltarea testului fluorescent al activității PAL (Obiectivul 3), a fost obținută printr-o cale de sinteză pornind de la aldehida **6a'** disponibilă comercial. Aldehida **6a'** din reacția cu fenilsulfonilhidrazină rezultă fenilsulfonilhidrazona **11**, care la reacția cu sarea de 4-metoxifenildiazoniu **13** a rezultat produsul tetrazol, 2-(4-metoxifenil)-5-fenil-2*H*-tetrazol **4** (**Figura 11**). Derivatul de tetrazol **4** a fost utilizat în continuare ca probă fluorogenă în cadrul testului fluorescent.



**Figure 11.** Calea sintetică pentru 2-(4-metoxifenil)-5-fenil-2*H*-tetrazol (**4**)

### 3.1.4. Metode HPLC pentru determinarea conversiei biotransformărilor mediate de PAL

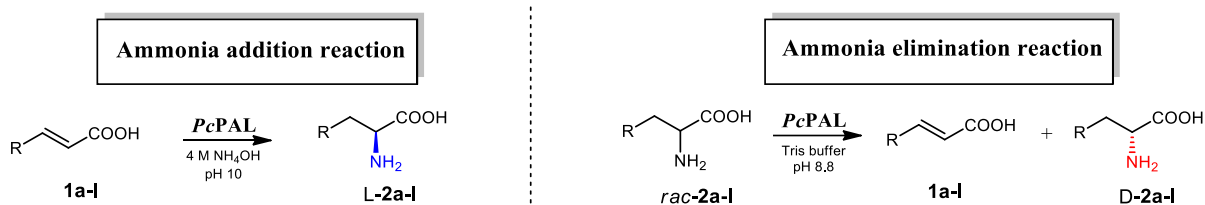


Figura 12. Reacții de adiție și eliminare a amoniacului catalizate de PcPAL

Pentru a investiga conversiile reacțiilor de eliminare a amoniacului catalizate de PcPAL și reacții de adiție a amoniacului (Figura 12.), s-a determinat factorul de răspuns relativ al produsului și substratului, dar și derivații acidului cinamic raportați la aminoacizi. În acest scop, amestecul aminoacidului racemic corespunzător, de compoziție cunoscută, *rac-2a-I* și derivatul acrilic corespunzător **1a-I** a fost injectat pe coloana Gemini NX-C18 (150 × 4,5 mm; 5 μm) și eluat cu condiții diferite (asigurând separarea fenilalaninei racemice și a derivaților corespunzători ai acidului cinamic), în timp ce raporturile ariilor picurilor corespunzătoare au fost corelate cu raporturile molare ale reactantului și ale produsului.

Pentru a determina valoarea excesului enantiomeric (*ee*) a **D-2a-I** obținută din reacțiile de eliminare a amoniacului și a **L-2a-I**, produsul reacțiilor de adiție a amoniacului, au fost dezvoltate metode de separare HPLC chirale ale *rac-2a-I* folosind Coloana chirală Crownpak CR-I (+) (150 × 3 mm; 5 μm) și HClO<sub>4</sub> (pH = 1,5): ACN ca fază mobilă, la diferite debite.

### 3.1.5. Metode HPLC pentru determinarea conversiei biotransformărilor mediate de FDC1

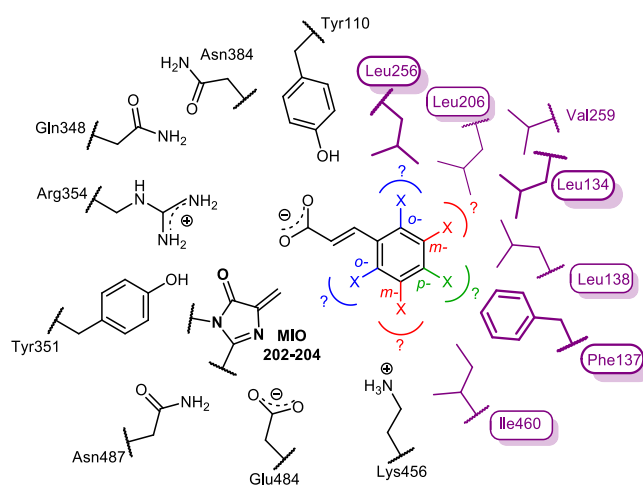
Pentru a explora domeniul de aplicare al substratului *ScFDC1* (Obiectivul 3.1), au fost dezvoltate metode HPLC pentru determinarea conversiei reacțiilor enzimatic catalizate de FDC1. Cuantificarea conversiilor s-a bazat pe consumul de substraturi ale acidului cinamic **1d-z, a'**, monitorizat prin RP-HPLC, folosind anisol ca standard intern și coloane Gemini NX-C18 150 × 4,5 mm sau Zorbax SB-C8 50 × 2,1 mm, la debit: 1 mL / min în diferite condiții de eluare. Curbele de calibrare au fost obținute prin injectarea de amestecuri de diferite concentrații de derivați ai acidului cinamic și concentrație fixă (5 mM) a standardului intern.

## 3.2. Inginerie proteică bazată pe design rațional a PAL din *Petroselinum crispum*

### 3.2.1. Generarea unei biblioteci de mutații *PcPAL* prin design rațional

Prin înlocuirea individuală prin mutagenază situs direcționată a fiecărui rest de aminoacid din buzunarul de legare hidrofob al situsului activ *PcPAL* la Ala (A) și Val (V), mai puțin voluminoase, a fost obținută o bibliotecă concisă de mutații unici (**Figura 13.**).

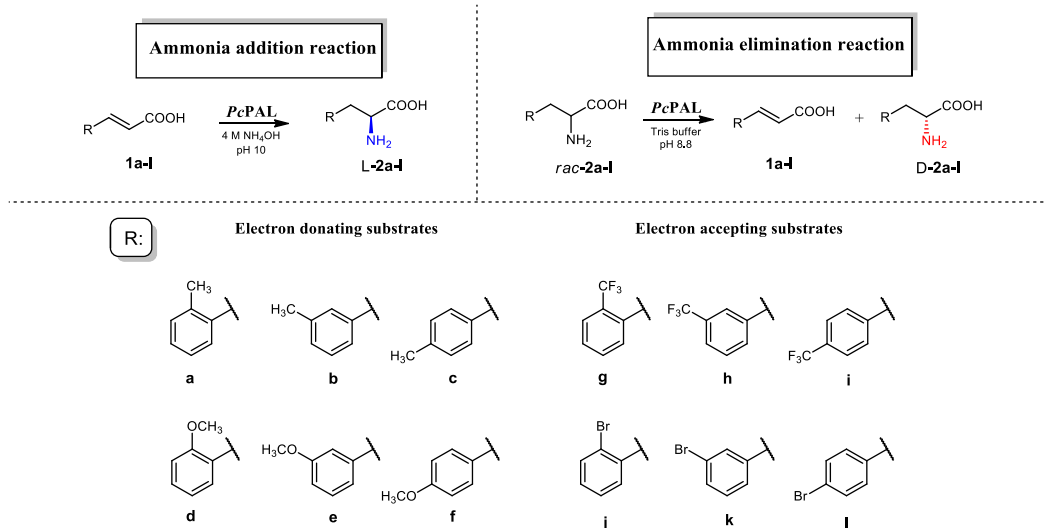
Entry	<i>PcPAL</i> mutants
1	L134A
2	L134V
3	F137A
4	F137V
5	L138A
6	L138V
7	L206A
8	L206V
9	L256A
10	L256V
11	I460A
12	I460V



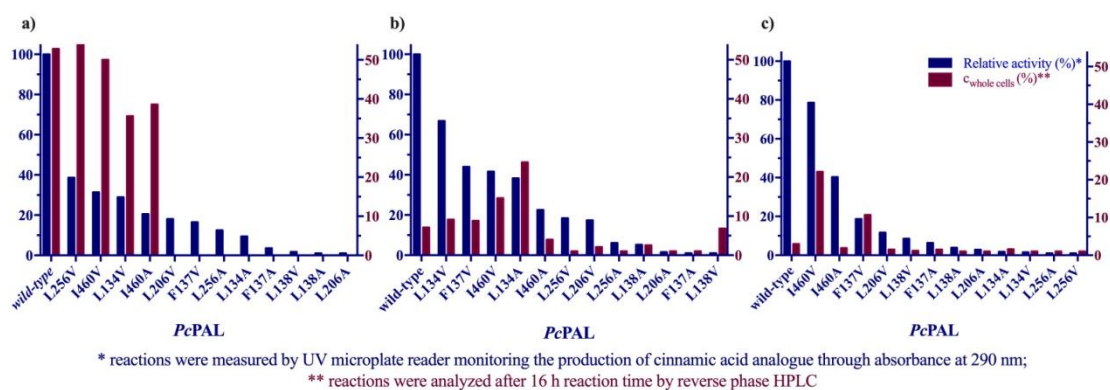
**Figura 13.** Lista bibliotecii mutante *PcPAL*, obținută prin înlocuirea resturilor buzunarului de legare hidrofob (violet) al situsului activ al enzimei la Ala (A) și Val (V), mai puțin voluminoase

### 3.2.2. Screening-ul activității și selectivității bibliotecii mutante *PcPAL*

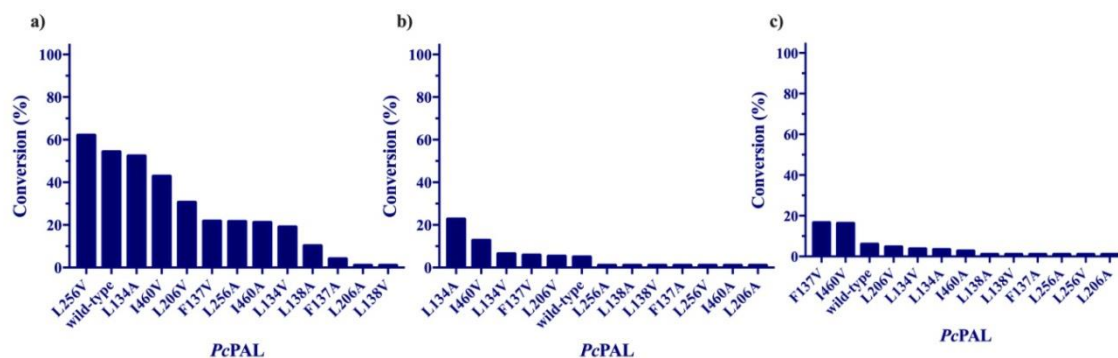
Am testat biblioteca mutantului *PcPAL* în reacțiile de adiție a amoniacului și de eliminare a amoniacului, folosind ca substraturi analogi ai acidului cinamic și fenilalaninei, mono-substituiți în toate pozițiile (*o*-, *m*-, *p*-) inelului aromatic, cu ambii substituenți electrono-donor (-CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>) și electrono-atrăgător (-CF<sub>3</sub>, -Br) (**Figura 14.**). Primele activități inițiale relative ale enzimei au fost măsurate pentru a identifica cele mai bune variante mutante cu cele mai mari activități enzimatică atât în reacțiile de eliminare a amoniacului, cât și în cele de adiție (**Figura 15., Figura 16.**). Mutații cu cele mai bune performanțe, cu cele mai mari trei conversii și activități relative, au fost folosite în continuare în screening-urile de selectivitate și, pe lângă valorile de conversie ale substraturilor, au fost de asemenea determinate excesele enantiomerice (*ee<sub>p</sub>*) ale produșilor (**Tabelul 1-3.**).



