

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

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

Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutatóközpont, Kémia és Vegyészmérnöki Kar, Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Románia, 400028 Kolozsvár, Arany János utca, 11. szám.

\*gyoparka.agoston@stud.ubbcluj.ro

## BEVEZETŐ

A fenilalanin ammónia-liázok (PAL-ok) kiváló biokatalizátorok L-fenilalanin származékok előállítására. A hisztidin és tirozin ammónia-liázokkal (HAL-ok és TAL-ok) közösen, a katalitikus szempontból elengedhetetlen, 3,5-dihidro-5-metilidén-4H-imidazol-4-on (MIO) proszterikus csoporttal rendelkeznek, a MIO enzimsaládot alkotva. A PAL-ok egyik legfőbb hiányossága a poliszubsztituált, elektronodonor szubsztituensekkel ellátott szubsztrátok felé mutatott alacsony aktivitásuk [1]. 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 [2]. A kutatás célja ezen ígéretes biokatalizátor természetes szerepének feltérképezése és a katalitikus központjában fellelhető egyedi mintázatok szerepének vizsgálata.

## KÍSÉRLETI RÉSZ

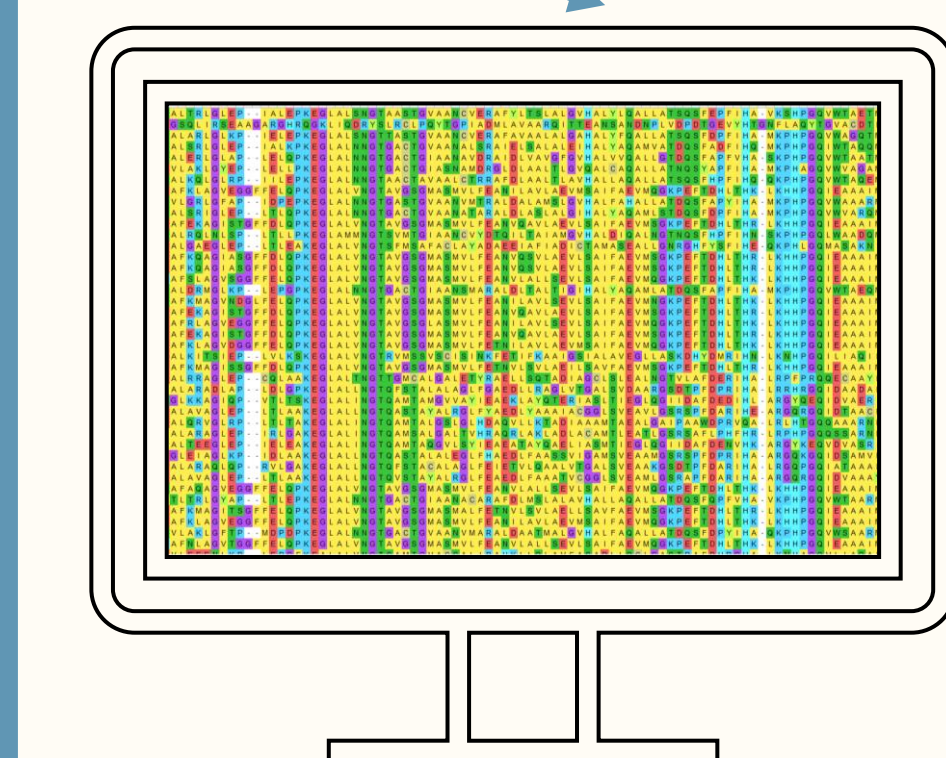
### Szekvencia összeillesztés

Az LaAAL aminosav szekvenciája



BLAST hasonlóságvizsgálat

Homológok kiválasztása (lefedettség > 95%, azonosság > 60%, E=0)



Többszörös szekvencia összeillesztés ismert PAL/TAL/HAL enzimekkel (MEGA-11 program, MUSCLE módszer)

