



Universitatea Babeș-Bolyai  
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică

## Teză de doctorat

# INGINERIA PROTEICĂ A FENILALANINĂ AMONIAC-LIAZELOR PENTRU SINTEZA ANALOGILOR NENATURALI AI L-FENILALANINEI

**Candidat:** Raluca Bianca TOMOIAGĂ

**Coordonator:** Prof. Habil Dr. Monica-Ioana TOȘA

Cluj-Napoca

2024



Universitatea Babeș-Bolyai  
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică

# INGINERIA PROTEICĂ A FENILALANINĂ AMONIAC-LIAZELOR PENTRU SINTEZA ANALOGILOR NENATURALI AI L-FENILALANINEI

**Candidat:** Raluca Bianca TOMOIAGĂ

**Coordonator:**

**Prof. Habil Dr. Monica Ioana TOȘA** – Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, România

**Președinte:**

**Prof. Habil Dr. Csaba PAIZS** – Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, România

**Referenți:**

**Prof. Em. Dr. Florin-Dan IRIMIE** – Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, România

**Prof. Dr. László POPPE** – Universitatea de Tehnologie și Economie, Budapesta, Ungaria

**Conf. Dr. Lígia O. MARTINS** – Universitatea NOVA, Lisabona, Portugalia

Cluj-Napoca

2024

# CUPRINS

<b>LISTA DE ABREVIERI</b> .....	<b>4</b>
<b>LISTA DE PUBLICAȚII</b> .....	<b>6</b>
<b>MULȚUMIRI</b> .....	<b>7</b>
<b>OBIECTIVE</b> .....	<b>8</b>
<b>1. INTRODUCERE</b> .....	<b>10</b>
1.1. AMONIAC LIAZES (ALS).....	11
1.2. AMINOACIZI AROMATICI NENATURALI .....	15
1.3. FENILALANINĂ AMONIAC-LIAZE .....	17
1.3.1. <i>Origini și rol natural</i> .....	18
1.3.2. <i>Arhitectură moleculară și proprietăți funcționale ale PAL-urilor</i> .....	19
1.3.2.1. Situs catalitic și mecanismul reacției .....	20
1.3.3. <i>Aplicații ale PAL-urilor</i> .....	25
1.3.3.1. Domeniul de substrat și ingineria proteică ale PAL-urilor pentru producerea derivaților nenaturali ai fenilalaninei .....	26
<b>INDEXUL SUBSTRATURILOR UTILIZATE ÎN CADRUL CAPITOLELOR</b> .....	<b>30</b>
<b>2. METODE DE SCANARE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ PENTRU SCANAREA COLECȚIILOR DE FENILALANINĂ AMONIAC-LIAZELOR OBȚINUTE PRIN MUTAGENEZĂ DE SATURAȚIE</b> .....	<b>31</b>
2.1. CONTEXTUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI .....	31
2.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII .....	32
2.2.1. <i>Metoda de scanare în fază lichidă pentru activitatea fenilalanină amoniac-liazelor</i> .....	34
2.2.1.1. Evaluarea și optimizarea condițiilor de liză celulară pentru scanarea eficientă al activității PAL .....	34
2.2.1.2. Validarea testului UV pentru scanarea de mare viteză a activității PAL .....	36
2.2.2. <i>Test de activitate a fenilalanină amoniac-liazei cuplată cu LAAO în fază solidă</i> .....	37
2.2.2.1. Exprimarea /purificarea AncLAAO-N1 .....	37
2.2.2.2. Domeniul de substrat al AncLAAO_N1 .....	40
2.2.2.3. Implementarea și validarea metodei de scanare .....	44
2.3. CONCLUZII .....	48
<b>3. INGINERIA PROTEICĂ A FENILALANINEI AMONIAC-LIAZELOR PENTRU ACTIVITATE ÎMBUNĂȚĂȚITĂ PENTRU SUBSTRATURI DIFICILE</b> .....	<b>50</b>
3.1. CONTEXTUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI .....	50
3.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII .....	51
3.2.1. <i>Proiectarea rațională pentru substraturi dificile</i> .....	52
3.2.2. <i>Mutageneza de saturație</i> .....	53
3.2.2.1. Metodologia mutagenezei de saturație situs-direcționată .....	53
3.2.2.2. Mutageneza de saturație pentru substraturi dificile .....	56
3.2.3. <i>Combinarea ingineriei proteice cu diversitatea naturală</i> .....	60
3.2.3.1. Transferul mutațiilor benefice din PcPAL la alte PALuri .....	61
3.2.3.2. Identificarea de noi amoniac-liaze aromatice cu activitate față de substraturi dificile ...	64
3.2.3.3. Cinetica enzimatică a celor mai performanți mutanți PAL .....	65
3.3. CONCLUZII .....	70
<b>4. DESCOPERIREA POTENȚIALULUI BIOCATALITIC AL AMONIAC-LIAZEI AROMATICE DIN LOKTANELLA ATRILUTEA: IDENTIFICAREA OMOLOGILOR ȘI ANALIZA RELAȚIILOR ANCESTRALE.....</b>	<b>71</b>
4.1. CONTEXTUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI .....	71
4.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII .....	72
4.2.1. <i>Scanări inițiale ale activității de amoniac-liază</i> .....	72
4.2.2. <i>Efectul pH-ului asupra reacției de eliminare a amoniacului catalizată de LaAAL</i> .....	73
4.2.3. <i>Efectul sursei de amoniac</i> .....	74

4.2.4.	<i>Efectul temperaturii asupra LaAAL</i> .....	76
4.2.5.	<i>Domeniul de substrat al LaAAL în reacția de adiție a amoniacului</i> .....	78
4.2.6.	<i>Clasificarea LaAAL</i> .....	84
4.3.	<b>CONCLUZII</b> .....	88
<b>5.</b>	<b>MATERIALE, INSTRUMENTAȚIE ȘI METODE</b> .....	<b>90</b>
5.1.	<b>MATERIALE</b> .....	90
5.2.	<b>INSTRUMENTAȚIE</b> .....	90
5.3.	<b>METODE GENERALE</b> .....	91
5.3.1.	<i>Transformarea în celule competente</i> .....	91
5.3.2.	<i>Purificarea enzimelor prin cromatografie de afinitate Ni-NTA</i> .....	91
5.3.3.	<i>Cromatografie de exclusiune sterică</i> .....	92
5.3.4.	<i>Metode HPLC pentru determinarea excesului enantiomeric (ee%)</i> .....	93
5.3.5.	<i>Metode HPLC pentru monitorizarea conversiilor</i> .....	94
5.4.	<b>PARTEA EXPERIMENTALĂ PART PENTRU CAPITOLUL 2</b> .....	94
5.4.1.	<i>Clonare moleculară</i> .....	94
5.4.2.	<i>Exprimare și purificarea AncLAAO</i> .....	95
5.4.3.	<i>Profilele de denaturare termică</i> .....	96
5.4.4.	<i>Cinetică enzimatică</i> .....	96
5.4.5.	<i>Studii computaționale</i> .....	97
5.4.6.	<i>Optimizarea metodei de scanare în fază lichidă</i> .....	97
5.4.7.	<i>Metoda de scanare în fază solidă</i> .....	98
5.4.8.	<i>Analiza HPLC pentru determinarea conversiilor</i> .....	99
5.5.	<b>PARTEA EXPERIMENTALĂ PENTRU CAPITOLUL 3</b> .....	100
5.5.1.	<i>Mutageneză de saturație</i> .....	100
5.5.1.1.	<i>Procedura de mutageneză de saturație discutată în Capitolul 3 Secțiunea 3.2.2.1.</i> ....	100
5.5.1.2.	<i>Mutageneza de saturație pentru substraturile dificile discutată în Capitolul 3 Secțiunea 3.2.2.2.</i> .....	101
5.5.2.	<i>Scanarea activității colecțiilor mutante</i> .....	104
5.5.3.	<i>Exprimarea și purificare</i> .....	105
5.5.4.	<i>Cinetica enzimatică</i> .....	106
5.5.5.	<i>Studii computaționale</i> .....	106
5.5.6.	<i>Analiza HPLC pentru determinarea conversiei și a excesului enantiomeric</i> .....	106
5.6.	<b>PARTEA EXPERIMENTALĂ PENTRU CAPITOLUL 4</b> .....	107
5.6.1.	<i>Determinarea activității HAL/PAL/TAL a LaAAL</i> .....	107
5.6.2.	<i>pH-ul optimal reacțiilor catalizate de LaAAL</i> .....	107
5.6.3.	<i>Stabilitatea termică a LaAAL</i> .....	107
5.6.4.	<i>Efectul temperaturii reacția de eliminare a amoniacului din <b>2ad</b></i> .....	108
5.6.5.	<i>Reacțiile de adiție a amoniacului – determinarea conversiilor</i> .....	108
5.6.6.	<i>Măsurători cinetice</i> .....	109
5.6.7.	<i>Studii computaționale</i> .....	110
5.6.8.	<i>Analiza filogenetică</i> .....	110
	<b>CONCLUZII GENERALE</b> .....	<b>111</b>
	<b>BIBLIOGRAFIE</b> .....	<b>114</b>
	<b>ANEXE</b> .....	<b>140</b>
I.	<b>GENE ȘI ENZIME</b> .....	140
II.	<b>BILOGIE MOLECULARĂ</b> .....	144
III.	<b>CROMATOGRAME REPREZENTATIVE PENTRU DETERMINAREA CONVERSIILOR</b> .....	145
IV.	<b>CINETICĂ ENZIMATICĂ</b> .....	155
V.	<b>ALINIERE MULTIPLĂ DE SECVENȚE</b> .....	161
	<b>ARTICOLE ORIGINALE</b> .....	<b>165</b>

**Cuvinte cheie:** biocataliză, fenilalanină amoniac-liaza, fenilalanină, aminoacizi nenaturali, inginerie proteică, proiectare rațională, mutageneză de saturație, metodă de scanare de înaltă performanță, L-aminoacid oxidază

## **OBIECTIVE**

Obiectivul principal al tezei l-a reprezentat dezvoltarea unor biocatalizatori pentru sinteza derivaților de fenilalanină di-substituită, sintetic valoroși, concentrându-se pe îmbunătățirea potențialului catalitic al fenilalanină amoniac-liazilor (PAL-uri) prin aplicarea diferitelor tehnici de inginerie proteică, inclusiv proiectarea rațională și mutageneză de saturație semi-rațională, cu perspective suplimentare obținute prin metode scanare în baza de date a secvențelor omoloage. Teza descrie un set de obiective împărțite în trei capitole distincte, fiecare îndeplinind un aspect diferit al scopului general:

### **OBIECTIV 1: Dezvoltarea de metode de înaltă performanță pentru scanarea colecțiilor de fenilalanină amoniac-liaze obținute prin mutageneză de saturație**

S-a avut în vedere dezvoltarea unei metode de scanare în fază solidă, de înaltă performanță, destinată scanării pe baza reacției de adiție a amoniacului, a colecțiilor de fenilalanină amoniac-liaze (PAL-uri) modificate prin inginerie proteică, respectiv o metodă de scanare în fază lichidă, vizând reacția de eliminare a amoniacului. Scanarea în fază solidă a implicat cuplarea bibliotecii PAL cu L-aminoacid oxidaza ancestrală (AncLAAO-N1), profitând de producerea de apă oxigenată rezultată în timpul regenerării cofactorului FAD, esențial pentru reacția catalizată de LAAO. Sistemul a inclus și o peroxidază, care în urma reacției cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generate permite oxidarea unui substrat organic, producând o modificare de culoare ce marchează colonia conținând mutantul PAL activ. Pentru implementare, a fost vizată evaluarea compatibilității între domeniul de substrat al enzimei PAL și L-aminoacid oxidazei ancestrală AncLAAO-N1. În ceea ce privește scanarea în fază lichidă, s-au utilizat extracte celulare ca sursă enzimatică, fiind esențială optimizarea diferitelor condiții de reacție și liză celulară înainte de validare.

### **OBIECTIVUL 2: Ingineria proteică a fenilalanină amoniac-liazelor pentru activitate îmbunătățită asupra substraturilor dificile**

În acest caz, a fost vizată identificarea mutantilor de fenilalanină amoniac-liază activi față de acidul 3,4-dimetoxi *trans*-cinamic și acidul 3-bromo 4-metoxi *trans*-cinamic pentru obține aminoacizii valoroși din punct de vedere sintetic, 3,4-dimetoxi L-fenilalanină și 3-bromo 4-metoxi L-fenilalanină. Mutanții PAL au fost dezvoltați urmărind ca primă abordare proiectarea rațională, respectivă într-o a doua instanță scanarea unor colecții de mutanți PAL obținute prin mutageneză

de saturație, realizată în runde iterative la resturi de aminoacizi cheie din situl catalitic al fenilalanină amoniac-liazei din *Petroselinum crispum*.

### OBIECTIVUL 3: Dezvăluirea potențialului biocatalitic al amoniac-liazei aromatice provenite din *Loktanella atrilutea*

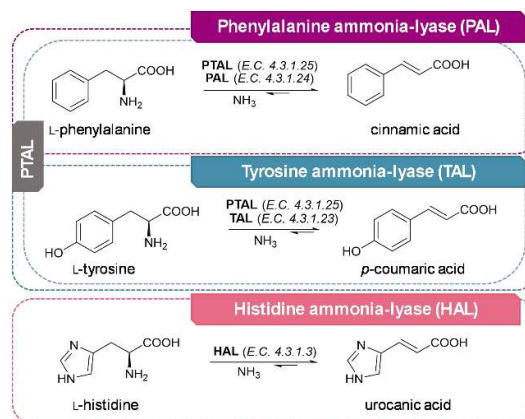
S-a vizat caracterizarea domeniului de substrat și a potențialului biocatalitic al amoniac-liazei aromatice provenite din *Loktanella atrilutea*, care prezintă o activitate neobișnuită față de acidul 3,4-dimetoxi *trans*-cinamic. Scopul principal al acestei etape a constat în caracterizarea acestei subclase distincte de amoniac-liaze aromatice, prin identificarea de omologi ai *LaAAL*, investigând relațiile lor evolutive, respectiv comparând profilul de substrat al *LaAAL* cu cel al fenilalanină amoniac-liazelor, tirozină amoniac-liazelor și histidină amoniac-liazelor cunoscute.

## CAPITOL 1

### 1. INTRODUCERE

Biocataliza se remarcă drept una dintre principalele metodologii care respectă Principiile Chimiei Verzi<sup>1</sup>, utilizând enzime drept catalizatori pentru a crea procese chimice ecologice și durabile, în special în industriile alimentară și farmaceutică. Progresele în descoperirea și ingineria enzimelor au extins utilizarea biocatalizei spre sinteza unor molecule complexe, inclusiv a ingredientelor farmaceutice active (API-uri).<sup>2</sup> Amoniact-liazele, în special fenilalanină amoniact-liazele, s-au evidențiat prin versatilitatea lor în producerea de aminoacizi enantiopuri naturali și nenaturali, jucând un rol crucial în dezvoltarea unor noi rute sintetice pentru diverși compuși farmaceutici.

Amoniact-liazele aromatice (AAL-uri) utilizează un heterociclu extrem de electofilic pentru a-și transforma substraturile, reprezentat de gruparea prostetică 3,5-dihidro-5-metiliden-4H-imidazol-4-onă (MIO) format post-translațional.<sup>3</sup> Din această categorie fac parte, **histidină amoniact-liaza**<sup>4</sup> (EC 4.3.1.3, HAL) **tirozină amoniact-liaza**<sup>5</sup> (EC 4.3.1.23, TAL), **fenilalanină amoniact-liaza**<sup>6</sup> (EC 4.3.1.24, PAL) și **fenilalanină amoniact-liaze cu activitate dublă PAL/TAL**<sup>7</sup> (EC 4.3.1.25, PTAL), catalizând eliminarea reversibilă a amoniacului din aminoacidul aromatic corespunzător,

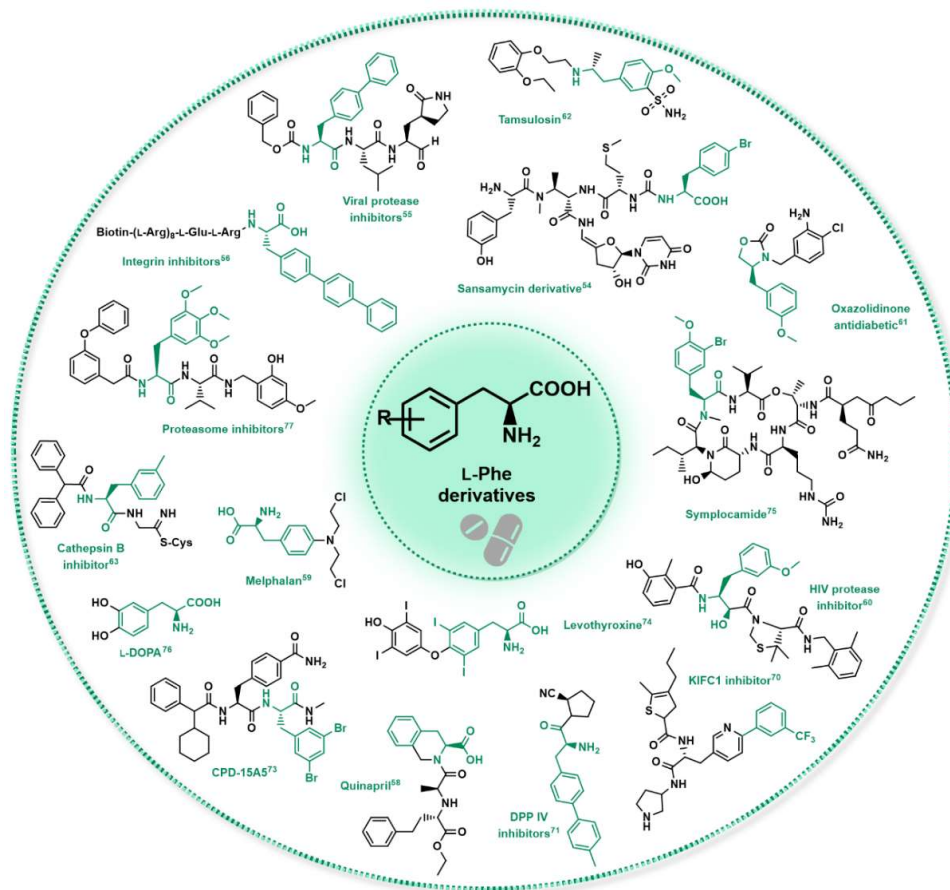


**Schema 1** Eliminarea reversibilă non-oxidativă a amoniacului catalizată de fenilalanină amoniact-liaze (violet), tirozină amoniact-liaze (turcoaz închis), histidină amoniact-liaze (roz) și fenilalanină/tirozină amoniact-liază cu dublă activitate (gri).

rezultând acidul urocanic, acidul *p*-cumaric și acidul cinamic (**Schema 1**). În ultimii ani, amoniac-liazele aromatice, în special PAL-urile, au câștigat popularitate drept catalizatori versatili pentru sinteza aminoacizilor substituiți sau ca enzime bioterapeutice. Au fost descrise o multitudine de aplicații<sup>8-15</sup> care implică aceste enzime, atât în mod independent, cât și în cascade chemoenzimatiche, potențialul lor biocatalitic fiind direcționat spre sinteza derivaților nenaturali ai fenilalaninei.