**Figura 14.** Anali ai acidului cinnamic și fenilalaninei, monosubstituiți în toate pozițiile (*o*-, *m*-, *p*-) cu substituenți electrono-donori (-CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>) și electron-atrăgători (-CF<sub>3</sub>, -Br) folosiți în reacțiile de adăiere și eliminare de amoniac a mutațiilor PcPAL



**Figura 15.** Screening reprezentativ al activității pentru reacțiile de eliminare a amoniacului folosind analogi ai fenilalaninei metil-substituită *rac-2a*, *2b*, *2c*



**Figura 16.** Valorile de conversie a reacțiilor de adăiere a amoniacului a derivaților acidului acrilic metil-substituit *1a*, *1b*, *1c* după 16 h

Mutații cu cele mai bune performanțe, cu cele mai mari trei conversii și activități relative, au fost folosite în continuare în screening-urile de selectivitate și, pe lângă valorile de conversie ale substraturilor, au fost de asemenea determinate excesele enantiomerice ( $ee_p$ ) ale produșilor (**Tabelul 1-3.**).

În ambele reacții de adădire și eliminare a amoniacului, mutații similare au oferit proprietăți catalitice sporite, în ciuda diferențelor dintre mediul de reacție pentru adădire de amoniac (4-6 M NH<sub>3</sub>, pH 10, tamponat cu CO<sub>2</sub>) și cel de eliminare a amoniacului (Tris.HCl, pH 8,8), sugerând că buzunarul hidrofob al sitului activ adoptă o pliere similară față de substrat în ambele căi de reacție.

În cazul analogilor de substrat *o*-substituiți, wt-*PcPAL* și varianta L256 au oferit cele mai mari conversii atât în reacțiile de adădire, cât și de eliminare a amoniacului, cu excepția în cazul substraturilor substituite cu *o*-metoxi **rac-2d** și **1d** în care mutații L256 și *PcPAL* de tip sălbatic au furnizat un nivel scăzut activitate (0-1% conversie), în timp ce mutantul L134A, la fel ca în cazul substraturilor care conțin *meta*-substituenți liniari (**1b, e, k, rac-2b, e, k**), au prezentat o conversie semnificativ crescută (29,3% pentru *rac-2d* și 47,9% pentru **1d**), susținând o orientare spațială a grupării metil spre restul L134 (**Tabelul 1.**).

**Tabel 1.** Conversia și valorile exceselor enantiomerice ale celor mai buni mutați *PcPAL* și *PcPAL* de tip sălbatic în reacțiile de adădire și eliminare a amoniacului pe substraturi *orto*-substituite după 16 ore de reacție

Substituent <i>-orto</i>		Grupare electron-atrăgător						Grupare electron-donor					
		-Br			-CF <sub>3</sub>			-CH <sub>3</sub>			-OCH <sub>3</sub>		
		E	c	ee	E	c	ee	E	c	ee	E	c	ee
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
Tip de reacție	Adădire de amoniac*	<b>1j</b>			<b>1g</b>			<b>1a</b>			<b>1d</b>		
		L256V	91.5	>99	L134A	78.4	>99	L256V	62.1	>99	L134A	47.9	>99
		L256A	89.8	>99	L256V	77.6	>99	wt	54.3	>99	L134V	18.5	>99
		wt	89.0	>99	wt	76.2	>99	L134A	52.4	>99	L206V	5.7	>99
	F137V	85.9	>99	L206V	76.1	>99	I460V	47.4	>99	wt	<1	-	
	Eliminare de amoniac*	<i>rac-2j</i>			<i>rac-2g</i>			<i>rac-2a</i>			<i>rac-2d</i>		
		L256V	49.1	97.2	L256V	50.8	>99	L256V	54.9	>99	L134A	29.3	41.1
		L256A	44.8	84.8	L206V	51.8	>99	wt	52.8	>99	I460V	1.3	1.3
I460V		44.7	79.3	L256A	50.0	>99	I460V	50	>99	wt	1.0	1.1	
wt	42.0	72.4	wt	49.0	94.0	I460A	38.6	62.8	L256A	<1	-		

\*reacțiile au fost efectuate în condițiile screening-urilor inițiale



În cazul substraturilor *meta*-substituite, mutațiile L134A și I460V au oferit conversii mai mari atât în reacțiile de adiție, cât și de eliminare a amoniacului (**Tabelul 2.**), în conformitate cu modelul propus de legare a substratului (**Figura 13.**), deoarece mutația ambelor resturi L134, I460 la Ala (A) și Val (V) mai puțin voluminoase ar putea oferi mai mult spațiu pentru *meta*-substituenții ai substratului.

**Tabel 2.** Conversia și valorile exceselor enantiomerice ale celor mai buni mutanți *PcPAL* și *PcPAL* de tip sălbatic în reacțiile de adiție și eliminare a amoniacului pe substraturi *meta*-substituite după 16 ore de reacție

Substituent <i>-meta</i>		Grupare electron-atrăgător						Grupare electron-donor					
		-Br			-CF <sub>3</sub>			-CH <sub>3</sub>			-OCH <sub>3</sub>		
		E	c	ee	E	c	ee	E	c	ee	E	c	ee
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
Tip de reacție	Adiție de amoniac*	<b>1k</b>			<b>1h</b>			<b>1b</b>			<b>1e</b>		
		L134A	79.6	>99	I460V	36.9	>99	L134A	22.7	>99	L134A	73.0	>99
		I460V	68	>99	L134A	17.5	>99	I460V	12.7	>99	F137V	24.5	>99
		I460A	29.6	>99	L138V	11.1	>99	L134V	9.8	>99	wt	16.9	>99
		wt	28.9	>99	wt	<1	-	wt	4.9	>99	I460V	4.2	>99
	Eliminare de amoniac*	<i>rac-2k</i>			<i>rac-2h</i>			<i>rac-2b</i>			<i>rac-2e</i>		
		L134A	48.9	94.1	I460V	31.4	49.5	L134A	23.8	31.2	L134A	51.2	>99
		I460V	42.4	77.8	L134A	26.2	38.5	I460V	14.6	20.4	L134V	29.5	40.3
wt		31.4	47.0	wt	9.1	9.9	L134V	9.1	10.2	wt	16.1	20.2	
	F137V	24.5	33.0	F137V	6.9	7.5	wt	7.1	7.7	I460V	7.9	8.7	

\* reacțiile au fost efectuate în condițiile screening-urilor inițiale

În mod așteptat, s-au obținut conversii scăzute cu *wt-PcPAL* în cazul substraturilor *para*-substituite (cu excepția conversiei moderate de 34,2% pentru *rac-2l* substituit cu *p*-brom), iar mutanții F137V și I460V au oferit o activitate mai mare. Pentru unele substraturi precum **1l** și **1i**, conversiile cu varianta F137V au fost mai mari (c = 61,2% pentru **1l** și c = 73,9% pentru **1i**) decât cele cu mutant I460V (c = 51,1% pentru **1l** și c = 20,4% pentru **1i**), dar enantioselectivitatea a fost mai mare pentru I460V (ee<sub>L-2i</sub> și ee<sub>L-2l</sub> de 99% când se utilizează I460V, ee<sub>L-2i</sub> = 97% și ee<sub>L-2l</sub> = 91,0% când se utilizează F137V) (**Tabelul 3.**).

**Tabel 3.** Conversia și valorile exceselor enantiomerice ale celor mai buni mutați *PcPAL* și *PcPAL* de tip sălbatic în reacțiile de adiție și eliminare a amoniacului pe substraturi *para*-substituite după 16 ore de reacție

Substituent <i>-para</i>		Grupare electron-atrăgător						Grupare electron-donor					
		-Br			-CF <sub>3</sub>			-CH <sub>3</sub>			-OCH <sub>3</sub>		
		E	c	ee	E	c	ee	E	c	ee	E	c	ee
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
Tip de reacție	Adiție de amoniac*	<b>1l</b>			<b>1i</b>			<b>1c</b>			<b>1f</b>		
		F137V	61.2	97	F137V	73.9	91.0	F137V	16.6	>99	I460V	11.8	>99
		I460V	51.1	>99	I460V	20.4	>99	I460V	16.2	>99	F137V	5.4	>99
		L138V	13.2	>99	F137A	16.6	>99	wt	6.0	>99	L138A	2.9	>99
	wt	7.6	>99	wt	5.7	>99	L134V	3.7	>99	wt	<1	-	
	Eliminare de amoniac*	<i>rac-2l</i>			<i>rac-2i</i>			<i>rac-2c</i>			<i>rac-2f</i>		
		I460V	49.8	>99	F137V	48.8	81.5	I460V	22.1	25.8	F137V	21	26.1
		F137V	45.0	95.9	I460V	36	51.7	F137V	10.7	23.8	I460V	16.8	19.1
wt		34.2	54.3	F137A	30.1	42.2	wt	3.0	3.1	I460A	12.0	15.1	
	L256V	7.9	8.6	wt	5.9	6.3	I460A	1.9	1.9	wt	<1	-	

\* reacțiile au fost efectuate în condițiile screening-urilor inițiale

### 3.2.3. Măsurători cinetice ale enzimelor

Mai mult, parametrii cinetici ai enzimei, cum ar fi constanta Michaelis ( $K_M$ ), activitatea moleculară (*turnover number*,  $k_{cat}$ ), constanta de specificitate ( $k_{cat}/K_M$ ) au fost determinați folosind ca substraturi model *o*-, *m*-, *p*-CF<sub>3</sub>-fenilalanine (*rac-2g*, *h*, *i*) *PcPAL* de tip sălbatic purificată și variantele cele mai performante ca biocatalizatori în cadrul reacțiilor de eliminare a amoniacului (Tabelul 4.).

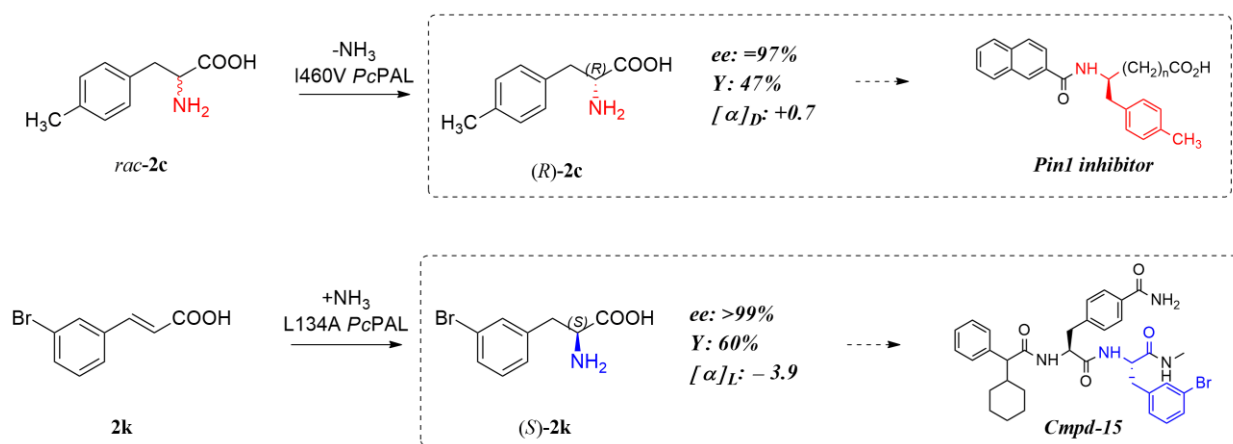
**Tabel 4.** Parametrii cinetici pentru reacțiile de eliminare a amoniacului *arac-2g,h,i*

<i>PcPAL</i>	<i>rac-2g (o-CF<sub>3</sub>)</i>			<i>rac-2h (m-CF<sub>3</sub>)</i>			<i>rac-2i (p-CF<sub>3</sub>)</i>		
	wt	L206V	L256V	wt	I460V	L134V	wt	F137V	I460V
$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	523	743	2733	533	163	912	2490	151	901
$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	0.042	0.041	0.148	0.057	0.200	0.203	0.25	0.42	0.55
$k_{cat}/K_M$ ( $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$ )	61.7	64.8	54.2	103.2	1227.0	222.8	100.4	2781.4	611.1

Conform clasificării bazate pe valoarea de conversie a variantelor mutante, obținute cu biocatalizatori PAL cu celule întregi, valorile  $k_{cat}$  obținute cu enzima purificată au fost, de asemenea, semnificativ mai mari pentru mutații cu cele mai bune performanțe decât cele pentru *wt*-PcPAL. Valorile  $K_M$  mai mari în cazul *o*- și *m*-CF<sub>3</sub>-fenilalaninelor (**rac-2g,h**), sugerează o afinitate mai mică și sunt în conformitate cu studiile anterioare<sup>18</sup>, unde a fost sugerată o dispunere mai relaxată a substratului în cadrul situsului catalitic pentru variantele mutante testate. Ca excepție, pentru *m*-CF<sub>3</sub>-fenilalanina (*rac*-**2h**) mutantul I460V prezintă activitate crescută, dar și afinitate, susținând interacțiunea propusă a substituenților electrono-atrăgători cu restul K456 (**Figura 13.**). Valorile  $k_{cat}/K_M$  au crescut în cazul celor mai performanți mutații pentru substraturile modelului în măsurătorile cinetice în comparație cu valorile  $k_{cat}/K_M$  pentru *wt*-PcPAL (**Tabelul 4.**), susținând creșterea eficienței catalitice observată și în biotransformarea cu celule întregi.

