

# Komputacionális módszerekkel fellelt új aromás ammónia-liáz szubsztráttartományának feltérképezése és katalitikus hatékonyságának növelése

## Mapping the substrate domain and increasing the catalytic efficiency of a novel computationally-discovered aromatic ammonia-lyase

ÁGOSTON Gyopárka\*,  
BOROS Krisztina, TOMOIAGĂ Raluca Bianca, Dr. NAGY Levente Csaba,  
Dr. BENCZE László-Csaba

Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutatóközpont, Kémia és Vegyész-mérnöki Kar,  
Babeş–Bolyai Tudományegyetem,  
Románia, 400028 Kolozsvár, Arany János u., 11. sz.  
[\\*gyoparka.agoston@stud.ubbcluj.ro](mailto:gyoparka.agoston@stud.ubbcluj.ro)  
+40753704352

### ABSTRACT

Phenylalanine ammonia-lyases (PALs) have emerged as a powerful tool in the production of optically pure L-phenylalanines. Together with histidine and tyrosine ammonia-lyases (HALs and TALs), these enzymes harbour the catalytically indispensable 3,5-dihydro-5-methylidene-4H-imidazole-4-one (MIO) prosthetic group, thereby constituting the MIO enzyme family. A major limitation of PALs is their low activity towards electron donating poly-substituted substrates. Recently, a new aromatic ammonia-lyase (AAL) was discovered, derived from *Loktanella atrilutea* (*LaAAL*) showing high activity in the production of 3,4-dimethoxy-L-phenylalanine, prominent as an intermediate in the synthesis of the anti-Parkinson drug L-DOPA.

With the intention of exploring the enzymes' natural role and substrate domain, a BLAST similarity study was employed and homologues of *LaAAL* were selected. The evolutionary lineage relationships between these homologues and known members of the MIO enzyme family were mapped through phylogenetic tree analysis. In addition, based on the comparison of the catalytic sites of the homologues, point mutations were introduced to *LaAAL* using megaprimer based PCR. The mutants' conversion-based activities were monitored with RP-HPLC and compared to the native enzyme's within the ammonia addition and elimination reactions.

**Keywords:** aromatic ammonia-lyases, L-amino acids, phylogenetic analysis, data mining, protein engineering.

### ÖSSZEFOGLALÓ

A fenilalanin ammónia-liázok (PAL-ok) ígéretes biokatalizátorok L-fenilalanin származékok előállítására. A hisztidin és tirozin ammónia-liázokkal közösen (HAL-ok és TAL-ok) rendelkeznek a katalitikus szempontból elengedhetetlen 3,5-dihidro-5-metilidén-4H-imidazol-4-on (MIO) prosztetikus csoporttal, a MIO enzimsaládot alkotva. A PAL-ok egyik legfőbb hiányossága az alacsony aktivitás, melyet a poliszubsztituált, elektrondonor szubsztituensekkel ellátott szubsztrátok felé mutatnak. Azonban, a nemrég felfedezett, *Loktanella atrilutea*-ból kinyert aromás ammónia-liáz (*LaAAL*), magas aktivitást mutat az L-DOPA, Parkinson kór kezelésére alkalmas hatóanyag prekurozoraként ismert, 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin előállításában.

Az *LaAAL* természetes szerepének és szubsztráttartományának feltérképezése érdekében BLAST hasonlóságvizsgálatot alkalmaztunk, így kiválasztásra kerültek a megfelelő *LaAAL* homológok. A lehetséges evolucionáris kapcsolatok felderítésére, filogenetikai analízis során a homológok összevetésre kerültek a MIO enzimesalád ismert tagjaival. Továbbá, a homológok katalitikus központjainak összehasonlítása alapján, megaprimer PCR módszerrel pontmutációkat vezettünk be az *LaAAL* szerkezetébe, RP-HPLC-vel követve a mutáns enzimek konverzió alapú aktivitását a natív enzimmel szemben az ammónia addíciós és eliminációs reakciókban.

**Kulcsszavak:** aromás ammónia-liázok, L-aminosavak, filogenetikai analízis, adatbányászat, fehérjemérnökség.