### 1.1. Aminoacizi aromatici nenaturali

Aminoacizii nenaturali servesc drept elemente constitutive importante, oferind constrângeri de conformație, schele moleculare și compuși farmacologic activi.<sup>16,17</sup> Aminoacizii nenaturali sunt similar din punct de vedere structural cu cei proteinoagenici; totuși, caracteristicile lor chimice și biologice distincte, rezultate din grupările grefate pe inelul aromatic și stereochimia lor, îi fac extrem de atrăgători ca molecule biologic active..<sup>18,19</sup>



**Figura 1.** Exemple reprezentative de API-uri, medicamente și candidați pentru medicamente care conțin derivați ai L-fenilalaninei (componenta fenilalaninei este evidențiat în verde).

Utilizarea și producția de enantiomeri puri ai D- și L-fenilalanină, cât și ai analogilor acestora, a devenit de real interes. Acest lucru se datorează în mod special rolului lor esențial în

sinteza de peptidomimetici<sup>13,20,21</sup>, peptide și inhibitori care țintesc diverse interacțiuni bimoleculare<sup>22,23</sup>, cu API-uri reprezentative care utilizează derivați ai L-fenilalaninei prezentate în **Figura 1**. Pentru sinteza de L-fenilalanine pure, hidroaminarea asimetrică a acidului *trans*-cinnamic, catalizată de fenilalanină amoniac-liaze, care este de asemenea obiectul principal al tezei actuale, este una dintre cele mai atrăgătoare rute biocatalitice. Această metodă oferă o economie de atomi de 100%, un factor E îmbunătățit, un randament spatiu-timp crescut și eliminarea sistemelor de regenerare a cofactorilor.<sup>24-26</sup>

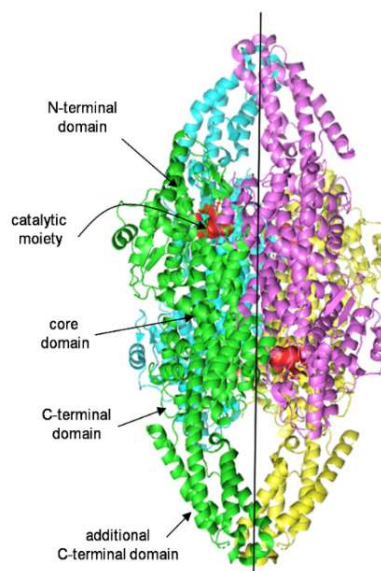
## 1.2. Fenilalanină amoniac-liaze

Fenilalanină amoniac-liazele (PAL-uri, EC 4.3.1.24) catalizează conversia L-fenilalaninei (L-Phe) la acidul *trans*-cinnamic (*t*-CA) printr-o reacție non-oxidativă de dezaminare. Reacția reversibilă, adiția de amoniac, este de asemenea posibilă, utilizând amoniac în exces și un pH ridicat, astfel, deplasând echilibrul către formarea stereoselectivă de L-Phe.

PAL-urile alături de HAL-uri, TAL-uri și PTAL-uri (**Schema 1**) sunt larg distribuite în diverse surse. Fenilalanină amoniac-liazele sunt prezente atât în eucariote, cât și în procariote. Deși sunt în principal distribuite în plante superioare<sup>27-29</sup>, pot fi găsite de asemenea și în unii fungi<sup>30</sup>, drojdii<sup>31,32</sup>, câteva bacterii<sup>33-35</sup>, anumite alge<sup>36</sup> sau amibe<sup>37</sup>. Cele mai studiate enzime din această familie sunt PAL din *Petroselinum crispum* (PcPAL)<sup>38-40</sup>, PAL din *Arabidopsis thaliana* (AtPAL)<sup>41,42</sup>, PAL din *Rhodotorula glutinis* (RgPAL)<sup>43</sup>, PAL din *Rhodospiridium toruloides* (RtPAL)<sup>44</sup> și PAL din *Anabaena variabilis* (AvPAL)<sup>33,37,45</sup>.

### 1.2.1. Arhitectura moleculară și proprietățile funcționale ale PAL-urilor

PAL-urile există de obicei sub formă de homotetrameri, cu aproximativ 52% dintre resturi constituind  $\alpha$ -helixuri și doar 5% foi  $\beta$ -pliate.<sup>28,33,46</sup> Cu toate acestea, unele studii indică și prezența formelor heterotetramerice de PAL.<sup>30,47</sup> Formarea homotetramerică este determinată în principal de interacțiunea dintre suprafețele mari hidrofobe prezente pe subunități.<sup>48</sup> Fiecare tetramer este compus din patru subunități identice, cu situsul catalitic al



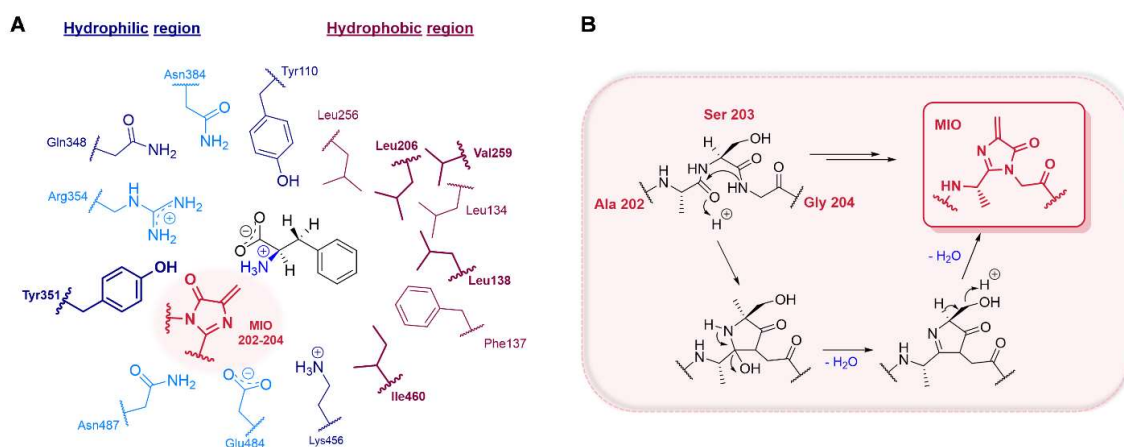
**Figura 2.** Homotetramerul de PcPAL, cu monomerele colorate individual și reprezentând toate domeniile, precum și situsul catalitic (suprafața roșie).



fiecărei subunități fiind înconjurat de alți trei monomeri PAL.<sup>4</sup> Fiecare dintre cei patru monomeri PAL constă într-un domeniu central rigid, un domeniu globular *N*-terminal și un domeniu *C*-terminal alungit. Unele PAL-uri provenite din plante și fungi s-au dovedit a avea un domeniu *C*-terminal adițional, multi-helicoidal, spre deosebire de omologii lor proveniți din bacterii. Acest domeniu poate contribui la reglarea precisă a activității enzimei și la corelarea acesteia cu biosinteza compușilor fenilpropanoidici în aceste organisme, prin mecanisme precum canalizarea substratului sau destabilizarea generală a structurii proteinei.<sup>28,49</sup>

### 1.2.1.1. Situsul catalitic PAL-urilor

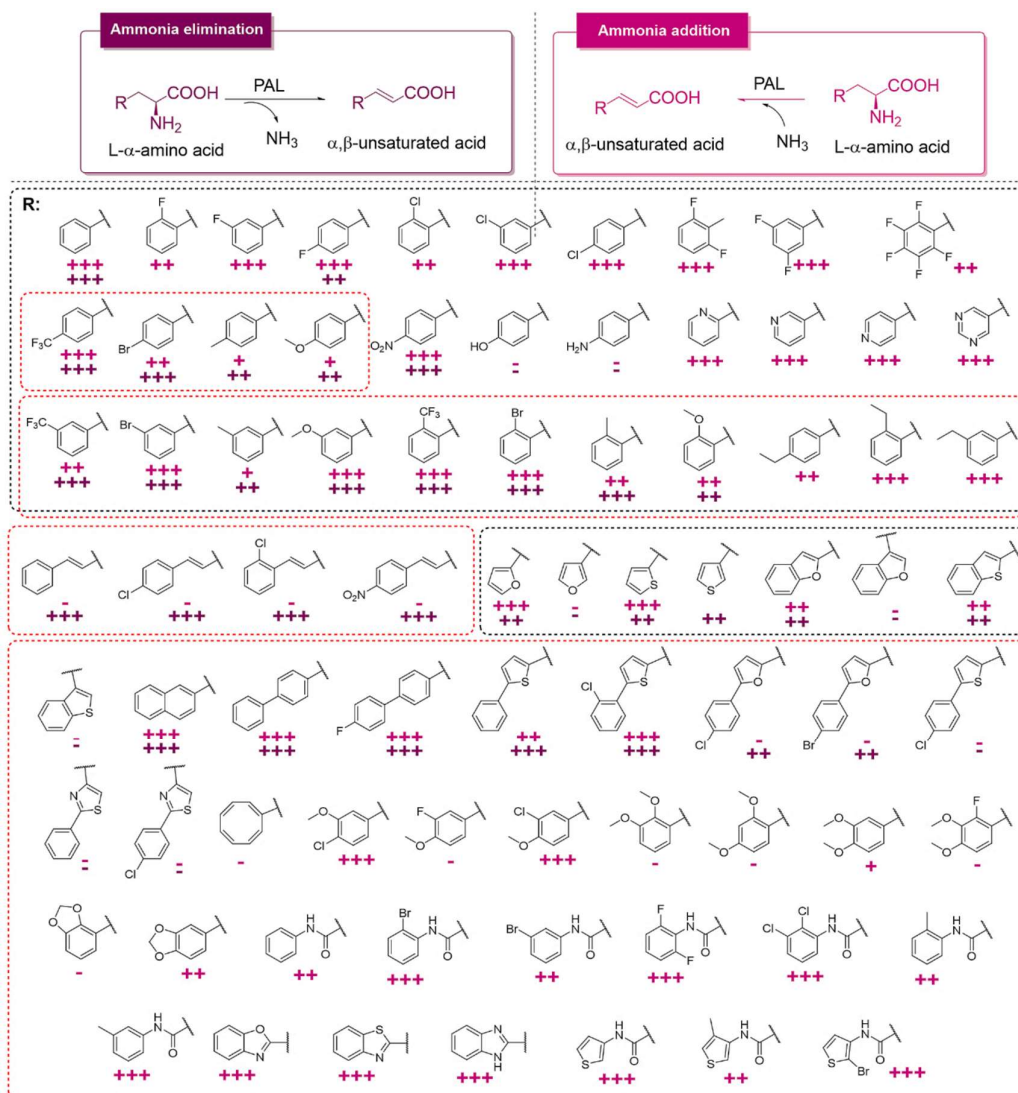
Situsul catalitic al enzimelor PAL este format din două regiuni principale: o regiune hidrofilă și o regiune hidrofobă. Regiunea hidrofilă include resturi precum Arg354, care formează legături de hidrogen cu gruparea carboxilică a substratului, stabilizându-l în situsul catalitic. Regiunea hidrofobă găzduiește inelul aromatic al substratului, în principal prin interacțiuni hidrofobe între acesta și resturile din această regiune, resturi care influențează totodată specificitatea de substrat. (**Figura 3A**). O trăsătură cheie a situsului catalitic este gruparea MIO (3,5-dihidro-5-metiliden-4H-imidazol-4-onă), esențială pentru funcția enzimei și formată post-translațional din cele trei lanțuri laterale ale aminoacizilor Ala-Ser-Gly (ASG): Ala202-Gly204 în PAL din *Petroselinum crispum*.<sup>50</sup> (**Figura 3B**). Resturi specifice din apropierea inelului aromatic, cum ar fi Phe137/Leu138 în *PcPAL*, determină specificitatea enzimei, iar mutații precum His88 în Phe în *RsTAL* și Phe136 în His în *AtPAL1* schimbă specificitatea enzimei de la *TAL* la *PAL* sau invers.



**Figura 3.** Situsul catalitic al enzimelor PAL reprezentat pentru PAL din *Petroselinum crispum*. (**A**) Situsul catalitic al *PcPAL*, evidențiind regiunile hidrofile (albastru) și hidrofobe (mov) de legare a substratului, precum și gruparea prostetică electofilă MIO (roșu). Resturile marcate cu caractere îngroșate sunt situate sub planul substratului, resturile neîngroșate sunt situate deasupra planului substratului, iar resturile de culoare albastru deschis sunt reprezentate în același plan cu substratul. (**B**) Reprezentare schematică a formării post-translaționale a grupării MIO, implicând ciclizarea și deshidratarea dublă a secvenței Ala202-Ser203-Gly204 din *PcPAL*.

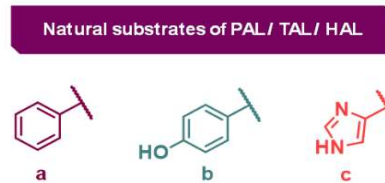
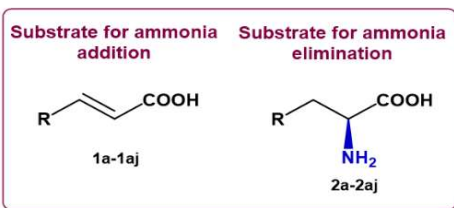
### 1.1.1. Domeniul de substrat și ingineria proteică a PAL-urilor pentru sinteza derivaților nenaturali ai fenilalaninei

PAL-urile native din diferite organisme prezintă un domeniu larg de substrat, oferind astfel accesibilitate sintetică pentru diverși derivați nenaturali ai L-fenilalaninei, care sunt dificil de obținut prin sinteză chimică. PAL din bacteria *Anabaena variabilis*<sup>51</sup> și din plantele *Lactuca sativa*<sup>52</sup> sau *Petroselinum crispum*<sup>38,40,53</sup> sunt cele mai promiscue. În plus, eforturi extinse au fost depuse pentru a îmbunătăți aplicabilitatea PAL-urilor prin extinderea domeniului lor de substrat prin inginerie proteică,<sup>38-40,45,54-56</sup> vizând utilizarea lor la scară industrială (**Figura 4**).



**Figure 4.** Substraturi testate pentru PAL-urile de tip nativ și cele mutante, în reacțiile de eliminare a amoniacului (violet) și adăție a amoniacului (roz). Substraturile transformate de PAL-urile native sunt încadrate cu linii punctate negre, iar cele transformate de PAL-urile mutante sunt evidențiate cu linii punctate roșii, în timp ce substraturile încadrate dublu sunt transformate de PAL-uri de tip sălbatic, activitatea lor fiind îmbunătățită prin inginerie proteică. Conversiile pentru fiecare reacție sunt clasificate astfel: „-” (0%), „+” (1-30%), „++” (31-70%), și „+++” (>70%).