### 3.2.4. Aplicabilitatea sintetică a variantelor PcPAL proiectate.

Biotransformările la scară preparativă au fost efectuate pe scară de 500 mg. Analogii (*S*)-**2k** și (*R*)-**2c** de fenilalanină enantiopură au fost izolați utilizând cromatografie de schimb ionic cu randamente ridicate: 94% și 60%. Puritatea optică a produșilor a fost:  $ee_{(S)-2k} > 99\%$  și  $ee_{(R)-2c} = 97\%$  (**Figura 17.**).

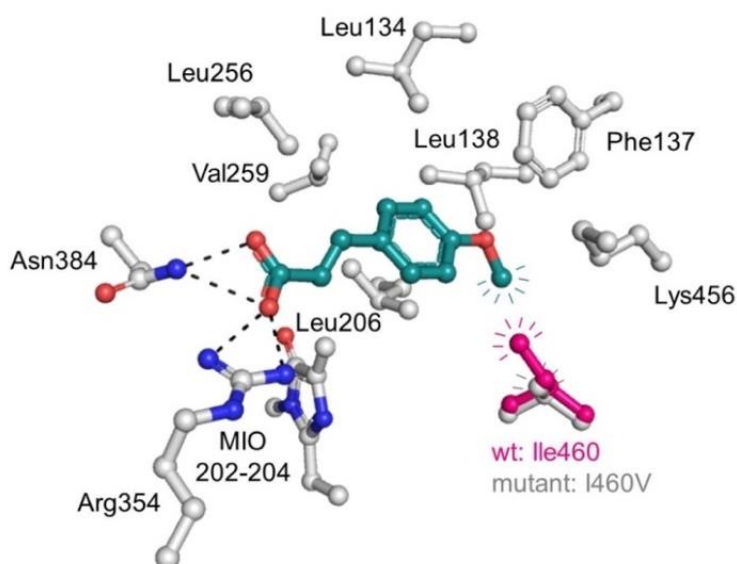


**Figura 17.** Biotransformările la scară preparativă pentru reacțiile de adiție a amoniacului la acidul *m*-bromo-cinamic **1k** folosind L134A PcPAL și pentru reacțiile de eliminare a amoniacului din *p*-metil-fenilalanina racemică *rac*-**2c** folosind I460V PcPAL

### 3.2.5. Studii de cristalizare

Studiile de cristalizare au fost, de asemenea, efectuate pentru a susține în continuare orientarea substituenților (*orto*-, *meta*-, *para*-) poziționați diferit pe inelul aril al substratului în partea hidrofobă a situsului activ al PcPAL (**Figura 13.**), oferită de analiza mutațională. Proba variantei purificate I460V PcPAL, acidul *p*-MeO cinamic, au fost preparate în cadrul Centrului de cercetare pentru biocataliză și biotransformare, în timp ce studiile de cristalizare au fost efectuate de grupul colaborator al prof. Christopher Schofield de la Universitatea din Oxford, Departamentul de Chimie, Laboratorul de Cercetare în Chimie. Structura cristalină rezultată arată mutantul I460V al PcPAL cu substratul acid *p*-metoxi cinamic **1f** în situsul activ (**Figura 18.**) și a fost depusă în cadrul Protein Data Bank (PDB ID: 6RGS).

Resturile situsurilor active ale structurii cristalografice sunt în conformitate cu modelul nostru obținut din analiza mutațională. Analizele modului de legare a substratului arată poziția *para* a inelului aromatic în imediata apropiere a restului substituit 460. O suprapunere cu structura raportată a *wt*-PcPAL<sup>19</sup> relevă o potențială ciocnire sterică cu lanțul lateral I460 (**Figura 18.**). Celelalte resturi din situsul activ hidrofob sunt în poziții foarte asemănătoare cu cele din modelul nostru (**Figura 18.**). O excepție este K456, care se află între resturile F137 și I460.



**Figura 18.** Structura cristalină a mutantului PcPAL I460V (PDB ID 6RGS) (lanțul I460 este magenta) suprapus cu *wt*-PcPAL (lanțul lateral I60 este gri), cu acidul *p*-metoxi-cinamic **1f** la situsul activ

### 3.2.6. Concluzii

S-a dezvăluit corelația dintre poziția (*orto*-, *meta*-, *para*-) substituentului inelului aril al substratului și resturile specifice ale situsului activ din regiunea de legare hidrofobă a enzimei PcPAL. Folosind inițial analogii sintetizați ai fenilalaninei și ai acidului cinamic, mono-substituiți în toate pozițiile (*orto*-, *meta*-, *para*-) ale inelului aromatic cu substituenți electrono-donori (-CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>) și electrono-atrăgători (-CF<sub>3</sub>, -Br), am monitorizat biotransformările mediate de PAL în ambele direcții de reacție, ale eliminării de amoniac și adăugării de amoniac. Clasamentele activității enzimei obținute din valorile de conversie ale biotransformărilor cu celule întregi au fost susținute în continuare de parametrii cinetici ( $K_M$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_M$ ) obținuți cu biocatalizatori enzimatici purificați. În conformitate cu modelul creat din strategia mutațională, analiza cristalografică a modului de legare a acidului *p*-metoxi cinamic, la locul activ al PcPAL I460V, susține orientarea propusă a grupării metoxi către restul 460V și oferă prima structură a unei enzime PAL active cu un analog de substrat substituit cu inel legat la situsul activ (PDB ID: 6RGS).

Pentru a demonstra aplicabilitatea sintetică a variantelor de PcPAL proiectate, producerea la scară preparativă a analogilor enantiopuri de fenilalanină cu valoare sintetică ridicată, cum ar fi (*S*)-*m*-bromo-fenilalanina (*S*)-**2k** și (*R*)-*p*-metil-fenilalanina (*R*)-**2c**, au fost obținute cu randamente mari.

În consecință, am demonstrat că abordarea noastră de design rațional a PAL din *Petroselinum crispum* este extrem de eficientă în furnizarea variantelor PAL cu eficiență catalitică semnificativ crescută pentru producerea de analogi de fenilalanină valoroși sintetic.

### 3.3. Dezvoltarea testului de activitate high-throughput a enzimei PAL aplicabil pentru ingineria proteică bazată pe evoluție direcționată

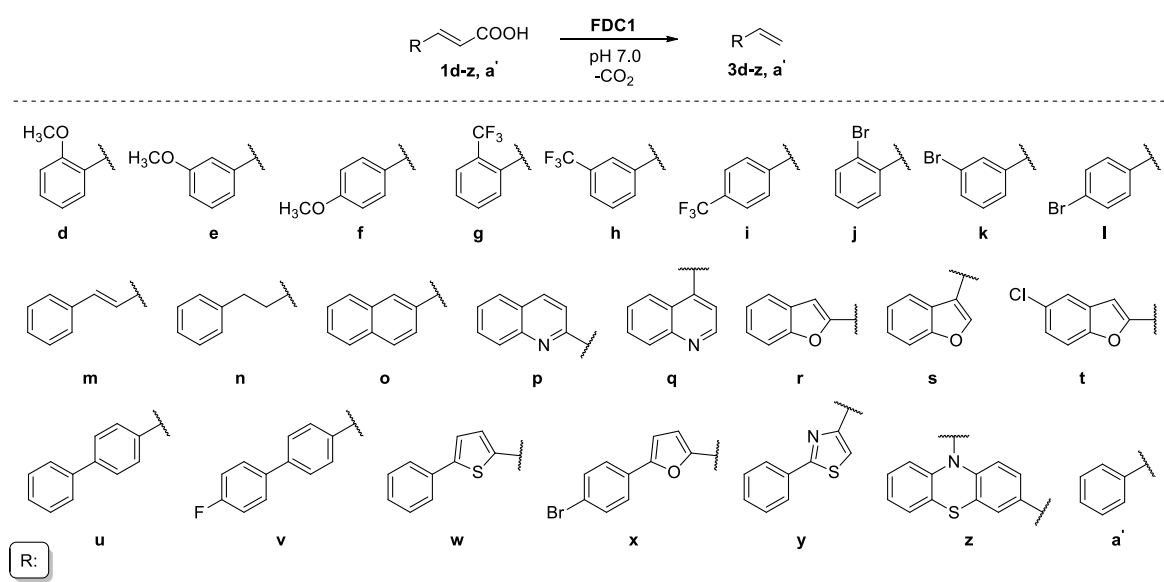
Ingineria proteică prin evoluție direcționată este cea mai eficientă procedură pentru extinderea domeniului de aplicare al substratului enzimelor și / sau pentru a crește activitatea lor catalitică<sup>20,21,22</sup>. Cu toate acestea, sunt generate biblioteci mutante de dimensiuni mari (> 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> clone), din care trebuie efectuată selecția corectă a variantelor cu proprietăți îmbunătățite prin teste de activitate high-throughput. În timp ce au fost dezvoltate teste de activitate high-throughput pentru PAL<sup>16</sup>, aplicabilitatea lor general este încă limitată.

În scopul nostru de a dezvolta o analiză cu enzimă cuplată pentru măsurarea activității PAL folosind decarboxilaza acidului ferulic (FDC1) ca enzimă cuplată, mai întâi a fost

crucial să investigăm compatibilitatea dintre domeniul substratului enzimei FDC1 și cel al enzimei PAL.

### 3.3.1. Explorarea și extinderea domeniului substratului decarboxilazei acidului ferulic pentru asigurarea compatibilității cu domeniul substratului enzimei PAL

Pentru a explora domeniul substratului ScFDC1, mai întâi activitatea de decarboxilare a enzimei a fost testată folosind o bibliotecă de substrat de dimensiuni mari (**Figura 19.**), conținând derivați ai acidului cinamic, care pot fi produși prin eliminarea amoniacului catalizată de PAL a analogilor fenilalaninei corespunzători. Rezultatele au arătat că FDC1 a transformat eficient o mare varietate de analogi ai acidului cinamic (**Tabelul 5.**).



**Figura 19.** Reacția de decarboxilare catalizată de FDC1 a analogilor acidului cinamic **1d-z, a'**

**Tabel 5.** Biotransformări ale 1d-a' cu celule întregi ScFDC1: A) conversii de la screeningul inițial, după 24 ore timp de reacție B) conversii maxime obținute în condiții optimizate: tampon fosfat de sodiu 100 mM pH 7,0, OD<sub>600</sub> de ~ 1, 35°C.