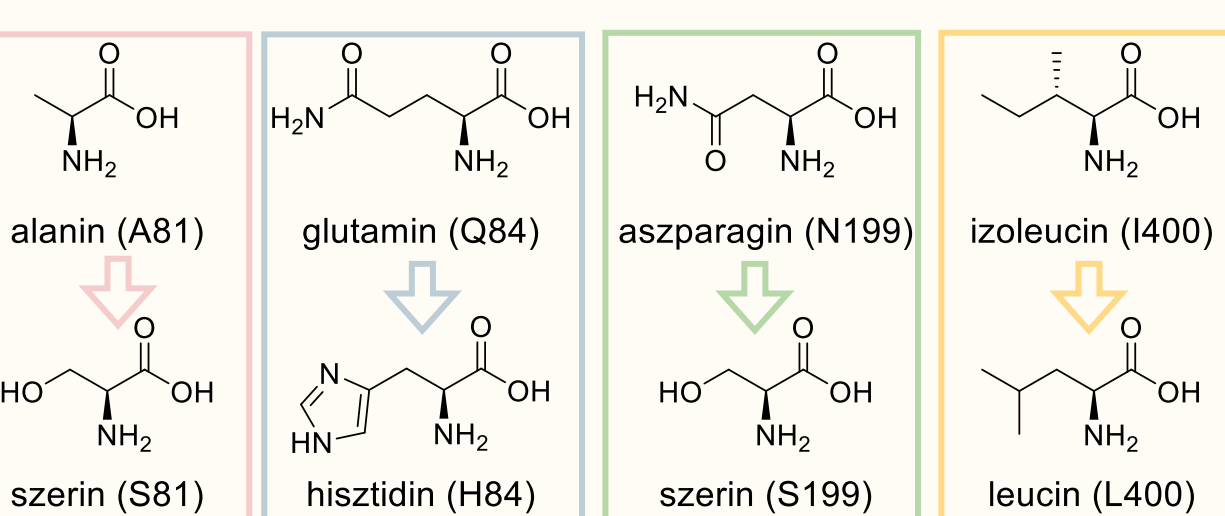
### Filogenetikai analízis

ANALYSIS	
Statistical Method	→ Maximum Likelihood
PHYLOGENY TEST	
Test of Phylogeny	→ Bootstrap method
No. of Bootstrap Replications	→ 100
SUBSTITUTION MODEL	
Substitutions Type	→ Amino acid
Model/Method	→ LG with Freqs. (+F) model