## INDEXUL SUBSTRATURILOR UTILIZATE ÎN CADRUL CAPITOLELOR

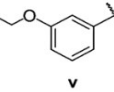
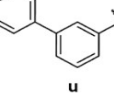
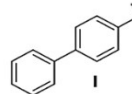
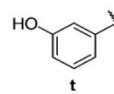
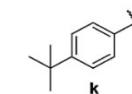
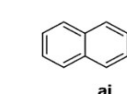
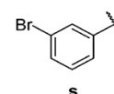
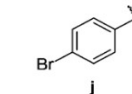
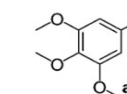
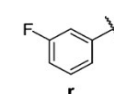
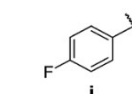
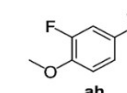
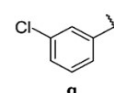
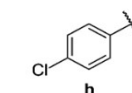
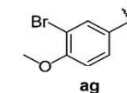
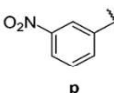
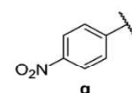
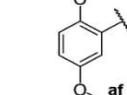
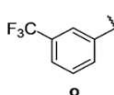
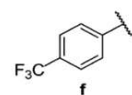
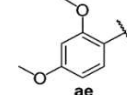
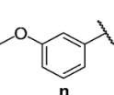
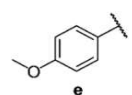
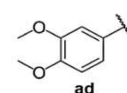
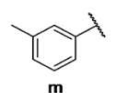
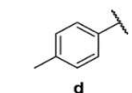


*para*-substituted substrates

*meta*-substituted substrates

*ortho*-substituted substrates

multi-substituted substrates



### Ghid al substraturilor în cadrul capitolelor

Substraturi utilizate în Capitolul 2:  
a,d,f,i,j,l,m,n,o,r,s,u,v,w,y,ad,ae,ag,ah,ai

Substraturi utilizate în Capitolul 3:  
e,n,s,ad,ag,ah

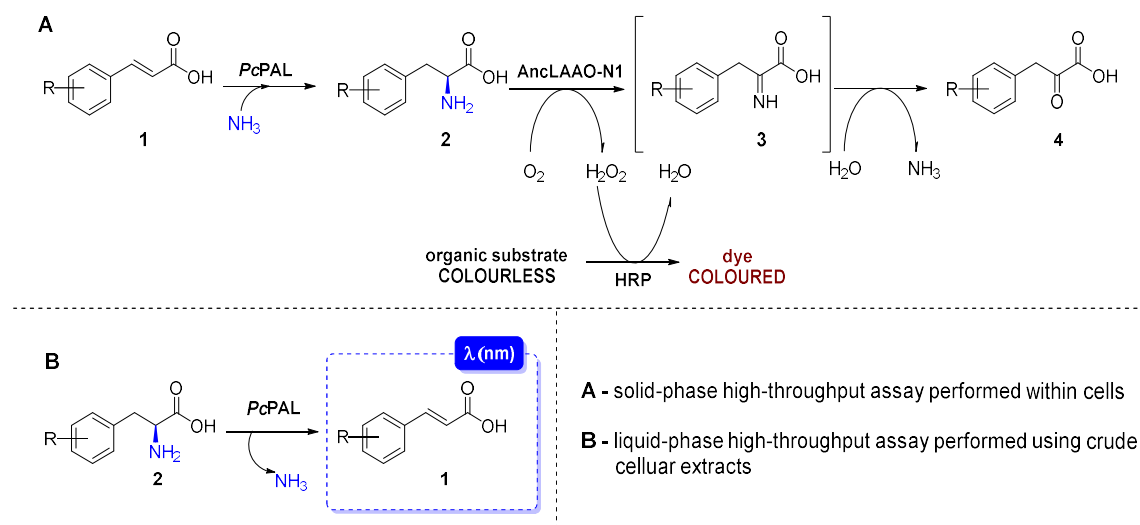
Substraturi utilizate în Capitolul 4:  
a,b,c,d,e,f,g,h,k,l,m,n,o,p,q,t,u,w,x,y,z,aa,ab,ac,ad,ae,af,ag,ah,ai,aj

## CAPITOLUL 2

### 2. METODE DE SCANARE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ PENTRU SCANAREA COLECȚIILOR DE FENILALANINĂ AMONIAC-LIAZELOR OBTINUTE PRIN MUTAGENEZĂ DE SATURAȚIE

#### 2.1. Rezultate și discuții

Au fost dezvoltate două metode de scanare de înaltă performanță pentru a analiza eficient colecții extinse de PAL obținute prin evoluție direcționată și exprimate recombinat în *E. coli*. În metoda în fază solidă, colecțiile de PAL sunt co-exprimate cu L-aminoacid oxidaza ancestrală (AncLAAO-N1).<sup>57</sup>, unde LAAO oxidează derivații de L-fenilalanină obținuți din adăugarea de amoniac la acidul cinamic, producând peroxid de hidrogen. Acesta este detectat printr-o reacție colorimetrică mediată de peroxidaza de hrean (HRP), evidențiind mutații active de PAL. (**Schema 2A**). În metoda în fază lichidă, celulele sunt lizate, iar extractul brut este utilizat pentru a monitoriza reacția de eliminare a amoniacului din derivații de fenilalanină, producția cinamaților fiind urmărită spectrofotometric. (**Schema 2B**).



**Scheme 2.** Reacțiile generale utilizate în metodele de scanare de înaltă performanță în fază solidă bazate pe PAL-LAAO-HRP (A) și testul de înaltă performanță în fază lichidă folosind extracte crude de celule PAL

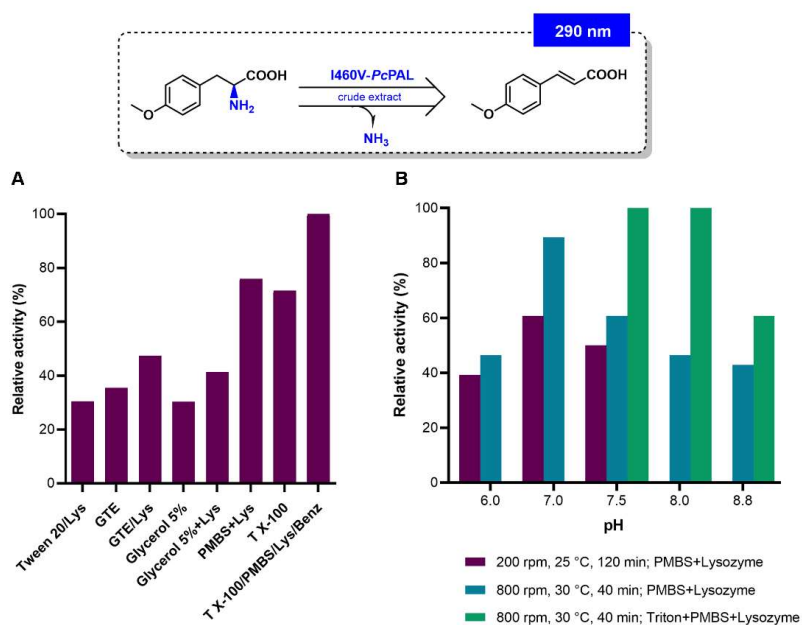
În scopul de a testa cele două metode de scanare de înaltă performanță pentru colecțiile de mutații PAL, au fost selectate ca substraturi model cele care prezintă substituenți donori de electroni atașați pe inelul aromatic al fenilalaninei, fiind substraturi slab transformate de enzimele PAL native.<sup>38,55</sup> În acest caz, s-au utilizat acidul *p*-metoxicinamic (*p*-MeO-*t*-CA) și *p*-metoxi-L-fenilalanina (*p*-MeO-L-Phe) ca substraturi model și mutantul obținut prin proiectare

rațională, I460V-PcPAL, cu activitate față de aceste substraturi, drept control pozitiv în cadrul etapelor de scanare ale librăriei PAL.<sup>38</sup>

### 2.1.1. Metoda de scanare în fază lichidă pentru activitatea fenilalanină amoniac-liazelor

#### 2.1.1.1. Evaluarea și optimizarea condițiilor de liză celulară pentru scanarea eficientă al activității PAL

Pentru a induce liza celulară au fost utilizate o gamă de agenți chimici, inclusiv Tween-20, Triton X-100, lizozim, sulfat de polimixină B (PMBS), soluții de glucoză și glicerol. Eficiența fiecărei soluții de liză a fost evaluată prin măsurarea activității extractului celular brut, în cadrul reacției de eliminare a amoniacului din *p*-metoxi-L-fenilalanină, catalizată de I460V-PcPAL (**Figura 4A**).



**Figure 4.** Activități relative ale I460V-PcPAL față de *p*-MeO-Phe după liza celulară în prezența a diverse soluții de liză (**A**) *colona 1* – Tween-20 / Lys (1% Tween-20, 10 mM imidazol, 0.5 mg/mL lizozim, 400 U/mL ADNază I, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O pH 8.0, 300 mM NaCl); *colona 2* – soluție GTE (50 mM glucoză, 10 mM EDTA, 25 mM Tris.HCl pH 8); *colona 3* – soluție GTE / Lys (50 mM glucoză, 10 mM EDTA, 0.5 mg/mL lizozim, 25 mM Tris.HCl pH 8.0); *colona 4* – soluție de 5% glicerol (5% glicerol, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 50 mM Tris pH 7.5); *colona 5* – soluție de 5% glicerol / Lys (5% glicerol, 0.5 mg/mL lizozim, 1 mM DTT, 50 mM Tris.HCl pH 7.5, 100 mM NaCl); *colona 6* – soluție de PMBS / Lys (1 mg/mL PMBS, 0.5 mg/mL lizozim, 20 mM Tris pH 8.8, 50 mM NaCl); *colona 7* – soluție de Triton X-100 (2% Triton X-100, 20 mM Tris pH 8.8, 50 mM NaCl); *colona 8* – soluție T X-100 / PMBS / Lys (2% Triton X-100, 1 mg/mL PMBS, 0.5 mg/mL lizozim, 25 U/mL Benzonază, 20 mM Tris.HCl pH 8.8, 50 mM NaCl). (**B**) Optimizarea soluției de liză utilizând două seturi de agenți de liză: 1 mg/mL PMBS, 0.5 mg/mL lizozim și 0.36 mM PMBS, 0.07 mM lizozim, 2% Triton X-100, 25 U/mL Benzonază, respectiv diferite condiții de liză și pH. Abrevieri: Lys., PMBS, T X-100 și Benz. reprezintă lizozim, polymixin B sulfat, Triton X-100 și Benzonază.

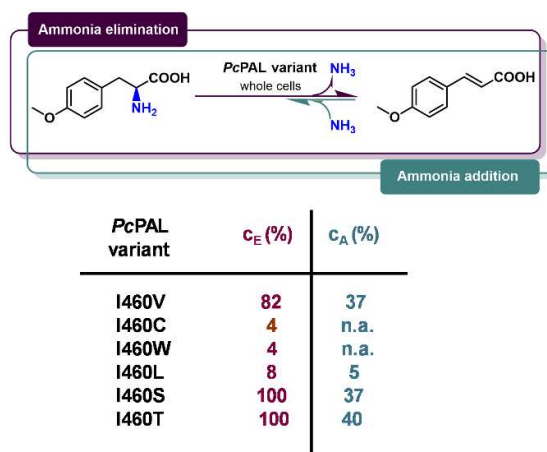
O soluție de liză conținând PMBS și lizozim a fost identificată ca fiind optimă în urma scanării inițiale, iar eficiența acesteia a fost îmbunătățită adițional prin optimizarea pH-ului, a temperaturii de incubare și a vitezei de agitare (**Figura 4B**). Condițiile optime de liză au fost stabilite folosind o soluție tampon de Tris.HCl cu pH 7,0, conținând 0,5 mg/mL lizozim și 1 mg/mL PMBS, incubând timp de 40 min la 800 rpm și 30 °C. Finalmente, s-a obținut un lizat celular omogen și limpede, cu un fundal UV scăzut, care ulterior s-a dovedit a fi aplicabil pentru testele de activitate PAL (**Figura 4B, coloana 4**).

### 2.1.1.2. Validarea metodei de scanare UV pentru activitatea PAL

După stabilirea condițiilor optime de liză, colecția obținută prin mutageneză de saturație la nivelul restului 460 al PcPAL, randomizat folosind degenerarea NNK (discutată în *Capitolul 3, Secțiunea 3.2.2.1.*), a fost supusă unei scanări pentru a evalua activitatea sa de eliminare a amoniacului față de *p*-MeO-Phe.

În cadrul experimentelor de scanare a colecției, PcPAL-ul nativ, inactiv față de substraturile model, a fost inclus drept control negativ, iar mutantul activ I460V-PcPAL a fost utilizat drept control pozitiv. Rezultatele obținute în urma scanării în fază lichidă, validate prin monitorizarea reacției prin HPLC, au relevat zece variante active, dintre care mutația I460V, proiectată rațional, a fost găsită în patru colonii selectate. De asemenea, au fost descoperite cinci noi mutații benefice: I460C, I460L, I460W, I460T și I460S (**Figura 5**).

Rezultatele au indicat limitări ale metodei de scanare în fază lichidă, deoarece mutanți precum I460C, I460W și I460L, care prezintă o activitate îmbunătățită în reacția de eliminare a amoniacului, prezintă activitate scăzută sau sunt complet inactivi în reacția inversă, de adădire a amoniacului. Acest aspect subliniază necesitatea unor metode de scanare specifice care să vizeze reacția de adădire a amoniacului. Cu toate acestea, mutanții identificați din colecția I460NNK-PcPAL oferă o colecție control bine caracterizată pentru validarea metodei de scanare în fază solidă.



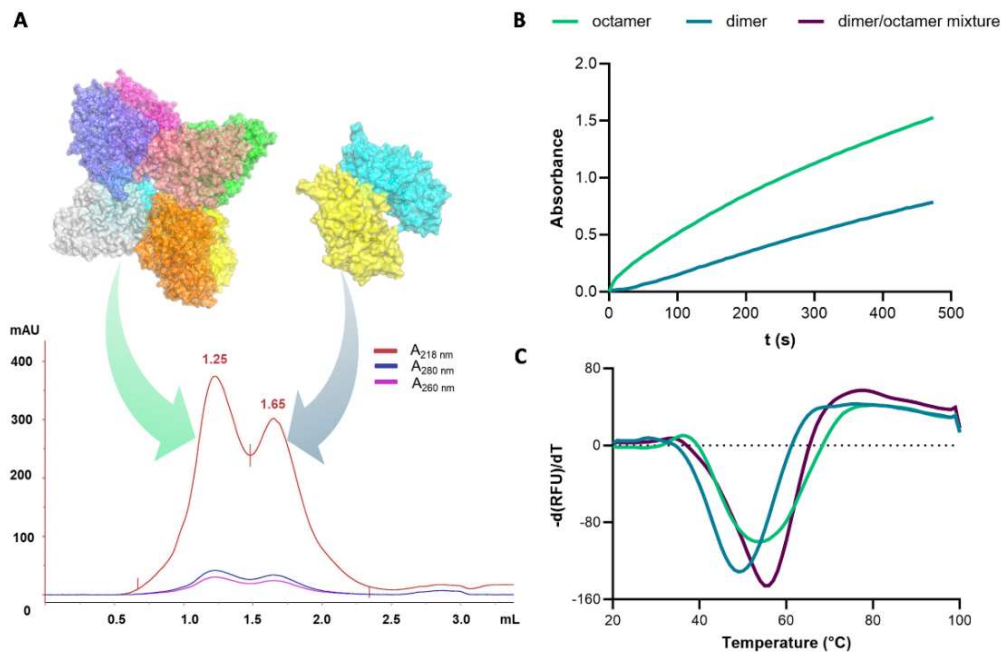
**Figure 5.** Eliminarea amoniacului din *p*-metoxi-*l*-fenilalanină și adădirea amoniacului la *p*-metoxi-*trans*-cinnamic acid, folosind biocatalizatori sub formă de celule întregi pentru mutanții PcPAL corespunzătoare, care au prezentat o activitate îmbunătățită în cadrul metodei de scanare a activității în fază lichidă.

### 2.1.2. Metoda de scanare în fază solidă prin cuplarea enzimei PAL cu AncLAAO-N1

Odată implementată metoda de scanare UV, în fază lichidă, a fost necesar să se evalueze și fezabilitatea metodei în fază solidă. În acest caz, o serie de pași inițiali au fost esențiali. În primul rând, exprimarea și purificarea L-aminoacid oxidazei ancestrale (AncLAAO-N1) au fost optimizate, urmate de evaluarea compatibilității domeniului său de substrat cu domeniul de substrat al PAL-urilor. În continuare, determinarea constantelor catalitice ale AncLAAO-N1 a fost importantă pentru a asigura că factorul limitativ din sistem rămâne adăugarea de amoniac catalizată de PAL, nu oxidarea L-aminoacidului produs. În cele din urmă, a fost implementată și optimizată metoda de scanare în fază solidă, iar validarea acesteia a fost realizată prin scanarea aceleași colecții I460NNK-*PcPAL* pentru activitate față de substratul model, acidul *p*-MeO-cinamic, în reacția de adăugare a amoniacului.

#### 2.1.2.1. Exprimarea și purificarea AncLAAO-N1

Pentru producția AncLAAO-N1, au fost utilizate două constructe plasmidice: unul în pET-28a(+) care permite fuzionarea enzimei cu o etichetă His<sub>6</sub> la capătul C-terminal, iar celălalt în pET-15b, care facilitează exprimarea AncLAAO-N1 fuzionată cu o etichetă His<sub>6</sub> la capătul N-terminal. După mai multe etape de purificare a AncLAAO-N1, atât a variantei cu etichetă His la capătul C-terminal, respectiv la cel N-terminal, folosind cromatografia de afinitate Ni-NTA, s-a obținut enzima AncLAAO-N1 omogenă, cu His<sub>6</sub> N-terminal și impurități minime.



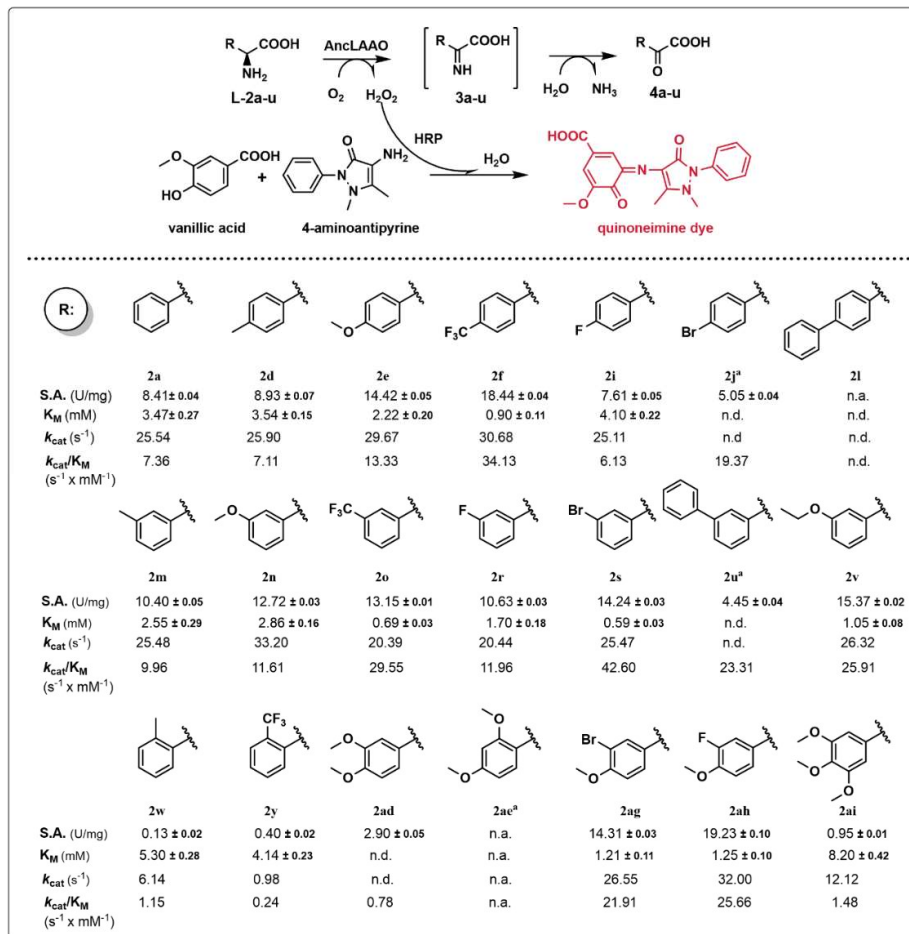
**Figure 10.** (A) Cromatografia de excluziune sterică (SEC) a AncLAAO-N1 prezentând forma octamerică (1.23 mL) și cea dimerică (1.65 mL); (B) Măsurarea activității pentru L-Phe folosind fracțiile dimerice și octamerice; (C) Profilele de denaturare termică ale diferitelor forme oligomerice ale AncLAAO-N1.