Substrat		A	B	
		c* (%)	t (h)	c* (%)
Acid ( <i>E</i> )-3-(2-methoxyfenil)acrilic	<b>1d</b>	82	48	92 <sup>[a]</sup>
Acid ( <i>E</i> )-3-(3-methoxyfenil)acrilic	<b>1e</b>	92	48	>99
Acid ( <i>E</i> )-3-(4-methoxyfenil)acrilic	<b>1f</b>	86	72	>99
Acid ( <i>E</i> )-3-(2-(trifluorometil)fenil)acrilic	<b>1g</b>	42	72	62 <sup>[a]</sup>
Acid ( <i>E</i> )-3-(3-(trifluorometil)fenil)acrilic	<b>1h</b>	80	48	87 <sup>[a]</sup>
Acid ( <i>E</i> )-3-(4-(trifluorometil)fenil)acrilic	<b>1i</b>	69	48	82 <sup>[a]</sup>
Acid ( <i>E</i> )-3-(2-bromofenil)acrilic	<b>1j</b>	80	48	83 <sup>[a]</sup>
Acid ( <i>E</i> )-3-(3-bromofenil)acrilic	<b>1k</b>	>99	8	>99
Acid ( <i>E</i> )-3-(4-bromofenil)acrilic	<b>1l</b>	>99	24	>99
Acid (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-5-fenilpenta-2,4-dienoic	<b>1m</b>	95	48	>99
Acid ( <i>E</i> )-5-fenilpent-2-enoic	<b>1n</b>	<1	72	<1
Acid ( <i>E</i> )-3-(naftalen-2-il)acrilic	<b>1o</b>	96	48	>99
Acid ( <i>E</i> )-3-(chinolin-2-il)acrilic	<b>1p</b>	31	8	39 <sup>[b]</sup>
Acid ( <i>E</i> )-3-(chinolin-4-il)acrilic	<b>1q</b>	33	8	28 <sup>[b]</sup>
Acid ( <i>E</i> )-3-(benzofuran-2-il)acrilic	<b>1r</b>	>99	8	>99
Acid ( <i>E</i> )-3-(benzofuran-3-il)acrilic	<b>1s</b>	75	30	79 <sup>[a]</sup>
Acid ( <i>E</i> )-3-(5-clorobenzofuran-2-il)acrilic	<b>1t</b>	93	8	>99
Acid ( <i>E</i> )-3-([1,1'-bifenil]-4-il)acrilic	<b>1u</b>	26	30	59 <sup>[a]</sup>
Acid ( <i>E</i> )-3-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)acrilic	<b>1v</b>	48	48	70 <sup>[a]</sup>
Acid ( <i>E</i> )-3-(5-feniltiofen-2-il)acrilic	<b>1w</b>	82	72	85 <sup>[a]</sup>
Acid ( <i>E</i> )-3-(5-(4-bromofenil)furan-2-il)acrilic	<b>1x</b>	<1	72	<1
Acid ( <i>E</i> )-3-(2-feniltiazol-4-il)acrilic	<b>1y</b>	<1	72	<1
Acid ( <i>E</i> )-3-(10-metil-10H-phenothiazin-2-il)acrilic	<b>1z</b>	<1	72	<1
Acid cinamic	<b>1a'</b>	75	24	>99

[a]-conversie completă atinsă după 24 de ore suplimentare cu un lot de celule proaspete; [b]-nicio creștere a conversiei după un timp de reacție suplimentar de 24 de ore cu un lot de celule proaspete;

\*Determinată prin monitorizarea HPLC a epuizării substratului.

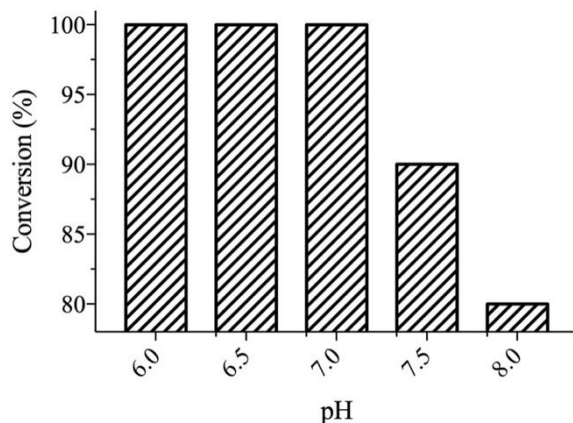
### 3.3.1.1. Optimizarea condițiilor de reacție ale biotransformărilor mediate de FDC1

După screening-urile inițiale s-a realizat optimizarea biotransformărilor cu celule întregi ScFDC1. Optimizarea a constat în următoarele: efectul pH-ului, temperaturii și al raportului biocatalizator/substrat asupra valorilor de conversie ale biotransformărilor cu celule întregi, utilizând ca model substrat acidul (*E*)-3-(3-(trifluorometil)fenil) acrilic (**1h**).

#### *Efectul pH-ului asupra biotransformărilor*

Influența pH-ului (6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0) asupra reacției de decarboxilare catalizată de FDC1 a fost testată cu acid 3-(3-(trifluorometil)fenil) acrilic (**1h**) folosind tampon fosfat de

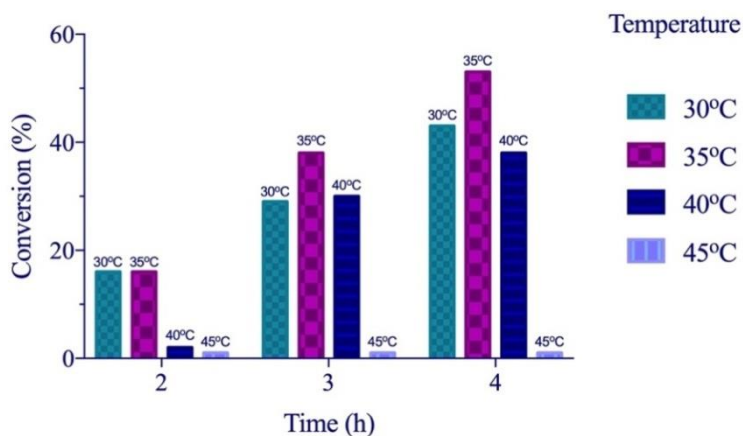
sodiu 100 mM la pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0. Cele mai mari valori de conversie au fost obținute la valori de pH de 6,0-7,0 (Figura 20.), în conformitate cu pH-ul optim raportat pentru enzima FDC1 purificată<sup>23</sup>.



**Figura 20.** Efectul pH-ului asupra decarboxilării catalizată de FDC1 după 1h

#### *Efectul temperaturii asupra biotransformărilor*

Influența temperaturii (30, 35, 40, 45°C) asupra reacției de decarboxilare catalizată de FDC1 a fost testată cu acid 3-(3-(trifluorometil)fenil) acrilic (**1h**). Cele mai mari valori de conversie au fost obținute la 35°C (**Figura 21.**).



**Figura 21.** Efectul temperaturii asupra decarboxilării catalizată de FDC1 după 1h

#### *Efectul cantității de celule asupra biotransformărilor*

Mai mult, efectul raportului biocatalizator/substrat asupra valorilor de conversie a fost testat cu acid 3-(3-(trifluorometil)fenil) acrilic (**1h**) utilizând cantități diferite de biocatalizatori cu celule întregi (OD<sub>600</sub> de 1, 2 sau 3).

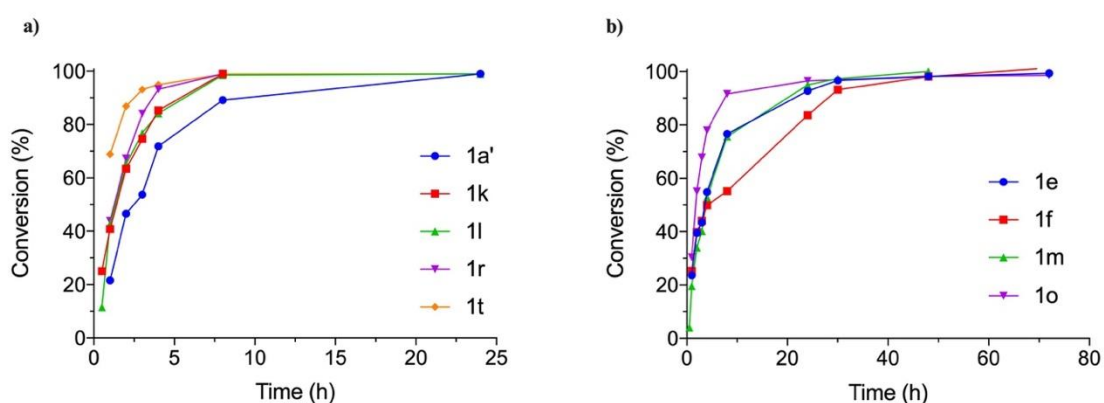


Crescând cantitatea de biocatalizator cu celule întregi, s-a realizat o conversie mai mare după același timp de reacție. Utilizarea densității celulare  $OD_{600}=1$  asigură o conversie de 42%, în timp ce utilizarea densităților celulare mai mari de 2 și 3 oferă conversie de 76% și, respectiv, conversie completă, care au fost înregistrate după 4 ore de reacție. Pentru a evita timpuri de reacție prea scurte, care ar perturba precizia monitorizării timpului de reacției, în următoarele experimente, compararea activității ScFDC1 cu diferite substraturi a fost efectuată la densități celulare moderate ( $OD_{600}\leq 2$ ).

### *Profilul de conversie în timp a biotransformărilor mediate de FDC1 efectuate cu procedura optimizată*

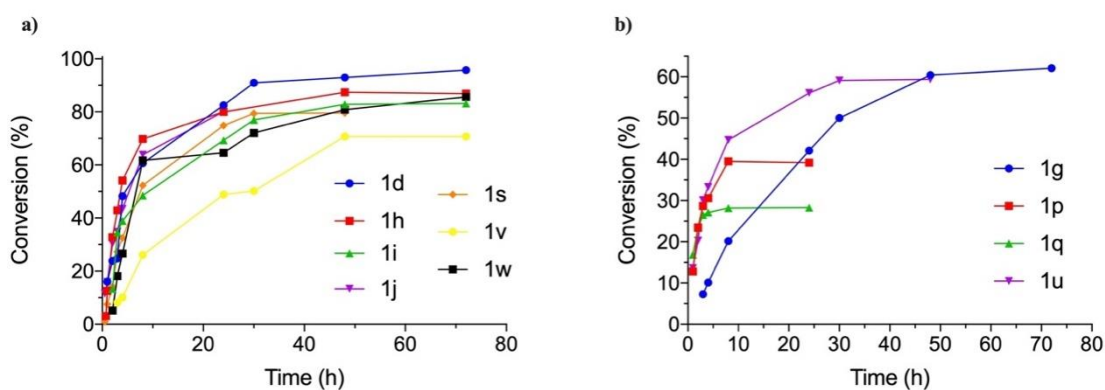
În cele din urmă, pentru a realiza profiluri de conversie în timp, reacțiile enzimatic catalizate de ScFDC1 au fost efectuate în condițiile optime de reacție (tampon fosfat de sodiu 100 mM pH 7,0,  $OD_{600}$  de ~ 1, 35°C) pentru întregul panou de substrat (**1d-a'**) și valorile de conversie au fost monitorizate pe o perioadă mai lungă de timp (**Figura 22a, b.; Figura 23a, b.**), iar probele au fost prelevate după 1, 2, 3, 4, 8, 24, 30, 48 și 72 de ore.

Reacțiile de decarboxilare folosind condițiile de reacție optimizate ale FDC1 cu celule întregi au atins conversii complete în cazul substraturilor **1a'**, **k**, **l**, **r**, **t** într-un timp de reacție relativ scurt (<24h, **Figura 22a., Tabelul 5B.**). Pentru substraturile **1e,f**, **m**, **o** conversiile s-au finalizat într-un timp de reacție mai lung (<72h, **Figura 22b., Tabelul 5B.**).