RATES AND PATTERNS	
Rates among Sites	→ Gamma Distributed With Invariant Sites (G+I)
No. of Discrete Gamma Categories	→ 5
DATA SUBSET TO USE	
Gaps/Missing Data Treatment	→ Use all sites
Site Coverage Cutoff (%)	→ Not Applicable

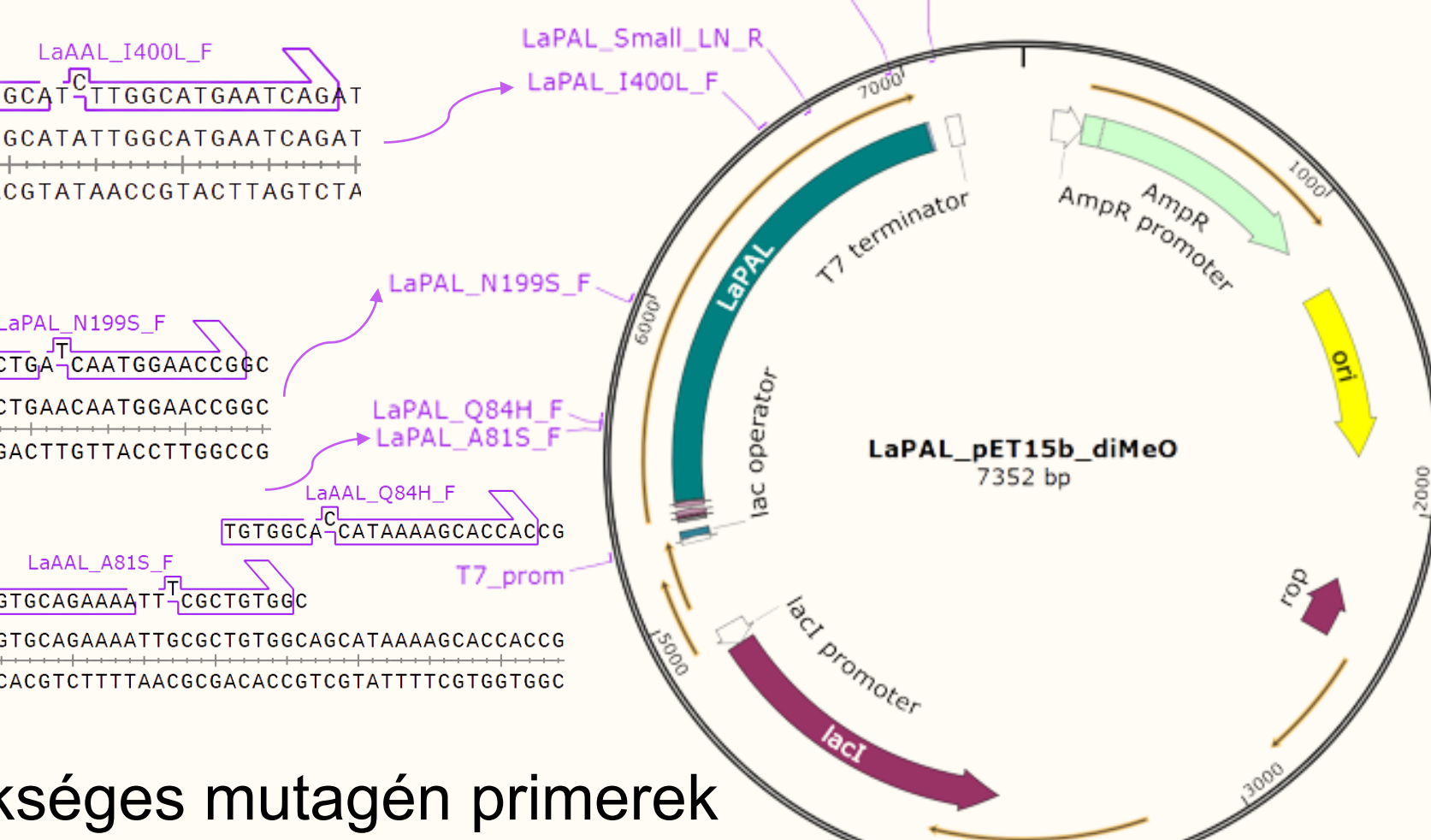
### Rövidítések:

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool  
NCBI - National Center for Biotechnology Information

### Pontmutációk bevezetése

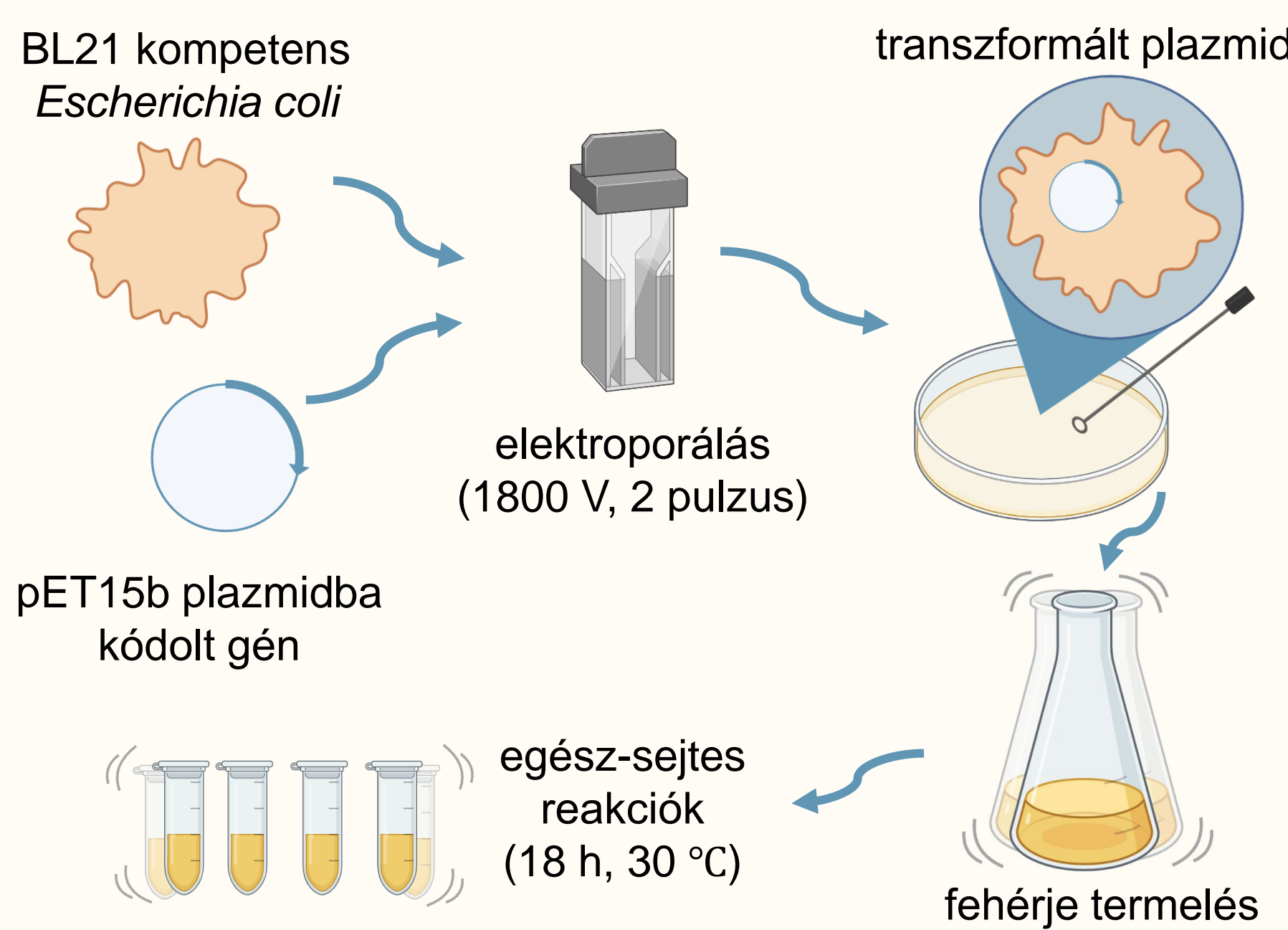


Tervezett mutációk

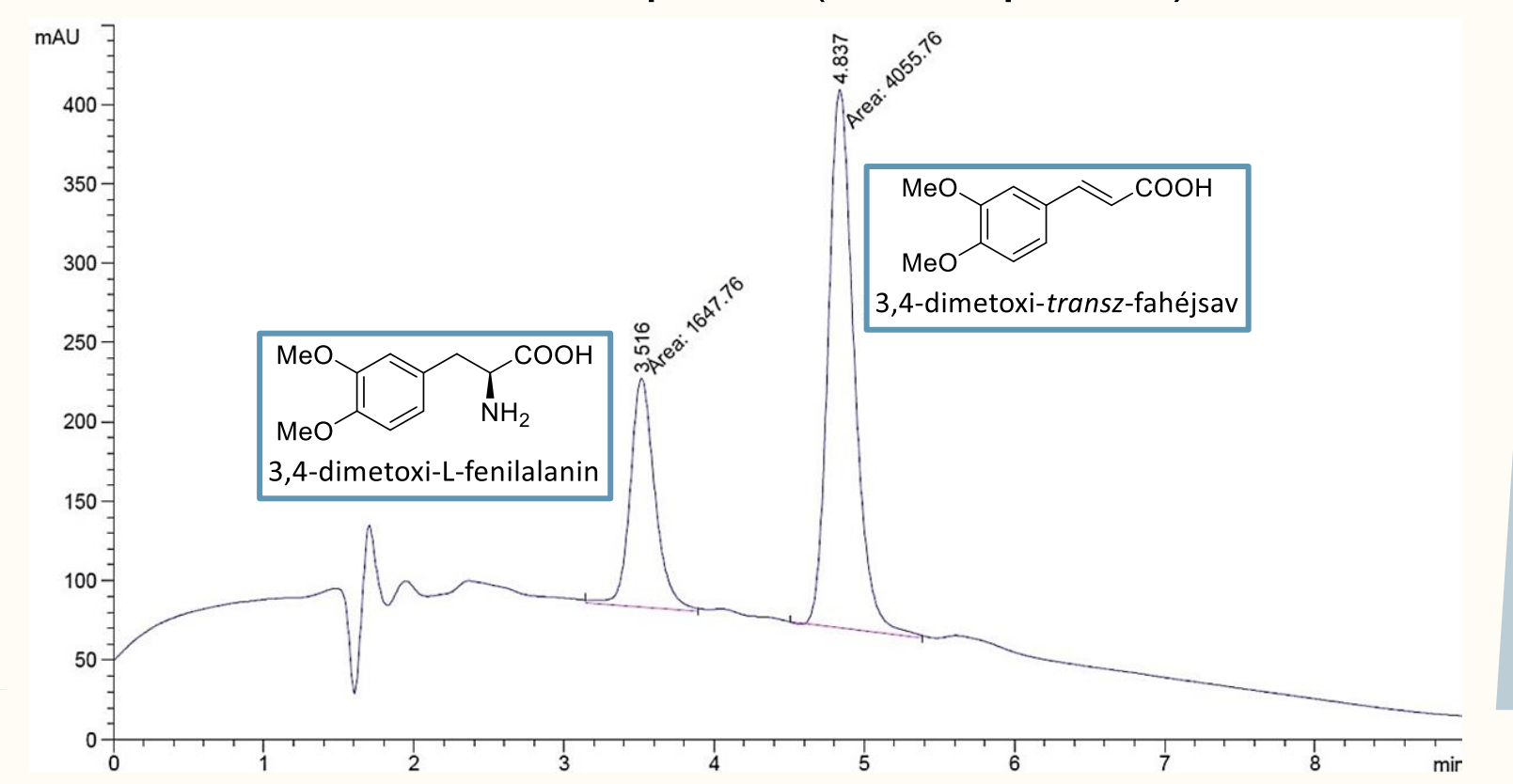


Szükséges mutagén primerek

### Transzformálás és aktivitás vizsgálat



A konverzió meghatározása RP-HPLC-vel. Gemini NX-C18 oszlop (150 × 4.5 mm; 5 µm), 1.0 ml/min, 25 °C. Mobil fázis: A: NH<sub>4</sub>OH puffer (0.1 M, pH 9.0) / B: MeOH.