Cromatografia de exclusiune sterică (SEC) a AncLAAO-N1 a relevat prezența a două stări de oligomerizare (**Figura 6A**), asociate cu formele dimerică și octamerică. Forma octamerică a prezentat o activitate specifică de 6,3 ori mai mare, măsurată în cadrul oxidării L-Phe (**Figura 6B**), și o creștere a  $T_m$  de aproximativ 8 °C ( $T_m = 56$  °C), comparativ cu forma dimerică ( $T_m = 48$  °C) (**Figura 6C**).

### 2.1.2.2. Domeniul de substrat al AncLAAO\_N1

Pentru a evalua compatibilitatea domeniului de substrat al AncLAAO-N1 cu cel al fenilalanină amoniac-liazelor native și mutante, a fost realizat un profil detaliat al substraturilor pentru AncLAAO-N1. Astfel, au fost testate în cadrul oxidării mediate de AncLAAO-N1 o varietate de fenilalanine *orto*-, *meta*- și *para*- mono-substituite, precum și fenilalanine di-, tri-substituite sau analogi biarilici (**Figure 7**).



**Figure 7.** Colecția de substraturi testată pentru dezaminarea oxidativă catalizată de AncLAAO-N1, parametrii cinetici corespunzătorii fiind determinați spectrofotometric prin cuplarea cu HRP. (a – Curbele complete Michaelis-Menten nu au putut fi determinate din cauza solubilității scăzute a substratului; în schimb, constantele  $k_{cat}/K_M$  au fost determinate la concentrații de substrat de cel puțin 10 ori mai mici decât  $K_M$  estimat; n.a. – nu a fost detectată activitate, nd. – nu a putut fi determinată).



Parametrii cinetici ai AncLAO-N1 în dezaminarea oxidativă a fenilalaninelor substituie au relevat o eficiență catalitică ridicată pentru substraturi mono-, di- sau multiplu-substituie în pozițiile *meta*- sau *para*-, în timp ce substraturile substituie în poziția *orto*- au fost transformate cu o eficiență scăzută sau nu au fost transformate deloc.

### 2.1.2.3. Validarea metodei de scanare în fază solidă

Configurarea testului a fost inițiată prin cuplarea oxidării catalizate de AncLAO-N1 cu reacția de adiție a amoniacului mediată de PAL, folosind sistemul de detecție cu peroxidază din hrean (HRP) (Figura 8). În timpul inițierii metodei, mutații PAL activi identificați anterior din colecția derivată prin mutageneză de saturație I460NNK-PcPAL au fost utilizate drept controale pozitive, în reacția adiția de amoniac la substratul model, acidul *p*-metoxi-cinamic.

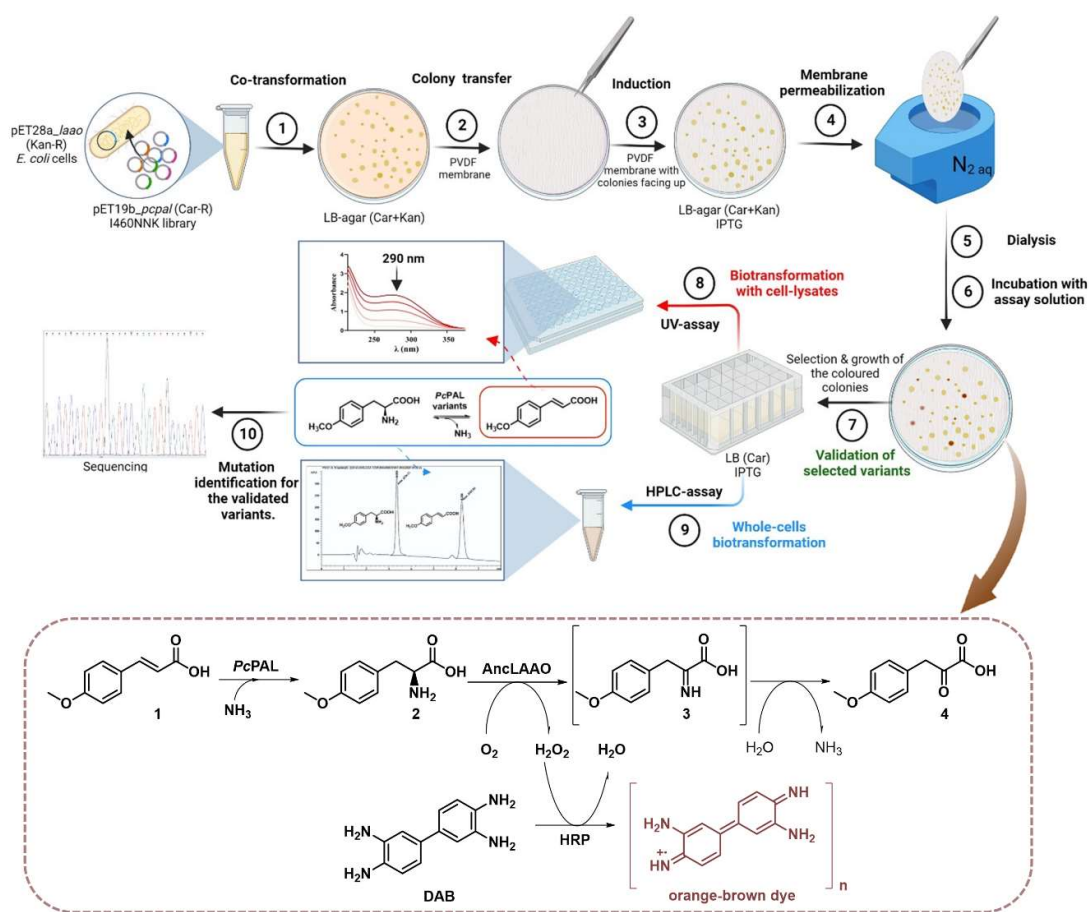
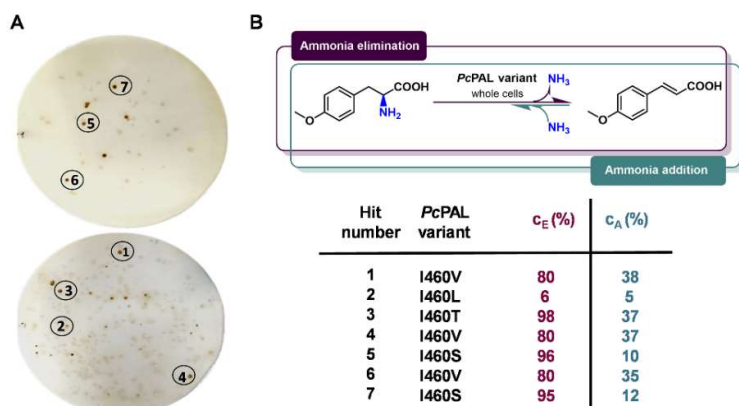


Figura 8. Procedura generală pentru testarea activității PAL, bazată pe metoda de scanare în fază solidă, cuplată cu AncLAO-N1.

Utilizând metoda de scanare în fază solidă pe colecția PAL obținută, evaluarea calitativă a activității la nivelul fiecărei colonii a putut fi realizată ușor, prin inspecție vizuală, permițând identificarea și selectarea celor mai performanți mutații în funcție de intensitatea culorii lor brun-portocalie (Figura 9A). În mod impresionant, mutații cu activitate îmbunătățită identificați,

I460V, I460T, I460S și I460L (**Figura 9B**), corespund tuturor mutațiilor anterior identificați prin metoda în fază lichidă din aceeași colecție PAL. Aceste rezultate demonstrează că metoda scanare în fază solidă subliniază potențialul AncLAAO-N1 și ajută la identificarea mutațiilor PAL cu activitate superioare. În plus, în timp ce majoritatea metodelor de scanare PAL utilizate în prezent se bazează pe reacția de eliminare a amoniacului, procedura dezvoltată în fază solidă permite identificarea directă a mutațiilor cu activitate îmbunătățită în cadrul reacției de adiție a amoniacului, reacția valoroasă din punct de vedere sintetic.



**Figura 9.** Rezultatele obținute în urma scanării colecției I460NNK-PcPAL. **(A)** Membrane obținute din scanarea colecției I460NNK, folosind metoda de scanare în fază solidă AncLAAO-PAL; **(B)** Valorile conversiei pentru mutații identificați, în cadrul reacțiilor de eliminare și adiție ale amoniacului mediate de PAL.

## 2.2. Concluzii

Au fost dezvoltate și comparate două metode de scanare pentru activitatea PAL, utilizând colecția I460NNK-PcPAL obținute prin mutageneză de saturare și substraturile model, *p*-metoxi-L-fenilalanină și acidul *p*-metoxi-*trans*-cinamic. Metoda de scanare în fază lichidă a vizat reacția de eliminare a amoniacului catalizată de PcPAL, iar metoda de scanare în fază solidă, rezultată prin cuplarea PAL cu o L-amino acid oxidază ancestrală (AncLAAO-N1), s-a concentrat pe reacția inversă, adiția de amoniac.

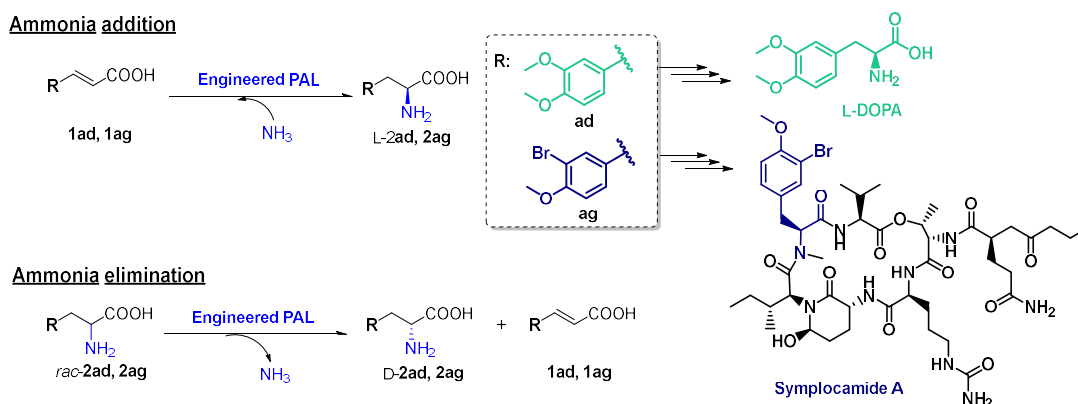
Metoda în fază lichidă a identificat șase variante cu activitate îmbunătățită în eliminarea amoniacului: I460V, I460T, I460S, I460L, I460W și I460C, cu I460W și I460C fiind complet inactivi în reacția de adiție a amoniacului, subliniind o limitare a metodei în fază lichidă. Spre deosebire de aceasta, metoda în fază solidă, folosind AncLAAO-N1, s-a dovedit eficientă pentru scanarea la scară largă a reacției de adiție a amoniacului. Variantele PAL îmbunătățite au fost identificate și validate cu succes, corespunzând celor găsite în metoda în fază lichidă, având avantajul suplimentar al țintirii directe a reacției de adiție a amoniacului, reacție valoroasă din punct de vedere sintetic. Această abordare subliniază utilitatea AncLAAO-N1 în identificarea mutațiilor PAL pentru reacții cu importanță sintetică.

## CAPITOLUL 3

### 3. INGINERIA PROTEICĂ FENILALANINĂ AMONIAC-LIAZELOR PENTRU ACTIVITATE ÎMBUNĂȚITĂ FAȚĂ DE SUBSTRATURILE DIFICILE

#### 3.1. Rezultate și Discuții

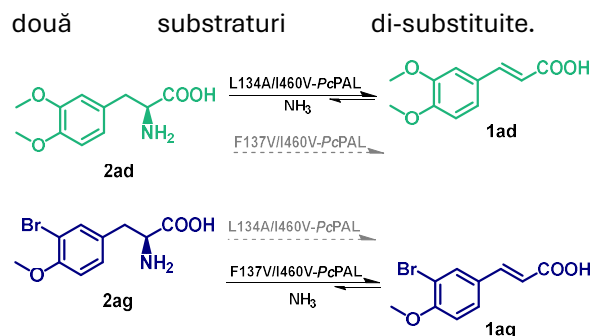
În ceea ce privește ingineria fenilalanină amoniac-liazelor (PAL-uri) față de substraturi dificile, cum ar fi 3,4-dimetoxi-L-fenilalanina și 3-bromo-4-metoxi-L-fenilalanina, esențiale pentru sinteza L-DOPA<sup>58</sup> și Simplocamida A<sup>59</sup> (**Schema 3**), strategiile inițiale s-au concentrat pe versiunile mono-substituite ale acestor substraturi. Aceste rezultate preliminare au permis identificarea ulterioară a mutațiilor PAL activi față de substraturile di-substituite vizate. Au fost utilizate și comparate atât proiectarea rațională, cât și mutagenză de saturare, pentru a evalua eficiența acestora.



**Scheme 3.** Activitatea PAL țintită față de substraturile 3,4-dimethoxy- (**1ad**, **2ad**) și 3-bromo 4-methoxy- (**1ag**, **2ag**)-substituite, generând compuși de mare valoare sintetică, cu **2ad** și **2ag** servind drept sintoni pentru sinteza diversilor API.

#### 3.1.1. Proiectarea rațională pentru substraturi dificile

Cercetările anterioare au extins domeniul de substrat al PcPAL pentru a include derivați de fenilalanină cu mono-substituenți mai voluminoși, obținându-se mutații obținute prin substituția unor resturi specifice, incluzând L134A, I460V și F137V, care ating conversii moderate.<sup>38-40</sup> Pe baza acestor rezultate, resturile L134, F137 și I460 au fost selectate pentru mutagenză, în vederea îmbunătățirii activității față de cele



**Scheme 4.** Reacțiile de eliminare și aditie ale amoniacului pentru **1ad,2ad** și **1ag,2ag** utilizând dubli mutații L134A/I460V-PcPAL și F137V/I460V-PcPAL.

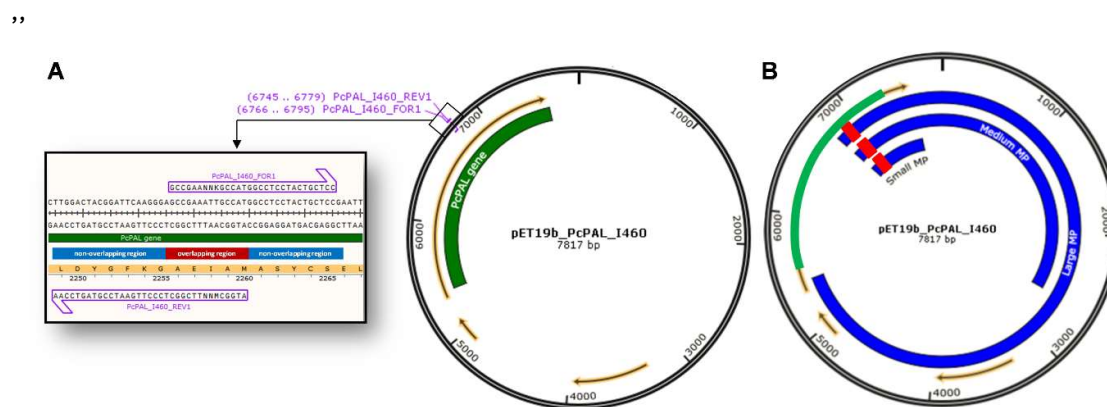
Dubli mutații L134A/I460V și F137V/I460V au prezentat o activitate îmbunătățită atât în reacțiile de eliminare, cât și în cele de adiție ale amoniacului față de substraturile 3,4-dimetoxi-(**1ad**, **2ad**) și 3-bromo 4-metoxi-(**1ag**, **2ag**) (**Schema 4**), cu L134A/I460V atingând până la 17% conversie și F137V/I460V ajungând la 15% conversie în reacția de adiție a amoniacului pentru acidul 3,4-dimetoxi *trans*-cinamic și acidul 3-bromo 4-metoxi *trans*-cinamic. În ciuda acestor îmbunătățiri, reacția de adiție a amoniacului a atins conversii moderate. Astfel, a fost implementată o a doua abordare, care a implicat mutageneza de saturație la aceleași resturi de aminoacizi din situsul catalitic, selectate pentru proiectarea rațională.