**Figura22.** Profilurile de conversie în timp pentru reacțiile de decarboxilare catalizate de ScFDC1 folosind celule întregi și condițiile de reacție optimizate: a) substraturi **1a'**, **k**, **l**, **r**, **t** cu conversii complete în timp de reacție relativ scurt (sub 24 h), b) substraturi **1e**, **f**, **m**, **o** cu conversii complete în timp de reacție mai lung (24-72 h)

Substraturile **1d, h, i, j, s, v, w** au atins conversii mari, dar incomplete după 72 h (**Figura 23a., Tabelul 5B.**), iar pentru substraturile **1g, p, q, u** s-au înregistrat conversii moderate sau scăzute după 72 de ore (**Figura 23b., Tabelul 5B.**). Folosind substraturile **1n, x, y, z** nu s-au detectat conversii (**Tabelul 5B.**).



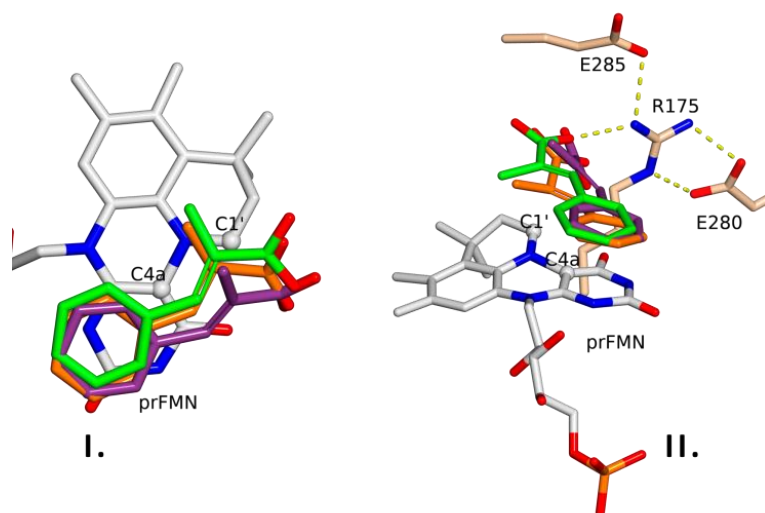
**Figura 23.** Profiluri de conversie în timp pentru reacțiile de decarboxilare catalizate de ScFDC1 folosind celule întregi și condițiile de reacție optimizate: a) substraturi **1d, h, I, j, s, v, w** cu conversii mari, dar incomplete și; b) substraturi **1g, p, q, u** cu conversii moderate sau reduse până la 72 h timp de reacție.

### 3.3.1.2. Studii computaționale

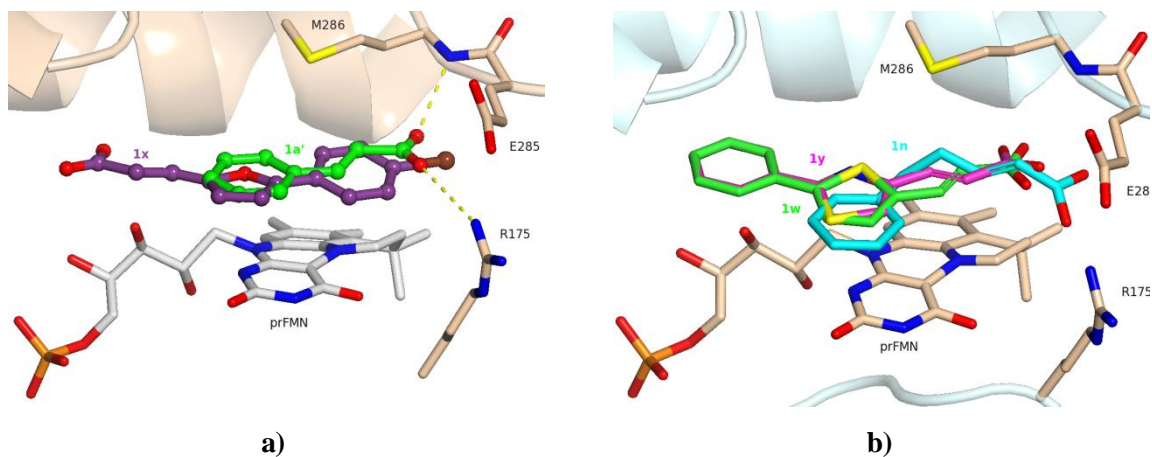
Valorile de conversie/viteza de reacție sunt influențate de mai mulți factori legați de substrat, cum ar fi efectele inductive ale substituenților, prezența conjugării extinse, orientarea substratului asociată cu prFMN și orientarea în cadrul sitului catalitic, ultimele fiind influențate atât de dimensiunea, cât și de planitatea substratului (**Figura 24.**).

Astfel am efectuat studii de calcul pentru a determina orientarea substratului în și de-a lungul sitului activ al FDC1 pentru a explica diferențele în valorile de conversie ale substraturilor **1d-z, a'**.

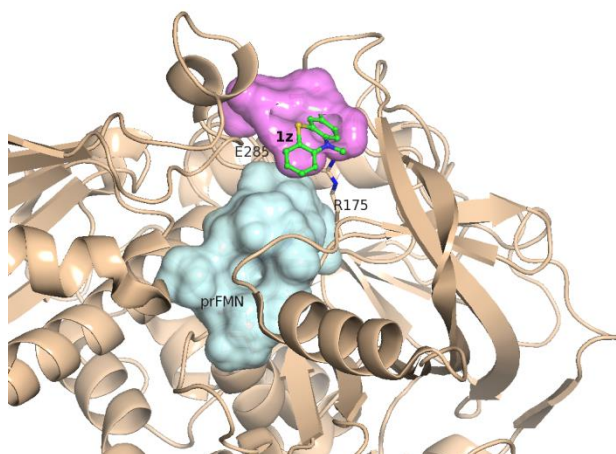
Studiile computaționale arată că, în cazul acidului 5-(4-bromofenil)furan-2-il) acrilic **1x**, s-a observat o orientare a substratului favorizată energetic, inactivă, legată de prFMN și de resturile cheie ale enzimei (R175, E280, E285) și probabil lungimea substratului depășește, de asemenea, limitele situsului catalitic pentru poziția de legare activă (**Figura 25a.**). Volumul sitului activ este, de asemenea, o problemă în cazul substratului **1z**, unde poziția favorizată din punct de vedere energetic a substratului nu permite acomodarea substratului în centrul catalitic, în schimb se observă o altă poziție de legare a substratului superficială în apropierea sitului catalitic (**Figura 26.**).



**Figura 24.** Compararea conformațiilor ligandului ( $\alpha$ -metil *trans*-cinamat) preluate din structura cristalină 4ZA7 (violet) cu poziția de andocare cu cea mai mică energie (verde) și cu geometria raportată a stării de tranziție (portocaliu) a cicloadiției 1,3-dipolare. **I.** - vedere de sus - alinierea legăturii duble față de cofactorul prFMN în conformația de andocare este în acord cu geometria stării de tranziție obținută prin studiul QM / MM; **II.** - vedere frontală - orientarea substratului legată de prFMN și resturile cheie R175, E280 și E285



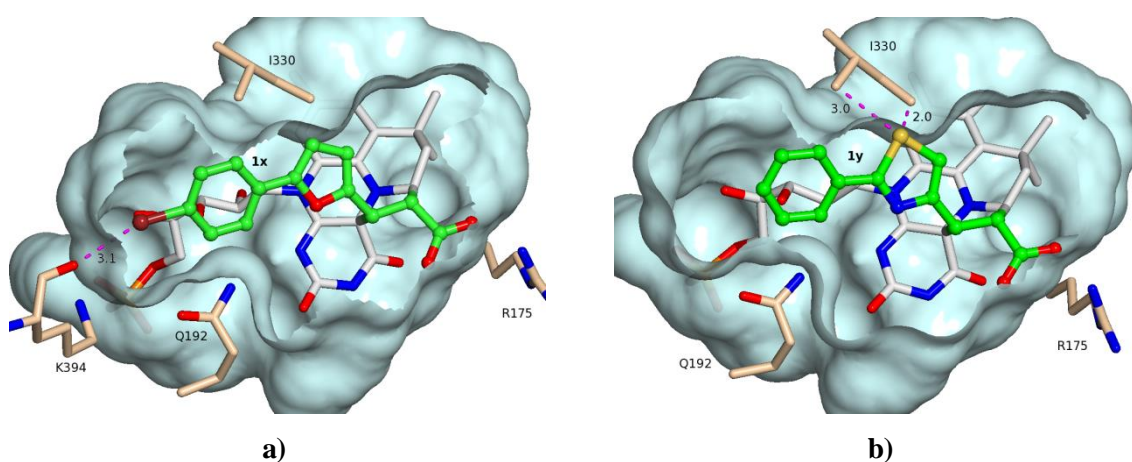
**Figura 25. a)** Orientarea favorizată energetic, inactivă a **1x** (violet) comparativ cu orientarea activă a **1a'** (verde); **b)** Poziția inactivă a **1y** (magenta) și **1n** (albastru) în cadrul sitului catalitic al FDC1, cu dubla legătură situată într-un aranjament față de prFMN, ceea ce este nefavorabil pentru 1,3-cicloadiție în comparație cu orientarea productivă a **1w** (verde) voluminos



**Figura 26.** Poziția favorizată energetic a substratului **1z** pe suprafața cavității (de culoare roz) situat deasupra buzunarului de legare (de culoare albastră) a enzimei FDC1

În cazul acidului (2-feniltiazol-4-il) acrilic **1y** poziția dublei legături  $\alpha,\beta$  a fost nefavorabilă pentru atomii C1' și C4a ai cofactorului prFMN. În cazul substratului acid 5-fenilpent-2-enoic **1n** pentru care nu s-a detectat nici o conversie (**Tabelul 5.**), absența sistemului  $\pi$  și dispunerea nefavorabilă a dublei legături acrilice conduc la dispunerea moleculară plană care nu permite formarea 1,3-cicloadiției (**Figura 25b.**).

Pentru a extinde studiile de calcul și pentru a demonstra că putem prezice, sau chiar mai mult, pentru a îmbunătăți situl activ enzimatic pentru substraturile în care nu au fost detectate conversii, s-au investigat intermediarii substrat-cofactor (prFMN) care rezultă după 1,3-cicloadiție și au fost calculați în fază gazoasă (**Figura 27.**).



**Figura 27. a)** Conformația la bază a substratului **1x** în cicلودuct este împiedicată de apropierea atomului de brom și a carbonilului restului K394; **b)** Ciocnirile sterice între atomul de sulf al intermediarului covalent, format din **1y** și prFMN și restul I330 sunt evidențiate prin linii punctate violete

**Tabel 6.** Valorile conversiilor cu ScFDC1 de tip sălbatic și mutații ScFDC1 pentru substraturile **1a',x,y,z** după 24h

Substrat	wt-ScFDC1	ScFDC1 mutant		
		I330A	I330V	Q192N
	Conversie (%)			
Acid cinamic (1a')	>99	>99	>99	92
Acid (E)-3-(5-(4-bromofenil)furan-2-il)acrilic (1x)	<1	<1	<1	<1
Acid (E)-3-(2-feniltiazol-4-il)acrilic (1y)	<1	15	5	0
Acid (E)-3-(10-metil-10H-fenotiazin-2-il)acrilic (1z)	<1	<1	<1	<1

Resturile de aminoacizi I330 și Q192 au fost înlocuite cu resturi mai mici Ala (A), Val (V) folosind mutagenză situs direcționată și variantele mutante obținute au fost testate în reacția de decarboxilare a substraturilor voluminoase care prezintă repulsie sterică cu cavitatea delimitată de resturile I330 și Q192 (**Tabelul 6.**). În conformitate cu rezultatele de calcul I330A și I330V au îmbunătățit eficiența catalitică în cazul substratului **1y**, în timp ce activitatea scăzută a variantei Q192N susține că restul Q192 este implicat în legarea cofactorului prFMN.