## EREDMÉNYEK

### Szekvencia összeillesztés

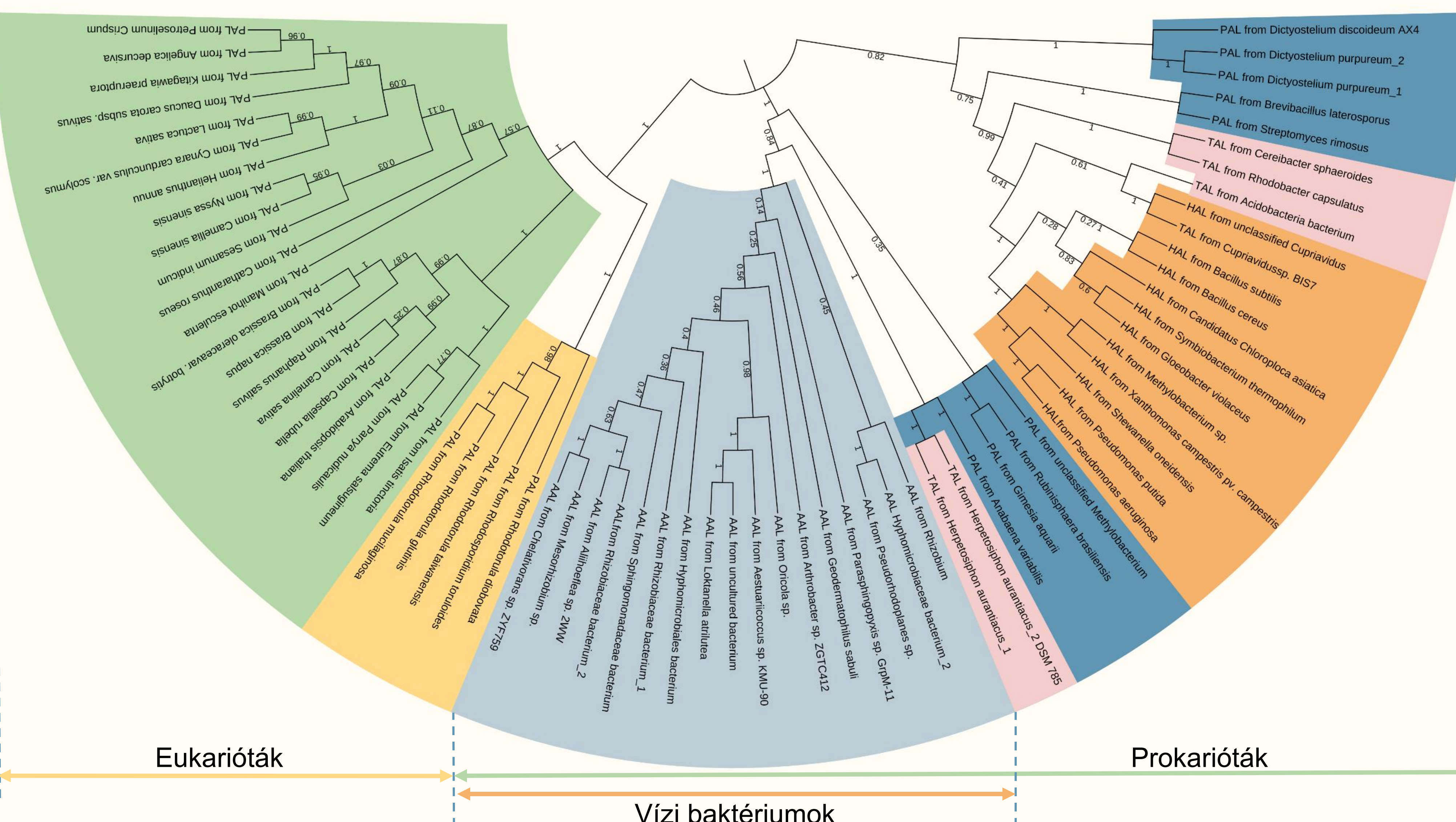
AAL homológ faja	Aminosav a megfelelő pozícióban				Megfelelő LaAAL mutáció
	L134	F137	L138	V259	
<i>Loktanella atrilutea</i>	A81	Q84	H85	N199	I400
<i>Aestuariicoccus</i> sp. KMU-90	A	QH	N	N	I
Uncultured bacteria (AL-11)	A	QH	N	N	I
<i>Rhizobiaceae</i>	A	HH	N	N	I
<i>Sphingomonadaceae</i>	A	HH	N	N	I
<i>Chelativorans</i> sp. ZYF759	A	HH	N	N	I
<i>Hyphomicrobiales</i>	S	HH	N	N	I
<i>Oricola</i> sp.	A	QH	N	V	I
<i>Mesorhizobium</i> sp.	A	HH	N	I	I
<i>Rhizobiaceae</i>	A	QH	N	I	I
<i>Aliihoeflea</i> sp. 2WWW	A	QH	N	I	I
<i>Hyphomicrobiales</i>	S	HH	S	L	I
<i>Pseudorhodoplanes</i>	S	HH	S	L	I
<i>Parasphingopyxis</i> sp. GrpM-11	A	QH	N	V	I
<i>Rhizobium</i>	A	QH	N	I	I
<i>Arthrobacter</i> sp. ZGTC412	A	TH	N	V	I
<i>Geodermatophilus</i> sabuli	A	QH	N	I	I