### 3.1.2. Mutageneza de saturație

Luând în considerare faptul că proiectarea rațională a fost validată anterior pe PAL-uri de diferite origini,<sup>38,42</sup> stabilirea în prima instanță a unei metodologii robuste pentru mutageneza de saturație a fost necesară. În consecință, optimizarea mutagenezei de saturație a fost inițial realizată pe baza colecției I460NNK-PcPAL, urmată de implementarea Testului de Saturație Combinatorie a Sitului Activ (CAST-ing)<sup>60</sup> și de mutageneza de saturație iterativă (ISM)<sup>61,62</sup> pentru a croi mutații PAL cu activitate față de substraturile 3,4-di-substituite.

#### 3.1.2.1. Mutageneza de saturație situs-direcționată

Pentru o mutageneză eficientă, s-au utilizat două protocoale, unul bazat pe primeri parțial suprapuși<sup>63</sup> (**Figura 10A**) și unul bazat pe metoda Megaprimerilor<sup>64</sup> (**Figura 10B**).

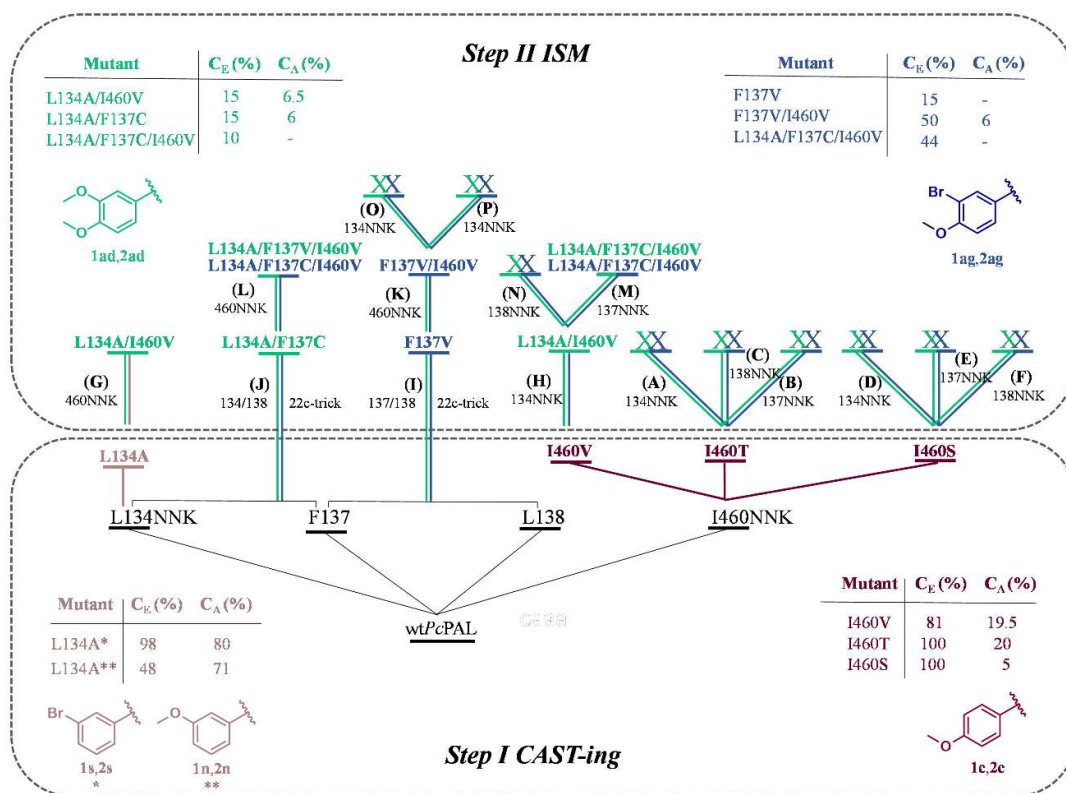


**Figure 10.** Saturation mutagenesis using the (A) Partially overlapping procedure (B) Megaprimers procedure, representing the gene encoding PcPAL (green) the pET19b-vector backbone (black), and the megaprimers of different, small, medium, large lengths (blue). In the first PCR stage the forward mutagenic primer (red) and the reverse, non-mutagenic, primer anneal to the template resulting the amplified sequences of the corresponding, large, medium and small-sized megaprimers. In the second PCR stage through annealing the two single stranded DNA of the megaprimers the mutated plasmid products are amplified.

Abordarea ce utilizează primeri parțial suprapuși a demonstrat o eficiență îmbunătățită față de metoda tradițională QuickChange. Cu toate acestea, metoda Megaprimerilor, în special cu megaprimeri de dimensiuni scurte, a generat o colecție PAL care prezintă o distribuție a nucleotidelor mai apropiată de valoarea teoretic așteptată a degenerării NNK și implicit, o reprezentare mai echilibrată a aminoacizilor. În consecință, metoda megaprimerilor de dimensiuni scurte a fost selectată pentru experimentele ulterioare.

### 3.1.2.2. Mutageneza de saturație pentru substraturi dificile

Utilizarea tehnicii CAST-ing, combinată cu mutageneza de saturație iterativă (ISM), a fost concepută în încercarea de a surclasa limitările identificate în cadrul proiectării raționale abordate anterior, vizând trei resturi catalitice cheie din PcPAL: L134, F137 și I460, împreună cu L138. În ciuda tuturor încercărilor (**Figura 11**), combinarea celor patru resturi catalitice în runde iterative nu a relevat aceeași mutații obținuți prin proiectare rațională.



**Figure 11.** Strategia de mutageneză de saturație utilizată pentru generarea activității PAL îmbunătățite față de 3,4-dimetoxi-L-fenilalanină (**2ad**) și 3-metoxi-4-bromo L-fenilalanina (**2ag**). Figura a fost adaptată din Tomoiagă *et al.* 2023<sup>65</sup>

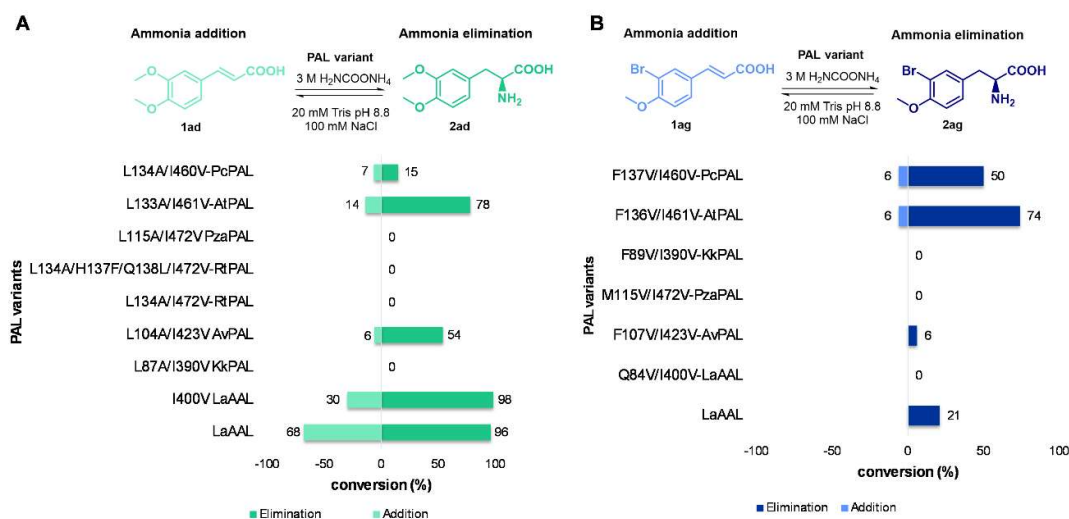
Pentru cele două substraturi di-substituite, mutații proiectați rațional L134A/I460V și F137V/I460V s-au dovedit a fi cei mai active, mutageneza de saturație nereușind să depășească performanțele acestor variante proiectate rațional. Aceste rezultate subliniază faptul că, deși

mutageneza de saturație poate genera colecții diverse de mutații totodată, prezintă o diversitate mutațională limitată pentru resturile modulatorie ale specificității în PcPAL (L134, F137 și I460).

### 3.1.3. Combinarea ingineriei proteice cu diversitatea naturală

În studiile anterioare, menite să extindă strategia proiectării rațională pentru îmbunătățirea activității PAL față de substraturile mono-substituite, în PAL-uri de diferite origini, s-a observat că gradul de eficiență catalitică față de un anumit substrat variază chiar și între PAL-uri care au același situs catalitic.<sup>42</sup> Această variație ilustrează faptul că activitatea PAL este influențată de factori care depășesc diferențele în situsul catalitic și subliniază importanța testării mutațiilor și implicit a activității la nivelul PAL-urilor din diverse origini, în vederea dezvoltării unor biocatalizatori PAL eficienți. În consecință, în următoarea noastră încercare de a genera PAL-uri active pentru substraturile vizate, a fost evaluat efectul aplicării mutațiilor benefice identificate în PcPAL, asupra diferitelor PAL-uri provenite din diverse origini.

În timp ce mutațiii cei mai performanți din PcPAL, L134A/I460V și F137V/I460V, au demonstrat o activitate îmbunătățită, eficiența catalitică a acestora a rămas moderată. Prin urmare, aceste mutații benefice au fost transferate la PAL-uri din diferite origini pentru a investiga posibile îmbunătățiri suplimentare ale activității PAL față de substraturile 3,4-dimetoxi-(**1ad**, **2ad**) și 3-bromo-4-metoxi-(**1ag**, **2ag**). Mutațiii corespunzătorii ale PAL-urilor din *Arabidopsis thaliana* (AtPAL) și din *Anabaena variabilis* (AvPAL) au demonstrat o eficiență catalitică superioară comparativ cu omologii lor din PcPAL (**Figura 12**).



**Figure 12.** Conversii obținute utilizând mutațiii PAL proveniți din diferite origini, sub formă de celule întregi, testați în reacțiile de adiție și eliminare a amoniacului din (A) **1ad**, **2ad** și (B) **1ag**, **2ag**.

În plus, PAL-urile mutante au fost comparate cu o nouă amoniac-liază aromatică provenită din *Loktanella atrilutea* (LaAAL), un omolog al amoniac-liazei aromatice AL-11,



identificată în urma unor experimente metagenomice<sup>66</sup>. AL-11 a fost recent raportată ca având o activitate neobișnuit de mare față de substraturile cu substituenți donori de electroni grețați pe inelul aromatic. În urma testării, *LaAAL* a depășit activitatea mutanților *PcPAL*, *AtPAL* și *AvPAL* în obținerea de 3,4-dimetoxi-L-fenilalanină, fiind inactivă față de derivații 3-bromo-4-metoxi.

În timp ce mutanții *PcPAL*, *AtPAL* și *AvPAL* au prezentat conversii comparabile, ridicate, pentru eliminarea amoniacului din **2ad**, *LaAAL* a prezentat o performanță catalitică superioară în mai multe instanțe. În mod specific, *LaAAL* a atins o conversie semnificativ mai mare pentru adiția amoniacului la acidul 3,4-dimetoxi *trans*-cinamic **1ad**, comparativ cu cel mai performant mutant, L133A/I461V-*AtPAL*, în ciuda afinității mai scăzute față de substrat, așa cum indică valorile *LaAAL* mai mari ale  $K_M$ . Constantele catalitice mai mari ale *LaAAL* sugerează faptul că substraturile se acomodează într-un mod care îmbunătățește conversia catalitică, rivalizând cu eficiențele catalitice naturale observate în PAL-urile native, evidențiind potențialul enzimei *LaAAL* ca biocatalizator extrem de eficient pentru substraturile 3,4-dimetoxi-substituite. Încercările de a transfera resturile modulatorie ale selectivității de la *LaAAL* la PAL-urile bine caracterizate nu au reușit să îmbunătățească activitatea acestor PAL-uri față de substraturile vizate. Totodată, activitatea *LaAAL* a fost redusă atunci când proiectarea rațională dovedită a fi eficientă pentru PAL-urile cunoscute a fost aplicată. Aceste rezultate indică faptul că alte strategii de mutageneză sunt necesare pentru amoniac-liazele aromatice omoloage *LaAAL*, acestea putând reprezenta o subclasă diferită de amoniac-liaze, evaluate în mod natural pentru o reacție și un domeniu de substrat distincte.

### 3.2. Concluzii

Ingenieria *PcPAL*, utilizând mutageniza de saturație și proiectarea rațională, a dus la obținerea de mutanți cu activitate îmbunătățită față de substraturi dificile pentru PAL-urile native, cum ar fi 3-bromo-4-metoxi-L-fenilalanina și 3,4-dimetoxi-L-fenilalanina. Cei mai performanți mutanți, L134A/I460V și F137V/I460V, au prezentat o eficiență catalitică moderată. Introducerea acestor mutații la PAL-uri de origine diferită a demonstrat că mutații corespunzătoare din *Arabidopsis thaliana* (*AtPAL*) și *Anabaena variabilis* (*AvPAL*) au avut o eficiență mai mare comparativ cu cele din *PcPAL*. Cu toate acestea, amoniac-liaza aromatică din *Loktanella atrilutea* (*LaAAL*), omolog al AL-11, a demonstrat o performanță superioară față de 3,4-dimetoxi-L-fenilalanina, fiind inactivă în prezența derivaților 3-bromo-4-metoxi-substituiți. Încercările de a transfera situsul catalitic al *LaAAL* la alte PAL-uri sau de a aplica strategia rațională a PAL-urilor cunoscute la *LaAAL* nu au generat mutanți cu activitate îmbunătățită față de cele două substraturi di-substituite.

## CAPITOLUL 4

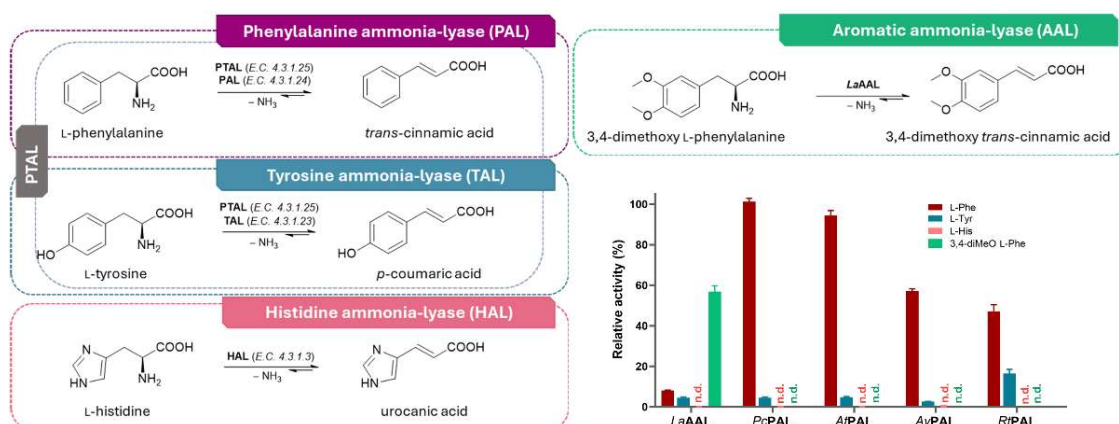
### 4. DESCOPERIREA POTENȚIALULUI BIOCATALITIC AL AMONIAAC-LIAZEI AROMATICE DIN *LOKTANELLA ATRILUTEA*: IDENTIFICAREA OMOLOGILOR ȘI ANALIZA RELAȚIILOR ANCESTRALE

#### 4.1. Rezultate și Discuții

Caracterizarea domeniului de substrat și a potențialului biocatalitic al amoniac-liazei aromatice din *Loktanella atrilutea* au fost realizate, concentrându-se pe utilitatea acesteia în reacția de adiție a amoniacului, folosind ca substrat model acidul 3,4-dimetoxi-*trans*-cinamic. În dorința de a extinde cunoștințele despre această posibilă subclasă distinctă de amoniac-liaze aromatice și de a spori aplicabilitatea lor în producția de compuși chimici valoroși, au fost explorate domeniul său de substrat, respectiv au fost investigate relațiile evolutive ale acesteia în cadrul familiei enzimelor MIO.

##### 4.1.1. Scanarea inițială a amoniac-liazei din *Loktanella atrilutea*

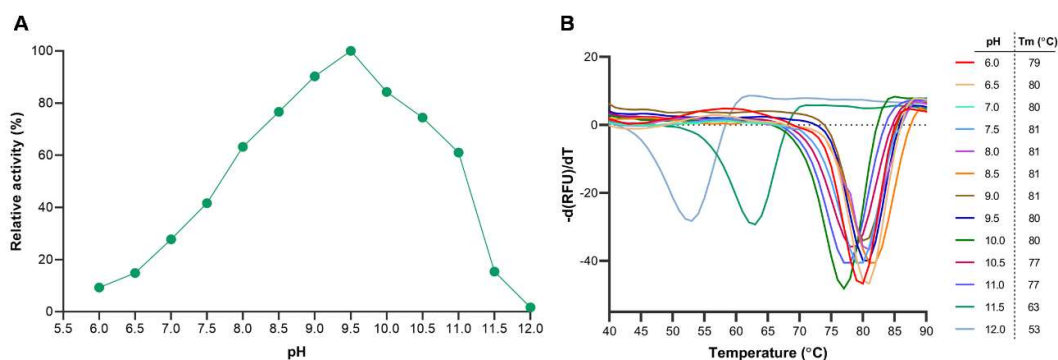
Testarea activității *LaAAL* a implicat determinarea vitezelor inițiale ale enzimei purificate față de substraturile naturale ale amoniac-liazelor aromatice, L-Phe, L-Tyr și L-His, precum și față de 3,4-dimetoxi-L-fenilalanina (**2ad**), ales ca substrat model, și compararea acestor activități cu cele ale PAL-urilor cunoscute (**Figura 13**). După cum s-a observat anterior în *Capitolul 3*, *LaAAL* a demonstrat o activitate neobișnuit de mare pentru 3,4-dimetoxi-L-fenilalanină, în comparație cu substraturile naturale ale amoniac-liazelor aromatice, având o activitate mult mai mică pentru L-Phe, L-Tyr și fiind inactivă față de L-His.