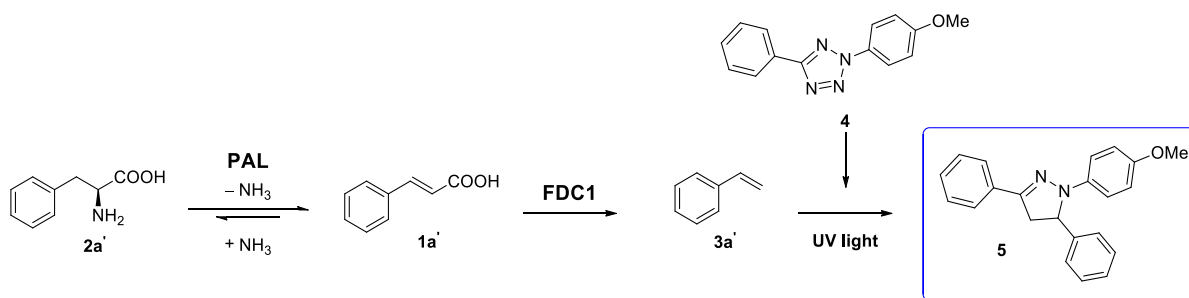
### 3.3.1.3. Concluzii

Domeniul substratului ScFDC1 a fost explorat folosind analogi ai acidului cinamic fenil, heteroaril voluminos sau biaril substituiți în mod diferit (*orto*, *meta*-, *para*-), produși ai biotransformării mediate de PAL de tip sălbatic sau de proiectare. Rezultatele demonstrează că FDC1 are un domeniu larg de substrat cu suprapunere semnificativă cu domeniul substratului PcPAL permițând aplicarea cascadei enzimatică PAL-FDC1 pentru diferiți analogi ai substratului. Andocarea moleculară a fost efectuată pentru a marca corelațiile dintre valorile de conversie și natura substraturilor. Pe baza studiilor computaționale, au fost identificate obstacole sterice pentru acomodarea substratului în cadrul sitului catalitic al ScFDC1, iar studiile mutaționale au oferit variante ScFDC1 cu domeniu extins al substratului.

### 3.3.2. Configurarea și validarea testului de activitate high-throughput fluorescent al enzimei cuplate

#### 3.3.2.1. Configurarea reacției fluorogene

În primul rând, ne-am concentrat asupra selectării mediului de reacție pentru reacțiile combinate PAL-, FDC1- și 1,3-cicloadiție dintre fluoroproba de tetrazol și stiren (**Figura 28.**).

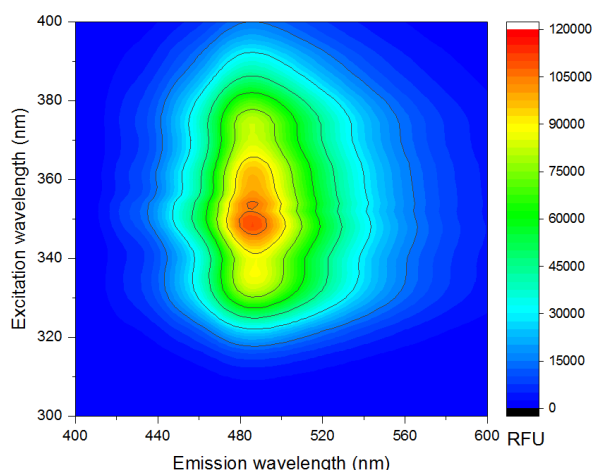


**Figura 28.** Testul fluorescent cuPAL și FDC1 cuplate

În consecință, solvenții organici miscibili cu apă (acetonitril, metanol) și/sau solvenții care sunt capabili să extragă stirenul din mediul apos (*n*-hexan) au fost încercați în reacția de decarboxilare a acidului cinamic **1a'** mediată de FDC1. Cele mai bune intensități ale semnalului de fluorescență și raportul semnal: zgomot au fost observate când s-a utilizat *n*-hexan pentru extracția stirenului.

Apoi efectul concentrațiilor de stiren **3a'** și tetrazol **4** asupra activării semnalului de fluorescență pentru produsul **5** au fost determinate folosind scanări 3D de excitație-emisie (**Figura 29.**). Folosind aceeași concentrație pentru ambii parteneri de reacție (stiren **3a'** și fluoroprobă de tetrazol **4**) semnalul de fluorescență a fost cel mai mare.

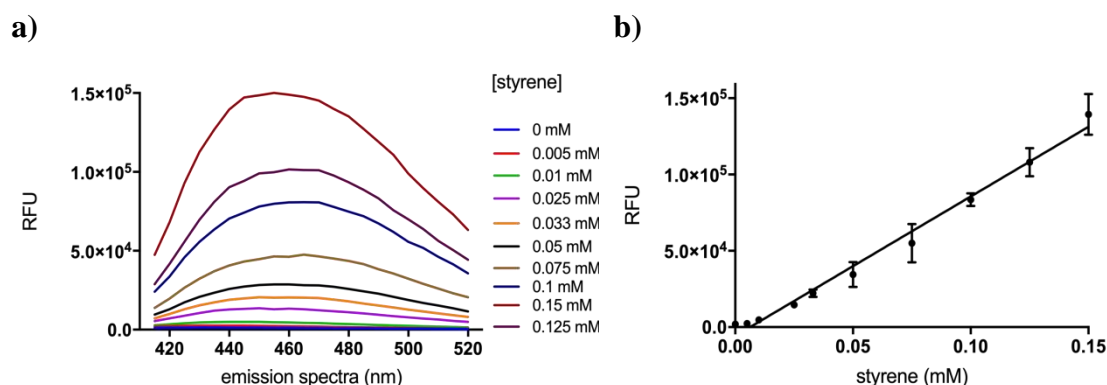
Mai mult, a fost necesară investigarea limitei de detecție pentru determinarea activităților PAL. Prin urmare, s-au efectuat curbe de calibrare (**Figura 30.**).



Entry	[3] (mM)	[4] (mM)	$\lambda_{ex}^{max}$ (nm)	$\lambda_{em}^{max}$ (nm)	FI (fold) <sup>[a]</sup>
1	1	1	355	480	402
2	0.5	0.5	350	490	432
3	0.2	0.13	362	480	38
4	0.2	0.025	362	460	13

<sup>a]</sup>FI=creșterea fluorescenței - determinată din raportul intensităților semnalului la  $\lambda_{em}^{max}$  al probei și controlul negativ al acestuia, constând din 4 iradiat cu UV (la concentrațiile corespunzătoare), fără prezența partenerului său de reacție 3.

**Figura 29.** Efectul diferitelor concentrații de stiren **3a'** și fluoroprobă **4**. Maximele corespunzătoare de excitație și emisie determinate de scanările 3D de excitație-emisie



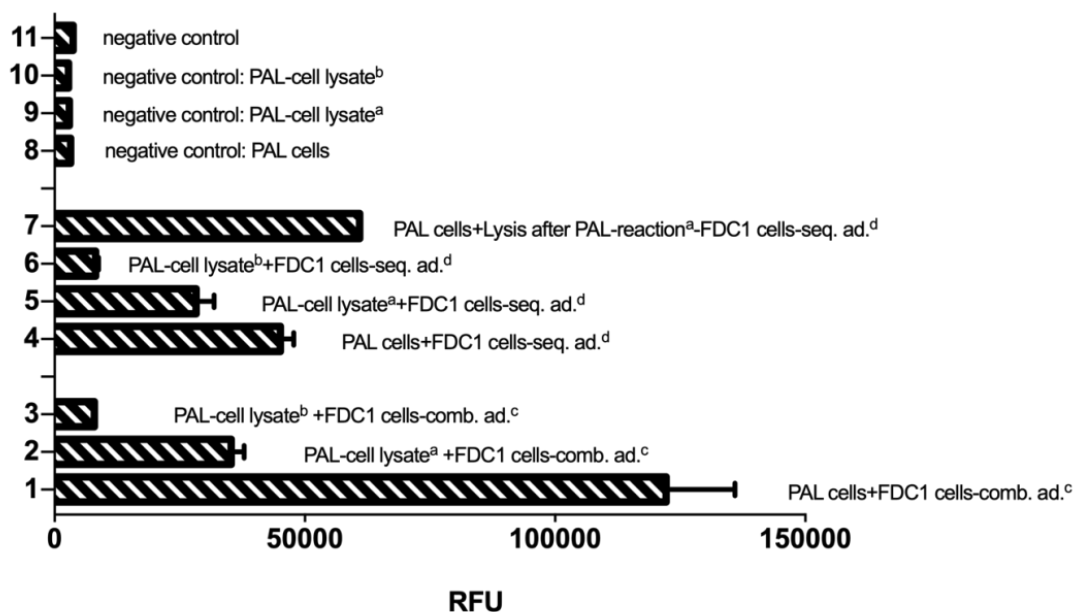
**Figura 30. a) și b)** limita de detecție (definită ca medie a controalelor negative plus de trei ori deviația standard a controalelor negative) a 25  $\mu$ M stiren a fost obținută sub un răspuns linear până la 1 mM stiren utilizând 0,5 mM de probă fluorogenă **4**

### 3.3.2.2. Cuplarea reacțiilor PAL-, FDC1- și fluorogene

În continuare am testat cuplarea etapelor de reacție PAL-, FDC1- și fluorogenă. Aplicabilitatea analizei activității PAL la nivelul celulei întregi sau a lizatele celulare, potrivite pentru analiza activității bibliotecilor de clone obținute din experimente de evoluție direcționată. Amestecuri de celule întregi induse de *E. coli* care adăpostesc genele *pcpal*<sup>24</sup> și *scfdc1*<sup>25</sup> recombinate au fost testate drept catalizatori pentru eliminarea amoniacului din L-Phe și decarboxilarea ulterioară a acidului cinamic. Pentru a exclude problemele de penetrare celulară a substraturilor sau produșilor, pe lângă biocatalizatorii celulari întregi, au fost de asemenea testate lizatele celulare ale celulelor întregi PAL- și FDC1 induse.

Cele mai mari intensități ale semnalului s-au obținut atunci când am folosit sistemul de reacție combinat (s-au adăugat celule întregi PAL- și FDC1 în același timp, **Figura 31.**).

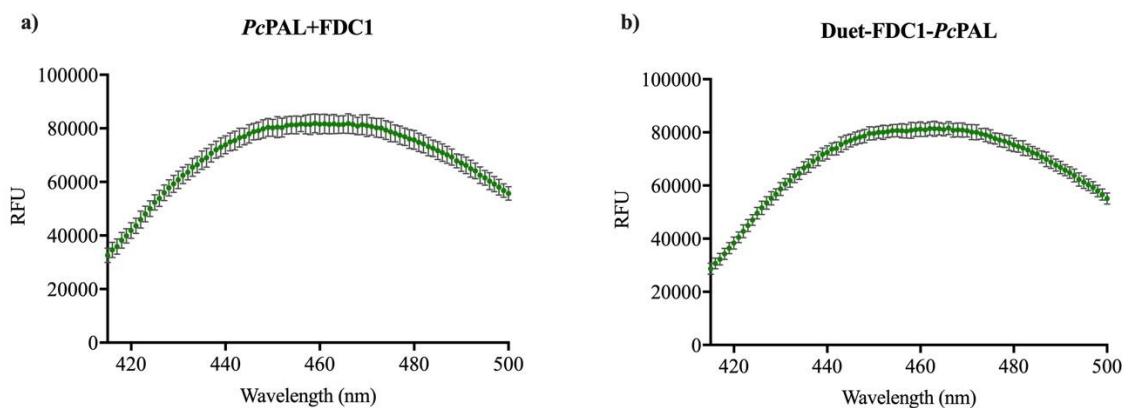
Mai mult, utilizarea lizatelor celulare nu a crescut intensitatea semnalului, ceea ce sugerează că nu apar probleme de penetrare a celulelor.