**Figure 13.** Testarea inițială pentru evaluarea reacțiilor naturale ale *LaAAL* față de reacțiile naturale ale PAL-urilor, TAL-urilor și HAL-urilor, precum și reacția model utilizată pentru determinarea condițiilor optime pentru reacțiile catalizate de *LaAAL*; Activitățile relative ale *LaAAL* și ale altor PAL-uri bine caracterizate față de substraturile naturale L-Phe, L-Tyr, L-His și substratul model 3,4-dimetoxi L-Phe.



#### 4.1.2. Efectul pH-ului asupra reacției de eliminare a amoniacului catalizată de *LaAAL*

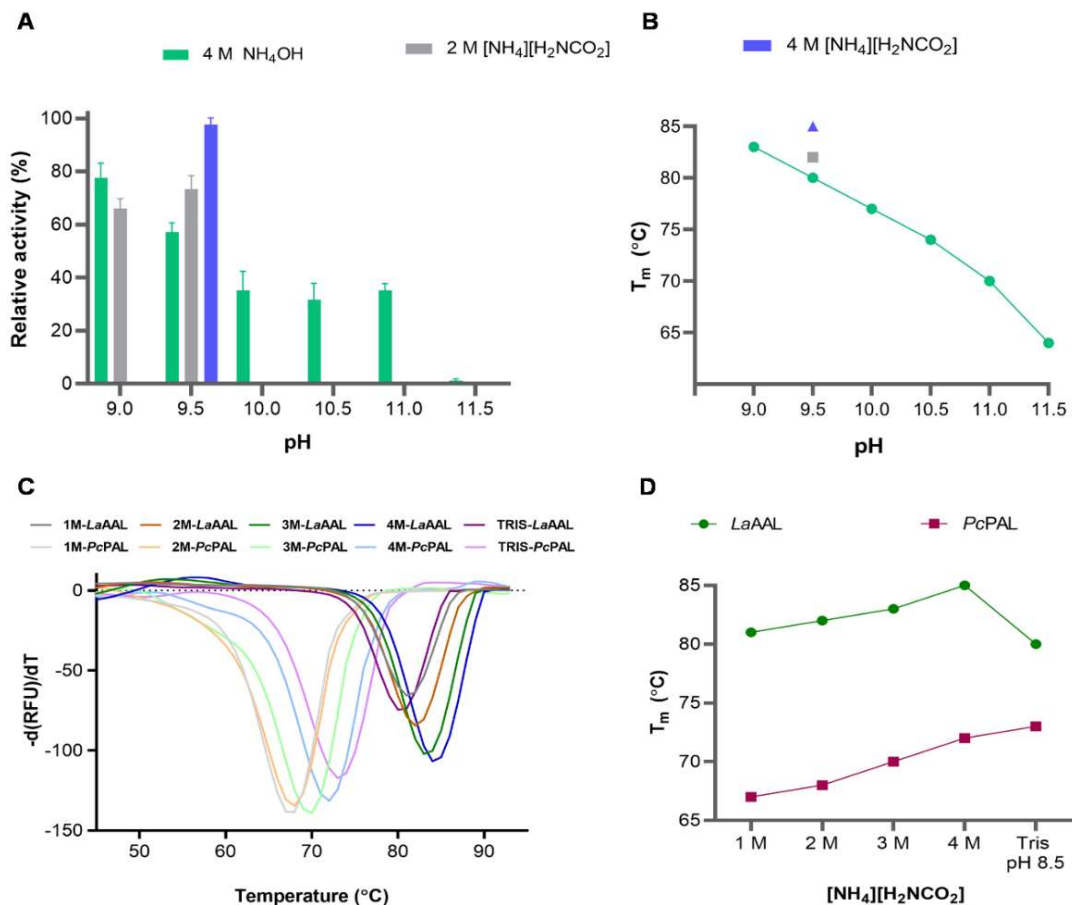


**Figura 14.** pH-ul optim al reacției de eliminare a amoniacului catalizată de *LaAAL* din **2ad**: **(A)** Vitezele inițiale relative ale reacției de eliminare a amoniacului catalizată de *LaAAL* în soluții tampon de diferite pH-uri; **(B)** Curbele și temperaturile de topire ( $T_m$ ) ale *LaAAL* în soluțiile tampon de diferite pH-uri (în toate cazurile deviațiile standard ale măsurătorilor efectuate în duplicat au fost  $< 0,4$  °C).

*LaAAL*, exprimat și purificat recombinat, a prezentat o activitate optimă pentru reacția de eliminare a amoniacului din **2ad** la pH 9,5 (**Figura 14A**). Acest pH optim este comparabil cu cel al unor TAL-uri recent identificate<sup>67,68</sup> fiind mai ridicat decât pH-ul optim al unor PAL-uri provenite din plante<sup>48,52,69</sup> și bacterii<sup>70</sup>, dar mai mic decât pH-ul optim al PAL-ului provenit din bacterii termofile, ca *RxPAL*<sup>35</sup>. În plus, *LaAAL* își menține împachetarea proteică și stabilitatea termică pe o gamă largă de pH-uri (6,5–11,0), cu denaturarea semnificativă și activitatea redusă apărând doar la valori ale pH-ului mai mari de 11,5. (**Figura 14B**).

#### 4.1.3. Efectul sursei de amoniac

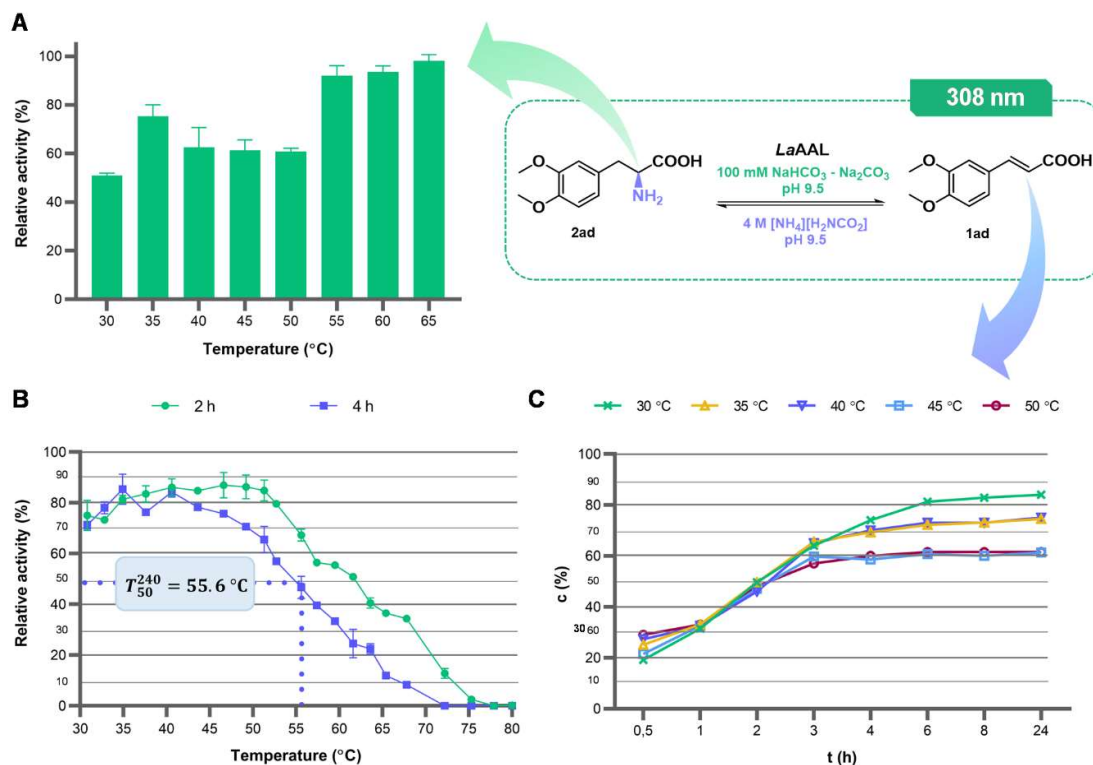
*LaAAL* prezintă activitate optimă în adăugarea de amoniac la acidul 3,4-dimetoxi *trans*-cinamic (**1ad**) la pH 9,0 în soluție de 4 M  $\text{NH}_4\text{OH}$ , cu o scădere semnificativă a activității la valori mai mari ale pH-ului, în special peste pH 10,0 (**Figura 15A**). Pe de altă parte, *LaAAL* demonstrează o stabilitate superioară și o activitate mărită în soluția de 4 M carbamat de amoniu la pH 9,5 comparativ cu soluția de 4 M  $\text{NH}_4\text{OH}$ .



**Figura 15.** Determinarea pH-ului optim pentru reacția de adiție a amoniacului mediată de *LaAAL* din **1ad**: **(A)** Activitățile inițiale relative pentru reacțiile de adiție a amoniacului realizate în soluții de hidroxid de amoniu 4 M la diferite pH-uri și carbamat de amoniu la pH-ul neajustat (~9,5) și la pH 9,0. **(B)** Temperatura de topire ( $T_m$ ) a *LaAAL* în soluții tampon de amoniu la diferite pH-uri. **(C)** Profilurile de degradare termică ale *LaAAL* și *PcPAL* în soluții de carbamat de amoniu 1 M – 4 M pH neajustat (~9,5), comparativ cu cele înregistrate în soluția tampon 20 mM Tris.HCl, pH 8,5. **(D)** Variația temperaturii de topire ( $T_m$ ) a *LaAAL* și *PcPAL* în soluții tampon de carbamat de amoniu (1 M–4 M) și soluție tampon Tris,HCl pH 8,5. Toate deviațiile standard pentru valorile  $T_m$  determinate în duplicate au fost < 0.3 °C.

#### 4.1.4. Efectul temperaturii asupra activității *LaAAL*

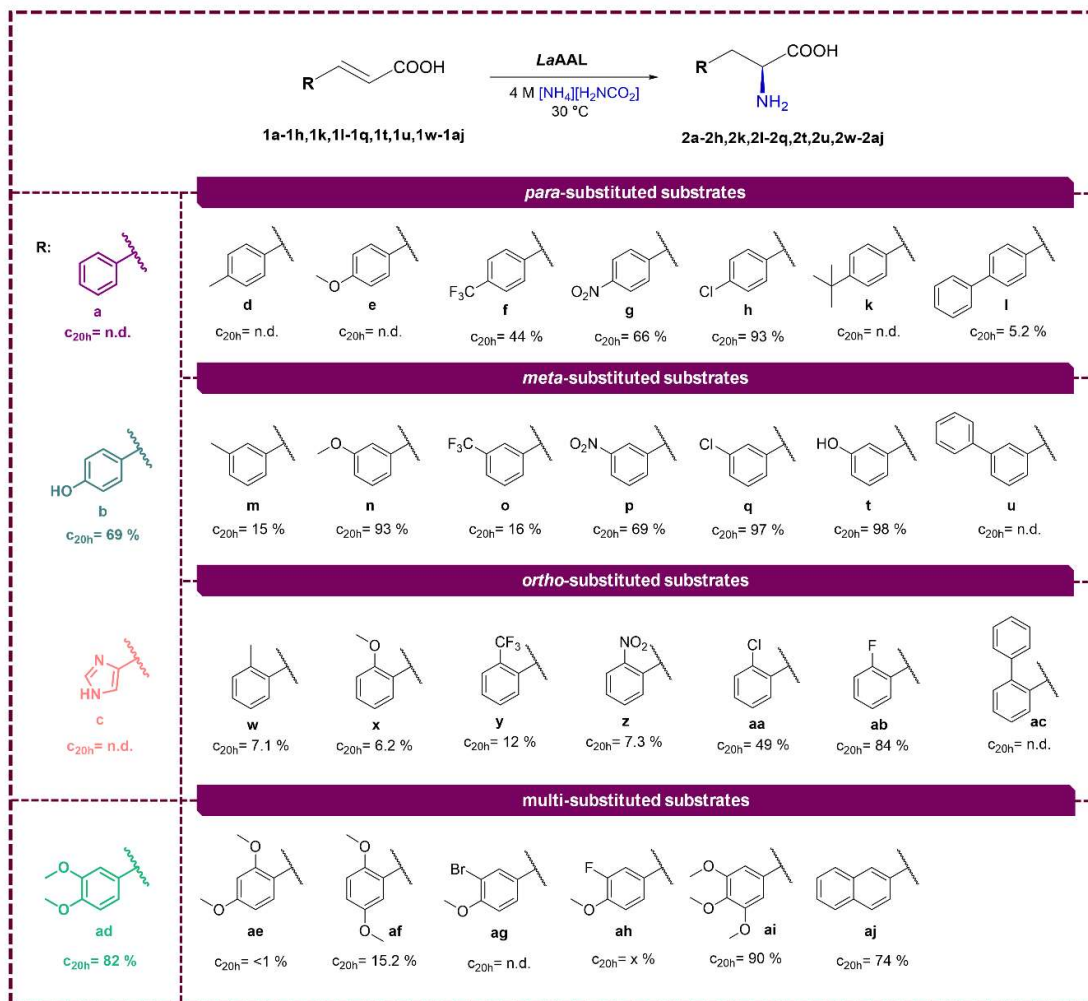
Evaluarea termostabilității și activității *LaAAL* a relevat faptul că, deși activitatea enzimei crește odată cu temperatura până la 65°C, în reacția de eliminare a amoniacului (**Figura 16A**), stabilitatea sa operațională este crucială pentru aplicații sintetice de lungă durată, în special atunci când vizează reacția inversă, de adiție a amoniacului. *LaAAL* menține aproximativ 80% din activitatea sa inițială după 4 ore de incubație în 4 M carbamat de amoniu, la temperaturi sub 45°, cu o  $T_{50}^{240 \text{ min}}$  de 55.6°C (**Figura 16B**). Cu toate acestea, temperaturile mai ridicate conduc la o pierdere rapidă a activității, astfel încât 30°C a fost determinată temperatura optimă pentru obținerea unor conversii ridicate în reacțiile de adiție a amoniacului (**Figura 16C**). Aceasta sugerează că, deși *LaAAL* este mai activ la temperaturi ușor mai ridicate, 30°C oferă cel mai bun echilibru între stabilitatea și eficiența enzimatică, pentru aplicațiile sintetice.



**Figura 16.** Efectul temperaturii asupra activității și stabilității operaționale a *LaAAL*: **(A)** activitățile relative pentru eliminarea amoniacului din 3,4-dimetoxi-L-Phe (**2ad**) realizate la diferite temperaturi fără perioadă prealabilă de incubare; **(B)** activitatea reziduală a *LaAAL* după 2 h– și 4 h–perioadă de incubare în 4 M carbamat de amoniu la diferite temperaturi, variind între 30-80 °C; **(C)** profilurile de conversie în timp ale reacțiilor de adiție a amoniacului mediate de *LaAAL* pentru **1ad**, realizate la temperaturi de 30, 35, 40, 45, 50 °C în 4 M carbamat de amoniu.

#### 4.1.5. Domeniul de substrat al *LaAAL* în reacția de adiție de amoniac

Versatilitatea catalitică a *LaAAL*, în reacția de adiție a amoniacului, prezintă o variabilitate semnificativă în funcție de natura și poziția substituenților pe inelul aromatic al acidului cinamic. În general, substraturile cu grupări donoare de electroni, în special în poziția *para*, prezintă conversii mai scăzute, indicând că astfel de substituenți afectează negativ eficiența catalitică a enzimei. Pe de altă parte, substraturile cu grupări atrăgătoare de electroni tind să prezintă conversii mai mari, în special atunci când există multipli-substituenți, deși nu s-a observat o corelație clară între efectele electronice ale substituenților și eficiența catalitică (**Figura 17**). Efectele sterice ale substituenților au fost analizate pentru unele substraturi, anumiți acizi cinamici *orto*- și *meta*-substituiți, arătând interacțiuni favorabile în cadrul situsului activ, conducând astfel la conversii mai mari. Cu toate acestea, influența proprietăților electronice rămâne mai puțin înțeleasă, evidențiind necesitatea abordării modelării moleculare avansate pentru a elucida pe deplin mecanismele care stau la baza acestor reacții.



**Figura 17.** Colecția de substraturi evaluată în cadrul reacției de adiție a amoniacului catalizată de *LaAAL*.

Datele cinetice sugerează că reacția de eliminare a amoniacului este cea favorizată de *LaAAL*, prezentând constante catalitice și de specificitate mai mari comparativ cu reacția de adiție de amoniac, așa cum s-a observat pentru acidul 3,4-dimetoxicinamic (**1ad**) (**Tabel 1**). Această preferință se aliniază cu observațiile făcute la alte amoniac-liaze aromatice (AAL-uri), complicând și mai mult eforturile de a defini substratul natural al *LaAAL*.

**Tabel 1.** Parametrii cinetici ai enzimei obținuți în reacția de eliminare a amoniacului catalizată de *LaAAL*.

Substrate	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (s <sup>-1</sup> × mM <sup>-1</sup> )
L-Phe <b>2a</b>	5.88 ± 0.55	0.51 ± 0.01	0.09
L- <i>m</i> -Tyr <b>2t</b>	0.29 ± 0.03	0.63 ± 0.01	2.14
3-MeO-L-Phe <b>2n</b>	0.27 ± 0.03	1.72 ± 0.04	6.42
3,4-MeO- <i>t</i> -CA <b>1ad</b>	4.75 ± 0.80	0.81 ± 0.09	0.17
3,4-MeO-L-Phe <b>2ad</b>	1.11 ± 0.08	1.14 ± 0.03	1.02
3,4,5-MeO-L-Phe <b>2ai</b>	2.59 ± 0.22	0.77 ± 0.01	0.30
3-F-,4-MeO-L-Phe <b>2ah</b>	6.26 ± 0.78	0.14 ± 0.02	0.02
L-2-naphthylalanine <b>2aj</b>	-	-	6.43
L-Tyr <b>2b</b>	-	-	3.62

Printre substraturile testate, *LaAAL* a demonstrat cea mai mare specificitate pentru 3-methoxy-L-phenylalanine (**2n**) și L-2-naftilalanina (**2aj**), cu constante de specificitate ( $k_{cat}/K_M$ ) mult

mai mari decât pentru substraturi precum L-phenylalanine. În mod specific, *LaAAL* prezintă o specificitate mai mare pentru L-Tyr comparativ cu L-Phe și demonstrează o activitate semnificativă în reacțiile de adiție de amoniac cu acidul *p*-cumaric, fiind inactivă față de acidul *trans*-cinnamic și L-His.

#### 4.1.6. Clasificarea *LaAAL*

Caracterizarea specificității de substrat a *LaAAL*, împreună cu datele cinetice, sugerează că *LaAAL* este probabil să facă parte din subclasa enzimelor TAL (E.C. 4.3.1.23) a amoniac-liazelor aromatice. Totuși, gama unică de substraturi și amprenta sa catalitică, în special specificitatea sa ridicată pentru substraturi *meta*-substituite, indică faptul că această enzimă ar fi putut evolua pentru a acomoda substraturi dincolo de cele tipic catalizate de TAL-urile cunoscute.

Resturile distincte ale situsului catalitic și versatilitatea catalitică sugerează că *LaAAL*, alături de noile AAL-uri omoloage, cu amprente catalitice diverse (**Tabelul 2**), ar putea reprezenta o ramură evolutivă distinctă a amoniac-liazelor cu funcționalități noi.

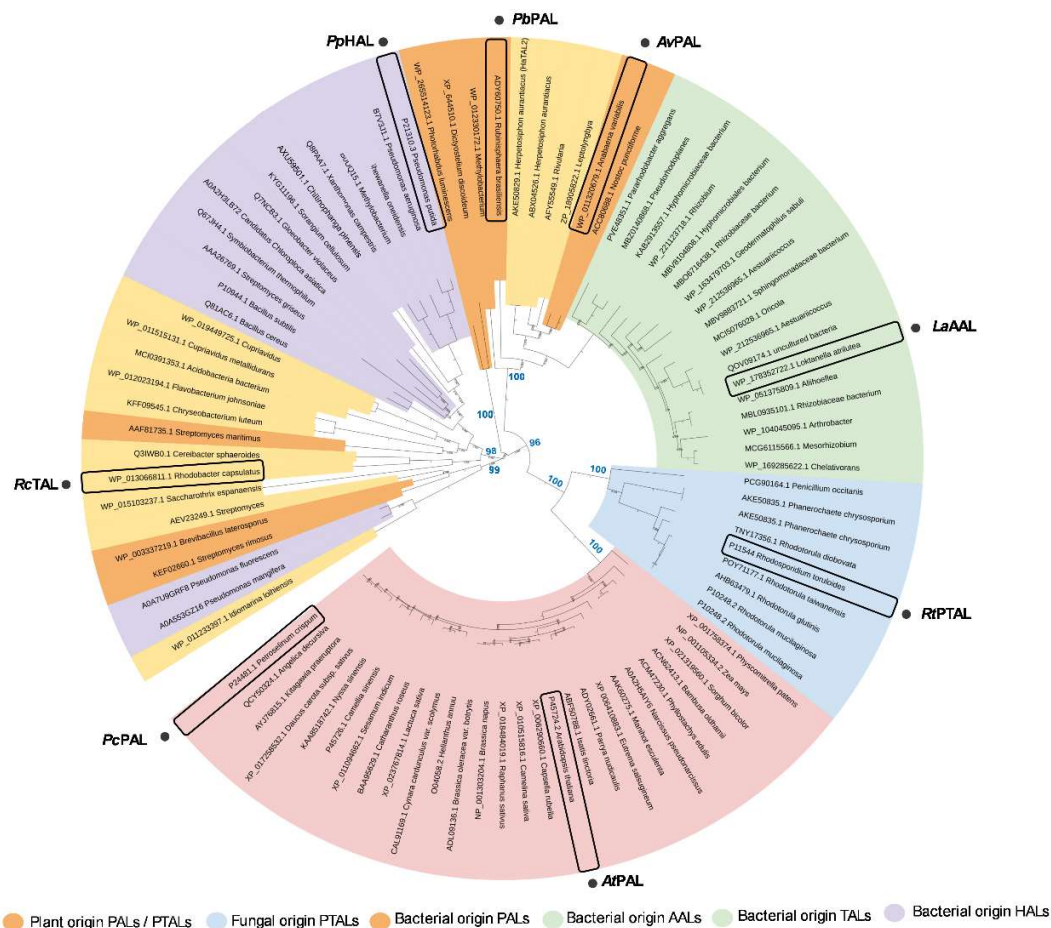
**Tabel 1.** Alinierea secvențelor multiple ale resturilor situsului catalitic al *LaAAL* cu AAL-uri omoloage relevă resturile conservate evidențiate cu caractere îngroșate, în timp ce amprentele catalitice distincte sunt evidențiate cu diverse culori. Resturile implicate în formarea MIO sunt marcate cu un fundal roz, iar cele distincte în regiunea hidrofobă sunt marcate în gri. Microorganismele din filul *Proteobacteria* sunt indicate cu verde, iar cele din filul *Actinobacteria* sunt evidențiate cu galben.

NCBI acces ID	Origin	Identity (%)	55	61	85	144	148	195	199	288	291	294	324	395	400	425	429
<i>LaAAL</i>																	
WP_178352722	<i>Loktanella atrilutea</i>	100	.Y.	.ALWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLHI.	.EMYNQ.							
QOV09174.1	uncultured bacterium	97.45	.Y.	.ALWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYGLR.	.N.	.KSLHI.	.EMYNQ.							
WP_2125368965	<i>Thetidibacter halocola</i>	85.40	.Y.	.ALWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYGLR.	.N.	.KSLHI.	.EMYNQ.							
WP_163478703	<i>Geodermatophilus sabuiti</i>	60.59	.Y.	.ALWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLQI.	.EMYNQ.							
MBL0635101	Rhizobiaceae	67.81	.Y.	.AVWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLQI.	.EQPNQ.							
WP_051375809	<i>Aliiacefeus</i> sp. 2MMV	67.85	.Y.	.AVWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLQI.	.EQPNQ.							
WP_311507819	<i>Novosphingobium</i> sp. MMS21-SN21R	65.25	.Y.	.ALWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLQI.	.EQPNQ.							
HXF88911	Steroidobacteraceae	64.27	.Y.	.ALWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLQL.	.EQPNQ.							
MCI5076028	<i>Orcelia</i>	73.08	.Y.	.ALWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLHV.	.EMYNQ.							
MCC6858434	<i>Salaquimonas</i>	70.44	.Y.	.ALWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYGLR.	.N.	.KSLHV.	.EMYNQ.							
WP_185801870	<i>Parasphingopyxis</i> sp. GpM-1f	60.07	.Y.	.ALWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLQV.	.EQPNQ.							
FZN81218	<i>Pseudomonadota</i>	63.12	.Y.	.AVWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLQV.	.EQPNQ.							
MBD6710438	Rhizobiaceae	64.58	.Y.	.AMWHH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLQI.	.EQPNQ.							
MCG8115566	<i>Mesorhizobium</i>	65.95	.Y.	.AMWHH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLQI.	.EQPNQ.							
WP_169285822	Chelativorans sp. ZM759	65.75	.Y.	.AMWHH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLQI.	.EQPNQ.							
MCB1344270	Paracoccaceae	61.02	.Y.	.ALWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLQL.	.EQPNQ.							
WP_068297293	<i>Pararhodobacter</i>	56.41	.Y.	.ALWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLQL.	.EQPNQ.							
WP_225294305	<i>Cereobacter sphaeroides</i>	56.04	.Y.	.ALWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLQL.	.EQPNQ.							
PVE48351	<i>Pararhodobacter aggregans</i>	56.00	.Y.	.ALWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLQL.	.EQPNQ.							
MBV9883721	Sphingomonadaceae	66.30	.Y.	.ALWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLQL.	.EQPNQ.							
WP_104045095	<i>Arthrobacter</i> sp. ZGTC41	61.70	.Y.	.ALWTH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYGLR.	.N.	.KSLQV.	.EQPNQ.							
MBV8104808	<i>Hyphomicrobiales</i>	64.29	.Y.	.SLWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLQI.	.EQPNQ.							
KAB2913557	<i>Hyphomicrobiales</i>	62.73	.Y.	.SLWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLQL.	.EQPNQ.							
MD20140868	<i>Pseudorhodospirans</i>	62.55	.Y.	.SLWQH.	.ASGDL.	.LALN.	.QDRYSLR.	.N.	.KSLQL.	.EQPNQ.							

Aceste caracteristici, împreună cu distribuția AAL-urilor în bacterii din medii marine și simbiotice, sugerează un rol specializat pentru *LaAAL* și enzimele înrudite, potențial contribuind la căi metabolice unice și oferind noi perspective asupra biocatalizei și evoluției enzimelor. În mod



notabil, AAL-urile de origine bacteriană se grupează în aceeași ramură cu PAL-urile de origine bacteriană. Această grupare indică o relație evolutivă mai strânsă cu PAL-urile cianobacteriene, în special AvPAL și NpPAL, ceea ce sugerează că aceste AAL-uri au evoluat cel mai probabil din PAL-urile bacteriene decât din TAL-urile de origine bacteriană, cum ar fi RcTAL, al cărei ramură este distanțată (Figura 18). Cu toate acestea, sunt necesare studii suplimentare, inclusiv deleție de gene și profilare metabolică, pentru a înțelege pe deplin substratul natural și rolul biologic al LaAAL.



**Figura 18.** Dendrogramă pentru analiza filogenetică a diferiților reprezentanți ale PAL-urilor, PTAL-urilor, TAL-urilor, HAL-urilor și AAL-urilor. Valorile bootstrap pentru ramurile principale sunt colorate în albastru și au fost mărite pentru claritate.

#### 4.2. Concluzii

În acest studiu, domeniul de substrat și potențialul biocatalitic al amoniac-liazei aromatice din *Loktanella atrilutea* (LaAAL) au fost caracterizate. Enzima a demonstrat o activitate redusă față de substraturile canonice ale amoniac-liazelor aromatice, cum ar fi L-Phe, L-Tyr și L-His, în timp ce a arătat o eficiență semnificativă față de 3,4-dimetoxi-L-fenilalanina. Utilizând acidul 3,4-dimetoxi *trans*-cinamic ca substrat model, LaAAL a prezentat o activitate optimă la un

pH mai ridicat, de 9,5, în soluție de carbamat de amoniu 4 M. Pe baza valorilor de conversie și a stabilității operaționale a *LaAAL* pe parcursul mai multor ore de reacție, 30 °C a fost identificată ca temperatura optimă pentru reacție. Analiza domeniului de substrat a evidențiat adaptabilitatea catalitică a *LaAAL* în hidroaminarea diverșilor acizi cinamici, în special pentru analogii mono-, di- și multi-substituiți în poziția *meta*, modelarea structurală dezvăluind coliziuni sterice între substraturile *orto*-substituite și resturile situsului catalitic. Datele cinetice au relevat o predilecție a *LaAAL* pentru eliminarea amoniacului, susținând clasificarea sa ca o tirozină amoniac-liază (TAL, E.C. 4.3.1.23) în cadrul familiei existente de amoniac-liaze aromatice. Cu toate acestea, analiza filogenetică sugerează că *LaAAL* a evoluat din PAL-uri bacteriene, iar specificitatea sa de substrat și contextul genomic indică un rol funcțional nou, potențial extinzând diversitatea cunoscută a AAL-urilor.

## 5. CONCLUZII GENERALE

Această teză aduce contribuții semnificative în domeniul fenilalanină amoniac-liazelor (PAL-uri) prin dezvoltarea unui set de instrumente de inginerie proteică, care include atât tehnici de proiectare rațională, cât și de mutagenză de saturație, împreună cu metode de scanare de înaltă performanță a colecțiilor mutante PAL. Rezultatele obținute includ totodată și identificarea de noi omologi PAL cu activitate îmbunătățită față de substraturi dificile pentru PAL-urile native, evidențiind potențialul acestora pentru aplicații biocatalitice care depășesc reacțiile canonice ale enzimelor din familia MIO.

Una dintre realizările majore a fost dezvoltarea unor metode de scanare de înaltă performanță, inclusiv un test UV în fază lichidă, vizând reacția de eliminare a amoniacului și o metodă care cuplează PAL cu AncLAAO, în fază solidă, orientată către reacția de adiție a amoniacului. Ambele metode s-au dovedit eficiente în identificarea mutațiilor PAL cu activitate îmbunătățită față de substraturile model utilizate. Existența acestor metode de scanare a fost esențială pentru explorarea și optimizarea activității PAL-urilor față de substraturilor dificile di-substituite, cum ar fi 3-bromo-4-metoxi-L-fenilalanina și 3,4-dimetoxi-L-fenilalanina.

Eforturile de inginerie proteică, utilizând atât mutagenza de saturație, cât și proiectarea rațională au revelat mutații specifice în PAL-urile din *Petroselinum crispum* (*PcPAL*), *Arabidopsis thaliana* (*AtPAL*) și *Anabaena variabilis* (*AvPAL*), care au sporit activitatea acestora pentru cele două substraturi di-substituite, deși cu anumite limitări. PAL-urile modificate au demonstrat o eficiență catalitică îmbunătățită, dar totuși moderată, sugerând că modelul de substituție al resturilor cheie din situsul activ al PAL-urilor este puternic constrâns.

Identificarea și caracterizarea amoniac-liazei aromatice din *Loktanella atrilutea* (*LaAAL*) au relevat potențialul său biocatalitic unic, în special pentru substraturi cu grupări donatoare de electroni, precum 3,4-dimetoxi-L-fenilalanina și acidul *trans*-3,4-dimetoxicinamic, *LaAAL* depășind PAL-urile mutante în reacția de adiție a amoniacului la acidul 3,4-dimetoxicinamic, reacție valoroasă din punct de vedere sintetic.

Deși caracteristicile sale funcționale sugerează că *LaAAL* ar putea aparține subclasei TAL-urilor, analiza filogenetică a plasat *LaAAL* și omologii săi mai aproape de PAL-urile bacteriene, sugerând o legătură evolutivă cu PAL-urile cianobacteriene, mai degrabă decât cu TAL-uri. Atributele distincte ale *LaAAL*, inclusiv domeniul larg de substrat, contextul genomic și omologii săi diverși, indică un potențial pentru descoperirea unor AAL-uri noi, cu funcții dincolo de clasificările actuale.

În concluzie, această cercetare avansează înțelegerea PAL-urilor și a AAL-urilor înrudite, oferind noi instrumente pentru ingineria proteinelor și deschizând calea pentru descoperirea unor noi biocatalizatori cu capacități îmbunătățite. Lucrarea evidențiază atât posibilitățile, cât și limitările abordărilor actuale de inginerie, pregătind terenul pentru inovații viitoare în acest domeniu.

## BIBLIOGRAFIE

- (1) Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press: New York, 1998.
- (2) Siedentop, R.; Rosenthal, K. Industrially Relevant Enzyme Cascades for Drug Synthesis and Their Ecological Assessment. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (7), 3605. <https://doi.org/10.3390/ijms23073605>.
- (3) Cooke, H. A.; Christianson, C. V.; Bruner, S. D. Structure and Chemistry of 4-Methylideneimidazole-5-One Containing Enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13* (4), 460–468. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.06.013>.
- (4) Schwede, T. F.; Rétey, J.; Schulz, G. E. Crystal Structure of Histidine Ammonia-Lyase Revealing a Novel Polypeptide Modification as the Catalytic Electrophile. *Biochemistry* **1999**, *38* (17), 5355–5361. <https://doi.org/10.1021/bi982929q>.
- (5) Watts, K. T.; Mijts, B. N.; Lee, P. C.; Manning, A. J.; Schmidt-Dannert, C. Discovery of a Substrate Selectivity Switch in Tyrosine Ammonia-Lyase, a Member of the Aromatic Amino Acid Lyase Family. *Chem. Biol.* **2006**, *13* (12), 1317–1326. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.10.008>.
- (6) MacDonald, M. J.; D’Cunha, G. B. A Modern View of Phenylalanine Ammonia Lyase. *Biochem. Cell Biol.* **2007**, *85* (3), 273–282. <https://doi.org/10.1139/O07-018>.
- (7) Louie, G. V.; Bowman, M. E.; Moffitt, M. C.; Baiga, T. J.; Moore, B. S.; Noel, J. P. Structural Determinants and Modulation of Substrate Specificity in Phenylalanine-Tyrosine Ammonia-Lyases. *Chem. Biol.* **2006**, *13* (12), 1327–1338. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.11.011>.