<sup>a</sup> liza cu sulfat de polymyxin B; <sup>b</sup> liza cu Triton X-100; <sup>c</sup>adăugarea combinată a biocatalizatorilor PAL- și FDC1 în amestecul de reacție; <sup>d</sup>adăugarea secvențială a celulelor întregi FDC1 (după 12 ore de reacție cu biocatalizator PAL) în amestecul de testare.

**Figura 31.** Intensitatea semnalului fluorescent pentru reacțiile PAL-, FDC1- cuplate diferit

Mai mult, genele care codifică *PcPAL* și *ScFDC1* au fost sub-clonate în vectorul pCDFDuet-1, pentru coexprimarea lor, oferind un biocatalizator de celule întregi PAL-FDC1 combinat pentru a exclude ca utilizarea a două sisteme separate de celule întregi pentru PAL și FDC1 să împiedice eficiența testării activității. Cele două sisteme au fost comparate și au oferit rezultate similare (**Figura 32a, b.**).



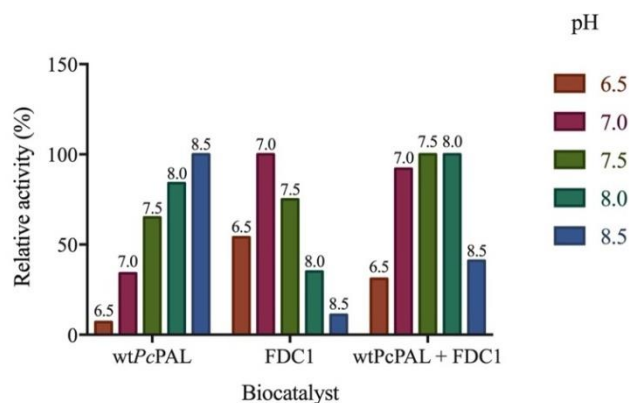
**Figura32.** a) sistem *PcPAL* și FDC1 separat b) sistem combinat *PcPAL*-FDC1



### 3.3.2.3. Optimizări de testare

#### *Efectul pH-ului în biotransformări*

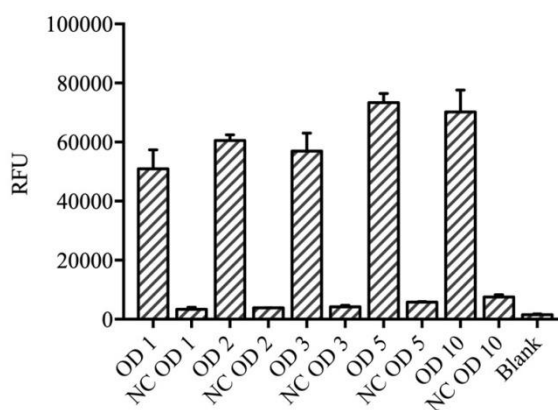
Am testat efectul pH-ului asupra intensităților semnalului de fluorescență pentru reacțiile combinate PAL-FDC1, deoarece pH-ul optim pentru decarboxilarea mediată de FDC1 este la 6,5-7,0, iar pentru reacțiile de eliminare a amoniacului catalizate de PAL este la 8,0-8,5. Cele mai mari intensități ale semnalului au fost obținute la pH 7,5-8,0 (**Figura 33.**).



**Figura33.** Determinarea pH-ului optim al biotransformărilor cu celule întregi PAL-, FDC1-cuplate în comparație cu pH-ul optim al enzimei izolate PcPAL de tip sălbatic și a biotransformărilor cu celule întregi FDC1

#### *Efectul cantității de celule asupra biotransformărilor*

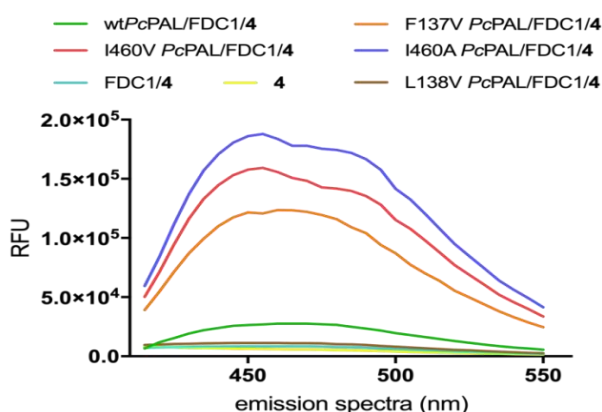
La un pH optim de 8,0, a fost studiat efectul densității celulare a biocatalizatorilor asupra intensităților semnalului de fluorescență pentru reacțiile combinate PAL-FDC1 (**Figura 34.**).



**Figura 34.** Efectul diferitelor densități celulare ale FDC1 ( $OD_{600} \sim 1,2,3,5,10$ ) asupra intensităților semnalului de fluorescență utilizând concentrații constante de celule PcPAL de  $OD_{600} \sim 1$  în testul activității fluorescente al PAL-FDC1 combinate. Controalele negative au fost efectuate fără celule întregi PcPAL

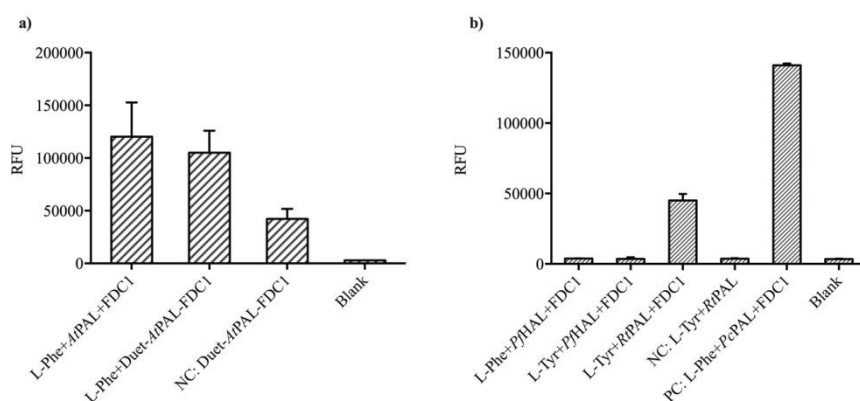
### 3.3.2.4. Validarea metodei

Pentru a explora aplicabilitatea testului, am analizat procedura utilizând fenilalanina amoniac-liaza cu diferite activități cunoscute față de substraturi nenaturale. Mutanții *PcPAL* cu activitate ridicată s-au dezvoltat prin proiectare rațională în cadrul acestui studiu (descrie la capitolul 3.2.), iar enzima de tip sălbatic a fost testată folosind ca substrat model *p*-metoxifenilalanina. În primul studiu, cele mai mari activități PAL au fost obținute pentru mutanții *PcPAL* I460V, I460A și F137V. În testul de fluorescență, intensitățile cele mai mari au fost înregistrate în cazul aceluiași mutanți (**Figura 35.**)



**Figura 35.** Intensitatea semnalului de fluorescență utilizând diferiți mutanți *PcPAL* *p*-MeO-Phe ca substrat

Pentru a susține în continuare aplicabilitatea generală a procedurii, testul a fost realizat folosind celule întregi care adăpostesc gene ale diferitelor amoniac-liaze: PAL din *Arabidopsis thaliana* (*AtPAL*) (**Figura 36a.**), Tirozina amoniac-liză (TAL), PAL din *Rhodotorula sp.*<sup>26</sup>, histidina amoniac-liaza (HAL) din *Pseudomonas fluorescens*<sup>27</sup> cunoscută ca inactivă față de L-tirozină, a furnizat semnale la nivelul controalelor negative (**Figura 36b.**)



**Figura 36.** a) Test fluorescent cu PAL din *Arabidopsis thaliana* (*AtPAL*) b) Test fluorescent cu PAL din *Rhodotorula toruloides* (*RtPAL*) pentru detectarea activității TAL

### 3.3.2.5. Concluzii

În acest studiu s-a dezvoltat o nouă analiză fluorescentă high-throughput cu enzimă cuplată, pentru determinarea activităților PAL folosind enzima FDC1 cu o gamă largă de substrat. Testul dezvoltat a fost optimizat și validat cu succes folosind diferiți mutați ai *PcPAL*. Aplicabilitatea generală a testului a fost, de asemenea, demonstrată folosind diferite tipuri de amoniac-liaze, cum ar fi *PcPAL* din *Petroselinum crispum*, *AtPAL* din *Arabidopsis thaliana* și *RtPAL* din *Rhodotorula toruloides*. Această analiză a activității high-throughput permite testarea bibliotecilor mutante de dimensiuni mari generate de evoluția direcționată și deschide calea către ingineria proteinelor PAL.

#### 4. Concluzii generale

Scopul principal al studiului a fost de a dezvolta biocatalizatori PAL proiectați, care sunt utili pentru sinteza mai multor analogi valoroși de fenilalanină non-naturali.

Pe baza informațiilor structurale existente ale PAL-urilor, în primul rând s-a dezvoltat cartografierea situsului activ al PcPAL prin analiza mutațională, care a relevat o corelație între resturile sitului de legare a substratului hidrofob al enzimei PcPAL și poziția (*orto*-, *meta*-, *para*-) substituentului inelului aril al substratului.

Deoarece pentru evoluția direcționată a enzimelor PAL sunt necesare teste de activitate high-throughput, în teză ne-am concentrat și asupra dezvoltării unei analize fluorescente cu enzimă cuplată, aplicabilă screening-urilor de activitate PAL la nivelul întregii celule. Testul dezvoltat implică decarboxilarea enzimatică a acidului trans-cinamic (produsul reacției PAL) prin decarboxilaza acidului ferulic (FDC1) urmată de o reacție fotochimică a stirenului produs. Prin urmare, inițial, a fost necesar să se exploreze domeniul substratului decarboxilazei acidului ferulic pentru a asigura compatibilitatea acestuia cu domeniul substratului PAL-urilor. Rezultatele obținute demonstrează că FDC1 are un domeniu larg de substrat cu suprapunere semnificativă cu domeniul substratului PcPAL, susținând astfel organizarea cu succes a unei cascade de enzime PAL-FDC1 pentru diferiți analogi de substrat.

După mai multe etape de optimizare, testul de activitate high-throughput fluorescent cu enzime cuplate a fost configurat și validat cu succes pe bibliotecile mutante PcPAL, precum și pe PAL-uri cu origini diferite. Astfel, testul dezvoltat al activității high-throughput oferă screening-uri de activități ușoare pentru bibliotecile mutante de dimensiuni mari generate de evoluția direcționată și deschide calea către ingineria eficientă a proteinelor din fenilalanină amoniac liazele.

## 5. Mulțumiri

Lucrarea experimentală a fost efectuată în laboratoarele Centrului de Cercetare de Enzimologie și Biocataliză Aplicată, Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică a Universității Babeș-Bolyai.

Aș dori mai întâi să-mi exprim recunoștința față de conducătorul meu științific, prof. Habil. Dr. Ing. Paizs Csaba pentru tot ajutorul, răbdarea, sfaturile sale, pentru că m-a supravegheat în timpul activității mele de cercetare.

Mulțumiri speciale Lect. Dr. László Csaba Bencze, care a creat oportunitatea de a învăța și dezvolta metode noi și moderne în laboratorul nostru. Multe mulțumiri, de asemenea, pentru sprijinul financiar. Am avut norocul să întâlnesc un profesor serios, muncitor, dedicat, dar cel mai important, sincer, modest, discret și cu inimă caldă.

Mulțumirea mea sinceră pentru seniorii centrului de cercetare: Prof. Habil. Dr. Ing. Monica Ioana Toșa, Prof. Dr. Ing. Florin Dan Irimie, Lect. Dr. Csaba Levente Nagy, Lect. Dr. Róbert Tóth, Lect. Dr. Ing. Mădălina Elena Moisă, Assoc. Prof. Gabriel Katona și Lect. Dr. Paula Veronica Podea, pentru ajutorul lor pe parcursul studiilor și cercetării mele.

Totodată, aș dori să le mulțumesc colegilor mei pentru ajutor și prietenie: Assist. Prof. Ing. Souad-Diana Tork, Dr. Hajnal Vári-Bartha, Assist. Prof. Dr. Andrea Varga, Assist. Prof. Dr. Alina Filip, Assist. Prof. Dr. Melinda Emese László, Dr. Gergely Bánóczy, Cristian Andrei Gál, Eng. Adrian-Ioan Dudu, Monica Jipa, Ing. Mihai Andrei Lăcătuș, Ing. Cristina Spelmezan, Ing. Ioan Bodea, Ibolya Varga.

Lucrarea din cadrul acestei teze a fost susținută de Fundația Națională Științifică Elvețiană (SNSF), prin proiectul PROMYS, grant nr. IZ11Z0\_166543 intitulat „MIO-enzyme toolkit for the synthesis of unnatural amino acids” condus de către dr. László Csaba Bencze.

Nu în ultimul rând, aș dori să mulțumesc familiei mele pentru ajutorul, iubirea și încurajarea de care am avut parte.

## 6. Lista publicațiilor

Prezenta teză se bazează pe următoarele publicații.

### Publicații științifice

I. Moisă, M. E.; Amariei, D. A.; Nagy, E. Z. A.; Szarvas, N.; Toșa, M. I.; Paizs, C.; Bencze, L. C. Fluorescent enzyme-coupled activity assay for fenilalanine ammonia-lyases, *Scientific Reports*, **2020**, *10*:18418 (impact factor: 3.998)

II. Nagy, E. Z. A.; Tork, S. D.; Lang, P. A.; Filip, A.; Irimie, F. D.; Poppe, L.; Toșa, M. I.; Schofield, C. J.; Brem, J.; Paizs, C.; Bencze, L. C. Cartografierea the Hydrophobic Substrate Binding Site of Fenilalanine Ammonia-Lyase from *Petroselinum crispum*, *ACS Catal.*, **2019**, *9*, 8825–8834 (impact factor: 12.35)

III. Nagy, E. Z. A.; Nagy, C. L.; Filip, A.; Nagy, K.; Gál, E.; Tótos, R.; Poppe, L.; Paizs, C.; Bencze, L. C. Exploring the substrate scope of ferulic acid decarboxilase (FDC1) from *Saccharomyces cerevisiae*, *Scientific Reports*, **2019**, *9*:647 (impact factor: 3.998)

Alte publicații au rezultat în timpul studiilor mele de doctorat cu subiecte complementare:

IV. Tork, S. D.; Nagy, E. Z. A.; Cserepes, L.; Bordea, D. M.; Nagy, B.; Toșa, M. I.; Paizs, C.; Bencze, L. C. The production of L- and D-fenilalanines using engineered fenilalanine ammonia lyases from *Petroselinum crispum*, *Scientific Reports*, **2019**, *9*:20123 (impact factor: 3.998)

V. Filip, A.; Nagy, E. Z. A.; Tork, S. D.; Bánóczi, G.; Toșa, M. I.; Irimie, F. D.; Poppe, L.; Paizs, C.; Bencze, L. C. Tailored Mutants of Fenilalanine Ammonia-Lyase from *Petroselinum crispum* for the Synthesis of Bulky L- and D-Arilalanines, *ChemCatChem*, **2018**, *10*, 2627-2633 (impact factor: 4.853)

## 7. Referințe

- <sup>1</sup> Wang, B.; Liu, Y.; Zhang, D.; Feng, Y.; Li, J. Efficient kinetic resolution of amino acids catalyzed by lipase AS 'Amano' via cleavage of an amide bond, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2012**, 23, 1338–1342.
- <sup>2</sup> Ahmed, S. T.; Parmeggiani, F.; Weise, N. J.; Flitsch, S. L.; Turner, N. J. Chemoenzymatic synthesis of optically pure L- and D-biarilalanines through biocatalytic asymmetric amination and palladium-catalyzed arylation, *ACS Catal.*, **2015**, 5, 5410-5413.
- <sup>3</sup> Gong, X.; Su, E.; Wang, P.; Wei, D. *Alcaligenes faecalis* penicillin G acilase-catalyzed enantioselective acylation of DL-phenylalanine and derivatives in aqueous medium, *Tetrahedron Letters*, **2011**, 52, 5398–5402.
- <sup>4</sup> Zhang, N.; Liu, L.; Shan, G.; Cai, Q.; Lei, X.; Hong, B.; Wu, L.; Xie, Y.; Chen, R. Precursor-directed biosynthesis of new sansanmycin analogs bearing *para*-substituted-phenylalanines with high yields, *The Journal of Antibiotics*, **2016**, 1–4.
- <sup>5</sup> Parmeggiani, F.; Weise, N. J.; Ahmed, S. T.; Turner, N. J. Synthetic and Therapeutic Applications of Ammonia-Lyases and Aminomutases, *Chem. Rev.*, **2018**, 118, 73–118.
- <sup>6</sup> Camm, E. L.; Neil Towers, G. H. Phenylalanine ammonia lyase, *Phytochemistry*, **1972**, 12 (5): 961–973.
- <sup>7</sup> Bartsch, S.; Bornscheuer, U. T. Mutational analysis of phenylalanine ammonia lyase to improve reactions rates for various substrates, *Protein Eng.*, **2010**, 23 (12), 929–933.
- <sup>8</sup> Filip, A.; Nagy, E. Z. A.; Tork, S. D.; Bánóczy, G.; Toşa, M. I.; Irimie, F. D.; Poppe, L.; Paizs, C.; 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.
- <sup>9</sup> Zhou, Y.; Wu, S.; Li, Z. Cascade Biocatalysis for Sustainable Asymmetric Synthesis: From Biobased L-Phenylalanine to High-Value Chiral Chemicals, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55, 1-5.
- <sup>10</sup> Wang, Y.; Song, W.; Hu, W. J.; Lin, Q. Fast Alkene Functionalization In Vivo by Photoclick Chemistry: HOMO Lifting of Nitrile Imine Dipoles, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 5330-5333.
- <sup>11</sup> Parmeggiani, F.; Lovelock, S. L.; Weise, N. J.; Ahmed, S. T.; Turner, N. J. Synthesis of D- and L-phenylalanine derivatives by phenylalanine ammonia lyases: a multienzymatic cascade process, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54, 4608-4611.
- <sup>12</sup> Claypool, J. T.; Raman, D. R.; Jarboe, L. R.; Nielsen, D. R. Technoeconomic evaluation of bio-based styrene production by engineered *Escherichia coli*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **2014**.
- <sup>13</sup> McKenna, R.; Nielsen, D. R. Styrene biosynthesis from glucose by engineered, *E. coli*. *Metab. Eng.*, **2011**, 13, 544–554.
- <sup>14</sup> Peng, A.; Qing, L. Sterically shielded tetrazoles for fluorogenic photoclick reaction: Tuning cycloaddition rate and product fluorescence, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, 00, 1-3.
- <sup>15</sup> Zhi, L. Y.; Sarada, S. R.; Farid, J. G.; Yin, N. T. Rapid and sensitive detection of acrylic acid using a novel fluorescence assay, *RSC Adv.*, **2014**, 4, 60216-60220.
- <sup>16</sup> Wang, Y.; Song, W.; Hu, W. J.; Lin, Q. Fast Alkene Functionalization In Vivo by Photoclick Chemistry: HOMO Lifting of Nitrile Imine Dipoles, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 5330-5333.

- 
- <sup>17</sup> Ferguson, K. L.; Arunrattanamook, N.; Marsh, E. N. G. Mechanism of the novel prenylated flavin-containing enzyme ferulic acid decarboxylase probed by isotope effects and linear free-energy relationships, *Biochemistry*, **2016**, *55*, 2857–2863.
- <sup>18</sup> Wang, Y. S.; Fang, X.; Chen, H. Y.; Wu, B.; Wang, Z. U.; Hilty, C.; Liu, W. R. Genetic Incorporation of Twelve meta-Substituted Phenylalanine Derivatives Using a Single P-tryptophyl-tRNA Synthetase Mutant, *ACS Chem. Biol.*, **2013**, *8*, 405–415.
- <sup>19</sup> Rowles, I.; Groenendaal, B.; Binay, B.; Malone, K. J.; Willies, S. C.; Turner, N. J. Engineering of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula graminis* for the enhanced synthesis of unnatural L-amino acids, *Tetrahedron*, **2016**, *72*, 7343-7347.
- <sup>20</sup> Wakiec, R.; Gabriel, I.; Prasad, R.; Becker, J. M.; Payne, J. W.; Milewski, S. Enhanced Susceptibility to Antifungal Oligopeptides in Yeast Strains Overexpressing ABC Multidrug Efflux Pumps, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, *52*, 4057–4063.
- <sup>21</sup> Schroeder, A. C.; Kumaran S.; Hicks, L. M.; Cahoon, R. E.; Halls, C.; Yu, O.; Jez, J. M. Contributions of conserved serine and tyrosine residues to catalysis, ligand binding, and cofactor processing in the active site of tyrosine ammonia lyase, *Phytochemistry*, **2008**, *69*, 1496-1506.
- <sup>22</sup> Rowles, I.; Groenendaal, B.; Binay, B.; Malone, K. J.; Willies, S. C.; Turner, N. J. Engineering of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula graminis* for the enhanced synthesis of unnatural L-amino acids, *Tetrahedron*, **2016**, *72*, 7343-7347.
- <sup>23</sup> Yan, C.; Parmeggiani, F.; Jones, E. A.; Claude, E.; Hussain, S. A.; Turner, N. J.; Flitsch, S. L.; Barran, P. E. Real-time screening of biocatalysts in live bacterial colonies, *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*, 1408-1411.
- <sup>24</sup> Paizs, C.; Toşa, M. I.; Bencze, L. C.; Brem, J.; Irimie, F. D.; Rétey, J. 2-amino-3-(5-phenylfuran-2-yl)propionic acids and 5-phenylfuran-2-ylacrylic acids are novel substrates of phenylalanine ammonia-lyase, *Heterocycles*, **2010**, *82*, 1217-1228.
- <sup>25</sup> Ahmed, S. T.; Parmeggiani, F.; Weise, N. J.; Flitsch, S. L.; Turner, N. J. Engineered ammonia lyases for the production of challenging electron-rich L-phenylalanines, *ACS Catal.*, **2018**, *8*, 3129-3132.
- <sup>26</sup> Dreßen, A.; Hilberath, T.; Mackfeld, U.; Billmeier, A.; Rudat, J.; Pohl, M. Phenylalanine ammonia lyase from *Arabidopsis thaliana* (AtPAL2): A potent MIO-enzyme for the synthesis of non-canonical aromatic alpha-amino acids: Part I: Comparative characterization to the enzymes from *Petroselinum crispum* (PcPAL1) and *Rhodospiridium toruloides* (RtPAL), *J. Biotechnol.*, **2017**, *258*, 148-157.
- <sup>27</sup> Csuka, P.; Juhász, V.; Kohári, S.; Filip, A.; Varga, A.; Sátorhelyi, P.; Bencze, L. C.; Barton, H.; Paizs, C.; Poppe, L. *Pseudomonas fluorescens* Strain R124 Encodes Three Different MIO Enzymes, *ChemBioChem*, **2018**, *19*, 411-418.