- (8) Parmeggiani, F.; Weise, N. J.; Ahmed, S. T.; Turner, N. J. Synthetic and Therapeutic Applications of Ammonia-Lyases and Aminomutases. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (1), 73–118. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00824>.
- (9) Poppe, L.; Retey, J. Properties and Synthetic Applications of Ammonia-Lyases. *Curr. Org. Chem.* **2003**, *7* (13), 1297–1315. <https://doi.org/10.2174/1385272033486440>.
- (10) Cui, J. D.; Qiu, J. Q.; Fan, X. W.; Jia, S. R.; Tan, Z. L. Biotechnological Production and Applications of Microbial Phenylalanine Ammonia Lyase: A Recent Review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2014**, *34* (3), 258–268. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.791660>.
- (11) Paizs, C.; Katona, A.; Rétey, J. The Interaction of Heteroaryl-Acrylates and Alanines with Phenylalanine Ammonia-Lyase from Parsley. *Chem. - Eur. J.* **2006**, *12* (10), 2739–2744. <https://doi.org/10.1002/chem.200501034>.
- (12) Bartha-Vári, J. H.; Toşa, M. I.; Irimie, F.-D.; Weiser, D.; Boros, Z.; Vértessy, B. G.; Paizs, C.; Poppe, L. Immobilization of Phenylalanine Ammonia-Lyase on Single-Walled Carbon Nanotubes for Stereoselective Biotransformations in Batch and Continuous-Flow Modes. *ChemCatChem* **2015**, *7* (7), 1122–1128. <https://doi.org/10.1002/cctc.201402894>.
- (13) Blaskovich, M. A. T. Unusual Amino Acids in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (24), 10807–10836. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00319>.
- (14) Levy, H. L.; Sarkissian, C. N.; Scriver, C. R. Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL): From Discovery to Enzyme Substitution Therapy for Phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* **2018**, *124* (4), 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.06.002>.
- (15) Mays, Z. J.; Mohan, K.; Trivedi, V. D.; Chappell, T. C.; Nair, N. U. Directed Evolution of *Anabaena Variabilis* Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) Identifies Mutants with Enhanced Activities. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (39), 5255–5258. <https://doi.org/10.1039/D0CC00783H>.
- (16) Devine, P. N.; Howard, R. M.; Kumar, R.; Thompson, M. P.; Truppo, M. D.; Turner, N. J. Extending the Application of Biocatalysis to Meet the Challenges of Drug Development. *Nat. Rev. Chem.* **2018**, *2* (12), 409–421. <https://doi.org/10.1038/s41570-018-0055-1>.
- (17) Narancic, T.; Almahboub, S. A.; O'Connor, K. E. Unnatural Amino Acids: Production and Biotechnological Potential. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *35* (4), 67. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2642-9>.
- (18) Stevenazzi, A.; Marchini, M.; Sandrone, G.; Vergani, B.; Lattanzio, M. Amino Acidic Scaffolds Bearing Unnatural Side Chains: An Old Idea Generates New and Versatile Tools for the Life Sciences. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (23), 5349–5356. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.10.016>.
- (19) Xue, Y.-P.; Cao, C.-H.; Zheng, Y.-G. Enzymatic Asymmetric Synthesis of Chiral Amino Acids. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (4), 1516–1561. <https://doi.org/10.1039/C7CS00253J>.
- (20) Latacz, G.; Pekala, E.; Ciopińska, A.; Kieć-Kononowicz, K. Unnatural D-Amino Acids as Building Blocks of New Peptidomimetics. *Acta Pol. Pharm.* **2006**, *63* (5), 430–433.
- (21) 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. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2016**, *69* (10), 765–768. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.2>.
- (22) Prior, A. M.; Kim, Y.; Weerasekara, S.; Moroze, M.; Alliston, K. R.; Uy, R. A. Z.; Groutas, W. C.; Chang, K.-O.; Hua, D. H. Design, Synthesis, and Bioevaluation of Viral 3C and 3C-like

- Protease Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (23), 6317–6320. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.09.070>.
- (23) Papst, S.; Noisier, A. F. M.; Brimble, M. A.; Yang, Y.; Krissansen, G. W. Synthesis and Biological Evaluation of Tyrosine Modified Analogues of the A4 $\beta$ 7 Integrin Inhibitor Biotin-R8ERY. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (17), 5139–5149. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.07.010>.
- (24) Turner, N. J. Ammonia Lyases and Aminomutases as Biocatalysts for the Synthesis of  $\alpha$ -Amino and  $\beta$ -Amino Acids. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15* (2), 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.009>.
- (25) Tork, S. D.; Nagy, E. Z. A.; Tomoiagă, R. B.; Bencze, L. C. Engineered, Scalable Production of Optically Pure L -Phenylalanines Using Phenylalanine Ammonia-Lyase from *Arabidopsis Thaliana*. *J. Org. Chem.* **2023**, *88* (2), 852–862. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c02106>.
- (26) Heberling, M. M.; Wu, B.; Bartsch, S.; Janssen, D. B. Priming Ammonia Lyases and Aminomutases for Industrial and Therapeutic Applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17* (2), 250–260. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.02.013>.
- (27) Raes, J.; Rohde, A.; Christensen, J. H.; Van De Peer, Y.; Boerjan, W. Genome-Wide Characterization of the Lignification Toolbox in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2003**, *133* (3), 1051–1071. <https://doi.org/10.1104/pp.103.026484>.
- (28) Ritter, H.; Schulz, G. E. Structural Basis for the Entrance into the Phenylpropanoid Metabolism Catalyzed by Phenylalanine Ammonia-Lyase. *Plant Cell* **2004**, *16* (12), 3426–3436. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.025288>.
- (29) Rosler, J.; Krekel, F.; Amrhein, N.; Schmid, J. Maize Phenylalanine Ammonia-Lyase Has Tyrosine Ammonia-Lyase Activity. *Plant Physiol.* **1997**, *113* (1), 175–179. <https://doi.org/10.1104/pp.113.1.175>.
- (30) Hyun, M. W.; Yun, Y. H.; Kim, J. Y.; Kim, S. H. Fungal and Plant Phenylalanine Ammonia-Lyase. *Mycobiology* **2011**, *39* (4), 257–265. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2011.39.4.257>.
- (31) D’Cunha, G. B.; Satyanarayan, V.; Madhusudanan Nair, P. Purification of Phenylalanine Ammonia Lyase from *Rhodotorula Glutinis*. *Phytochemistry* **1996**, *42* (1), 17–20. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00914-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00914-0).
- (32) Varga, A.; Csuka, P.; Sonesouphap, O.; Bánóczy, G.; Toşa, M. I.; Katona, G.; Molnár, Z.; Bencze, L. C.; Poppe, L.; Paizs, C. A Novel Phenylalanine Ammonia-Lyase from *Pseudozyma Antarctica* for Stereoselective Biotransformations of Unnatural Amino Acids. *Catal. Today* **2021**, *366*, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.04.002>.
- (33) Moffitt, M. C.; Louie, G. V.; Bowman, M. E.; Pence, J.; Noel, J. P.; Moore, B. S. Discovery of Two Cyanobacterial Phenylalanine Ammonia Lyases: Kinetic and Structural Characterization. *Biochemistry* **2007**, *46* (4), 1004–1012. <https://doi.org/10.1021/bi061774g>.
- (34) Williams, J. S.; Thomas, M.; Clarke, D. J. The Gene *stlA* Encodes a Phenylalanine Ammonia-Lyase That Is Involved in the Production of a Stilbene Antibiotic in *Photobacterium luminescens* TT01. *Microbiology* **2005**, *151* (8), 2543–2550. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28136-0>.
- (35) Kovács, K.; Bánóczy, G.; Varga, A.; Szabó, I.; Holczinger, A.; Hornyánszky, G.; Zagyva, I.; Paizs, C.; Vértessy, B. G.; Poppe, L. Expression and Properties of the Highly Alkalophilic Phenylalanine Ammonia-Lyase of Thermophilic *Rubrobacter Xylanophilus*. *PLoS ONE* **2014**, *9* (1), e85943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085943>.

- (36) De Vries, J.; De Vries, S.; Slamovits, C. H.; Rose, L. E.; Archibald, J. M. How Embryophytic Is the Biosynthesis of Phenylpropanoids and Their Derivatives in Streptophyte Algae? *Plant Cell Physiol.* **2017**, *58* (5), 934–945. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx037>.
- (37) Weise, N. J.; Ahmed, S. T.; Parmeggiani, F.; Galman, J. L.; Dunstan, M. S.; Charnock, S. J.; Leys, D.; Turner, N. J. Zymophore Identification Enables the Discovery of Novel Phenylalanine Ammonia Lyase Enzymes. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 13691. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13990-0>.
- (38) Nagy, E. Z. A.; Tork, S. D.; Lang, P. A.; Filip, A.; Irimie, F. D.; Poppe, L.; Toşa, M. I.; Schofield, C. J.; Brem, J.; Paizs, C.; Bencze, L. C. Mapping the Hydrophobic Substrate Binding Site of Phenylalanine Ammonia-Lyase from *Petroselinum Crispum*. *ACS Catal.* **2019**, *9* (9), 8825–8834. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b02108>.
- (39) Bartsch, S.; Bornscheuer, U. T. Mutational Analysis of Phenylalanine Ammonia Lyase to Improve Reactions Rates for Various Substrates. *Protein Eng. Des. Sel.* **2010**, *23* (12), 929–933. <https://doi.org/10.1093/protein/gzq089>.
- (40) 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* (12), 2627–2633. <https://doi.org/10.1002/cctc.201800258>.
- (41) Dreßen, A.; Hilberath, T.; Mackfeld, U.; Billmeier, A.; Rudat, J.; Pohl, M. Phenylalanine Ammonia Lyase from Arabidopsis Thaliana ( At PAL2): A Potent MIO-Enzyme for the Synthesis of Non-Canonical Aromatic Alpha-Amino Acids. *J. Biotechnol.* **2017**, *258*, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.005>.
- (42) Tork, S. D.; Moisă, M. E.; Cserepes, L.; Filip, A.; Nagy, L. C.; Irimie, F. D.; Bencze, L. C. Towards a General Approach for Tailoring the Hydrophobic Binding Site of Phenylalanine Ammonia-Lyases. *Sci. Rep.* **2022**, *12* (1), 10606. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14585-0>.
- (43) Xue, F.; Liu, Z.; Yu, Y.; Wu, Y.; Jin, Y.; Yang, M.; Ma, L. Codon-Optimized Rhodotorula Glutinis PAL Expressed in Escherichia Coli With Enhanced Activities. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *8*, 610506. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.610506>.
- (44) Calabrese, J. C.; Jordan, D. B.; Boodhoo, A.; Sariaslani, S.; Vannelli, T. Crystal Structure of Phenylalanine Ammonia Lyase: Multiple Helix Dipoles Implicated in Catalysis . *Biochemistry* **2004**, *43* (36), 11403–11416. <https://doi.org/10.1021/bi049053+>.
- (45) 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.* **2015**, *127* (15), 4691–4694. <https://doi.org/10.1002/ange.201410670>.
- (46) Jun, S.-Y.; Sattler, S. A.; Cortez, G. S.; Vermerris, W.; Sattler, S. E.; Kang, C. Biochemical and Structural Analysis of Substrate Specificity of a Phenylalanine Ammonia-Lyase. *Plant Physiol.* **2018**, *176* (2), 1452–1468. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01608>.
- (47) Reichert, A. I.; He, X.-Z.; Dixon, R. A. Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) from Tobacco ( *Nicotiana Tabacum* ): Characterization of the Four Tobacco PAL Genes and Active Heterotetrameric Enzymes. *Biochem. J.* **2009**, *424* (2), 233–242. <https://doi.org/10.1042/BJ20090620>.
- (48) Appert, C.; Logemann, E.; Hahlbrock, K.; Schmid, J.; Amrhein, N. Structural and Catalytic Properties of the Four Phenylalanine Ammonia-Lyase Isoenzymes from Parsley (

- Petroselinum Crispum* Nym.). *Eur. J. Biochem.* **1994**, 225 (1), 491–499. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00491.x>.
- (49) Pilbák, S.; Tomin, A.; Rétey, J.; Poppe, L. The Essential Tyrosine-containing Loop Conformation and the Role of the C-terminal Multi-helix Region in Eukaryotic Phenylalanine Ammonia-lyases. *FEBS J.* **2006**, 273 (5), 1004–1019. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05127.x>.
- (50) Baedeker, M.; Schulz, G. E. Structures of Two Histidine Ammonia-lyase Modifications and Implications for the Catalytic Mechanism. *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269 (6), 1790–1797. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2002.02827.x>.
- (51) Lovelock, S. L.; Turner, N. J. Bacterial *Anabaena Variabilis* Phenylalanine Ammonia Lyase: A Biocatalyst with Broad Substrate Specificity. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22 (20), 5555–5557. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.06.035>.
- (52) Zhu, B.-F.; Liu, Y.; Pei, X.-Q.; Wu, Z.-L. Characterization of Phenylalanine Ammonia Lyases from Lettuce (*Lactuca Sativa* L.) as Robust Biocatalysts for the Production of D - and L - Amino Acids. *J. Agric. Food Chem.* **2023**, 71 (6), 2935–2942. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c07890>.
- (53) Bencze, L. C.; Filip, A.; Bánóczy, 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. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15 (17), 3717–3727. <https://doi.org/10.1039/C7OB00562H>.
- (54) Tork, S. D.; Nagy, E. Z. A.; Cserepes, L.; Bordea, D. M.; Nagy, B.; Toşa, M. I.; Paizs, C.; Bencze, L. C. The Production of L- and d-Phenylalanines Using Engineered Phenylalanine Ammonia Lyases from *Petroselinum Crispum*. *Sci. Rep.* **2019**, 9 (1), 20123. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56554-0>.
- (55) 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 (4), 3129–3132. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b00496>.
- (56) Ahmed, S. T.; Parmeggiani, F.; Weise, N. J.; Flitsch, S. L.; Turner, N. J. Chemoenzymatic Synthesis of Optically Pure L - and D -Biarylalanines through Biocatalytic Asymmetric Amination and Palladium-Catalyzed Arylation. *ACS Catal.* **2015**, 5 (9), 5410–5413. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b01132>.
- (57) Nakano, S.; Minamino, Y.; Hasebe, F.; Ito, S. Deracemization and Stereoconversion to Aromatic D -Amino Acid Derivatives with Ancestral L -Amino Acid Oxidase. *ACS Catal.* **2019**, 9 (11), 10152–10158. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b03418>.
- (58) Min, K.; Park, K.; Park, D.-H.; Yoo, Y. J. Overview on the Biotechnological Production of L-DOPA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, 99 (2), 575–584. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6215-4>.
- (59) Stolze, S. C.; Meltzer, M.; Ehrmann, M.; Kaiser, M. Development of a Solid-Phase Approach to the Natural Product Class of Ahp-Containing Cyclodepsipeptides. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2012 (8), 1616–1625. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201101757>.
- (60) Reetz, M. T.; Bocola, M.; Carballeira, J. D.; Zha, D.; Vogel, A. Expanding the Range of Substrate Acceptance of Enzymes: Combinatorial Active-Site Saturation Test. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44 (27), 4192–4196. <https://doi.org/10.1002/anie.200500767>.

- (61) Reetz, M. T.; Carballeira, J. D. Iterative Saturation Mutagenesis (ISM) for Rapid Directed Evolution of Functional Enzymes. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (4), 891–903. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.72>.
- (62) Reetz, M. T.; Carballeira, J. D.; Vogel, A. Iterative Saturation Mutagenesis on the Basis of B Factors as a Strategy for Increasing Protein Thermostability. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (46), 7745–7751. <https://doi.org/10.1002/anie.200602795>.
- (63) Liu, H.; Naismith, J. H. An Efficient One-Step Site-Directed Deletion, Insertion, Single and Multiple-Site Plasmid Mutagenesis Protocol. *BMC Biotechnol.* **2008**, *8* (1), 91. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-91>.
- (64) Sanchis, J.; Fernández, L.; Carballeira, J. D.; Drone, J.; Gumulya, Y.; Höbenreich, H.; Kahakeaw, D.; Kille, S.; Lohmer, R.; Peyralans, J. J.-P.; Podtetenieff, J.; Prasad, S.; Soni, P.; Taglieber, A.; Wu, S.; Zilly, F. E.; Reetz, M. T. Improved PCR Method for the Creation of Saturation Mutagenesis Libraries in Directed Evolution: Application to Difficult-to-Amplify Templates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81* (2), 387–397. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1678-9>.
- (65) Tomoiagă, R. B.; Tork, S. D.; Filip, A.; Nagy, L. C.; Bencze, L. C. Phenylalanine Ammonia-Lyases: Combining Protein Engineering and Natural Diversity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2023**, *107* (4), 1243–1256. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12374-x>.
- (66) Kempa, E. E.; Galman, J. L.; Parmeggiani, F.; Marshall, J. R.; Malassis, J.; Fontenelle, C. Q.; Vendeville, J.-B.; Linclau, B.; Charnock, S. J.; Flitsch, S. L.; Turner, N. J.; Barran, P. E. Rapid Screening of Diverse Biotransformations for Enzyme Evolution. *JACS Au* **2021**, *1* (4), 508–516. <https://doi.org/10.1021/jacsau.1c00027>.
- (67) Brack, Y.; Sun, C.; Yi, D.; Bornscheuer, U. T. Discovery of Novel Tyrosine Ammonia Lyases for the Enzymatic Synthesis of *p*-Coumaric Acid. *ChemBioChem* **2022**, *23* (10), e202200062. <https://doi.org/10.1002/cbic.202200062>.
- (68) Virklund, A.; Jendresen, C. B.; Nielsen, A. T.; Woodley, J. M. Characterization of Tyrosine Ammonia Lyases from *Flavobacterium Johnsoniae* and *Herpetosiphon Aurantiacus*. *Biotechnol. J.* **2023**, *18* (11), 2300111. <https://doi.org/10.1002/biot.202300111>.
- (69) Wu, S.; Xiang, C.; Zhou, Y.; Khan, M. S. H.; Liu, W.; Feiler, C. G.; Wei, R.; Weber, G.; Höhne, M.; Bornscheuer, U. T. A Growth Selection System for the Directed Evolution of Amine-Forming or Converting Enzymes. *Nat. Commun.* **2022**, *13* (1), 7458. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35228-y>.
- (70) Wang, L.; Gamez, A.; Archer, H.; Abola, E. E.; Sarkissian, C. N.; Fitzpatrick, P.; Wendt, D.; Zhang, Y.; Vellard, M.; Bliesath, J.; Bell, S. M.; Lemontt, J. F.; Scriver, C. R.; Stevens, R. C. Structural and Biochemical Characterization of the Therapeutic *Anabaena Variabilis* Phenylalanine Ammonia Lyase. *J. Mol. Biol.* **2008**, *380* (4), 623–635. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.05.025>.