I. Mutáns: ●●●; II. Mutáns: ●●●●; III. Mutáns: ●●●●●

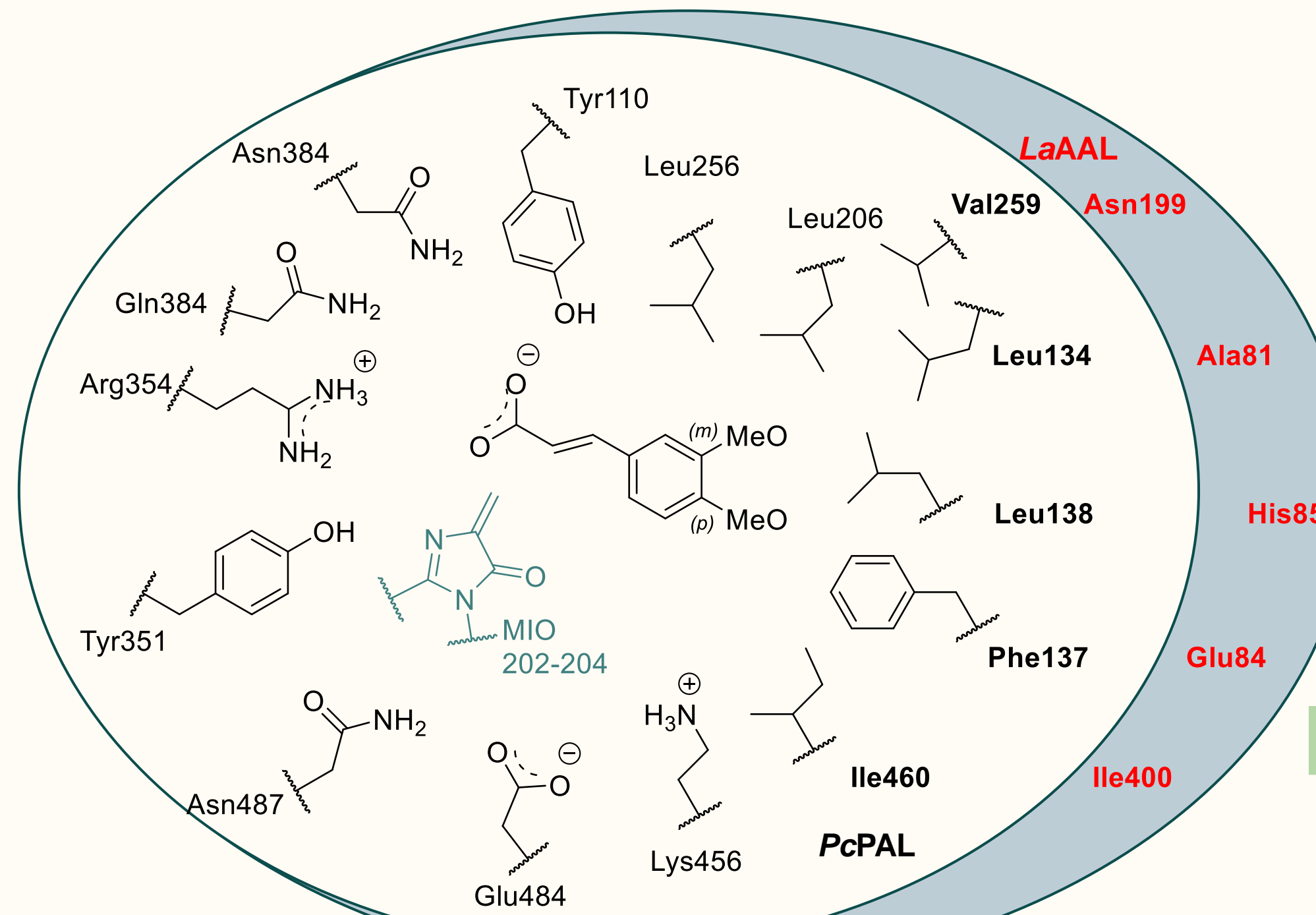
A kiválasztott homológok katalitikus központjának összehasonlítása és a mutációk megtervezése

### Filogenetikai analízis

- bakteriális eredetű PAL-ok
- bakteriális eredetű TAL-ok
- bakteriális eredetű HAL-ok
- AAL-ok
- gomba eredetű PAL-ok
- növényi eredetű PAL-ok



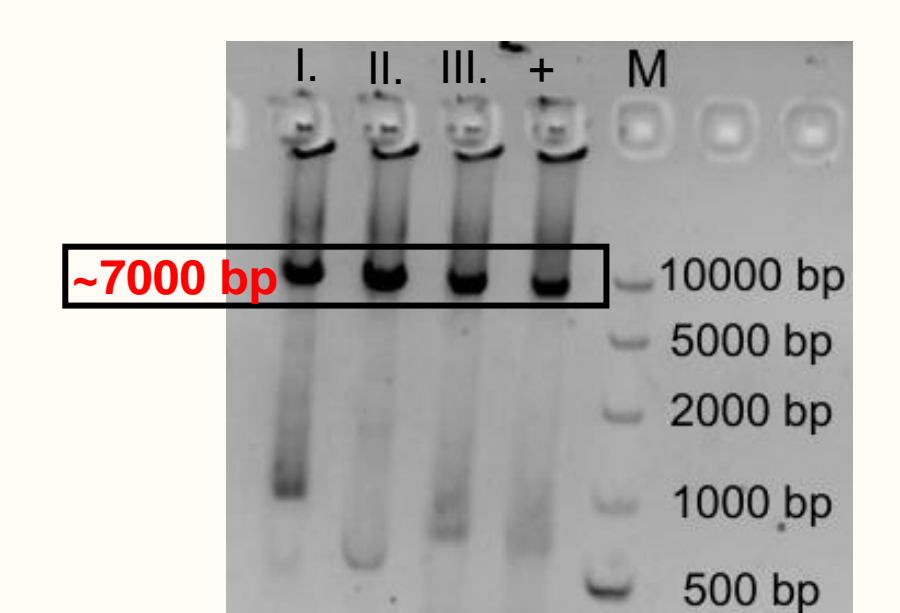
AZ LaAAL katalitikus központja a jól karakterizált PcPAL-lal szemben



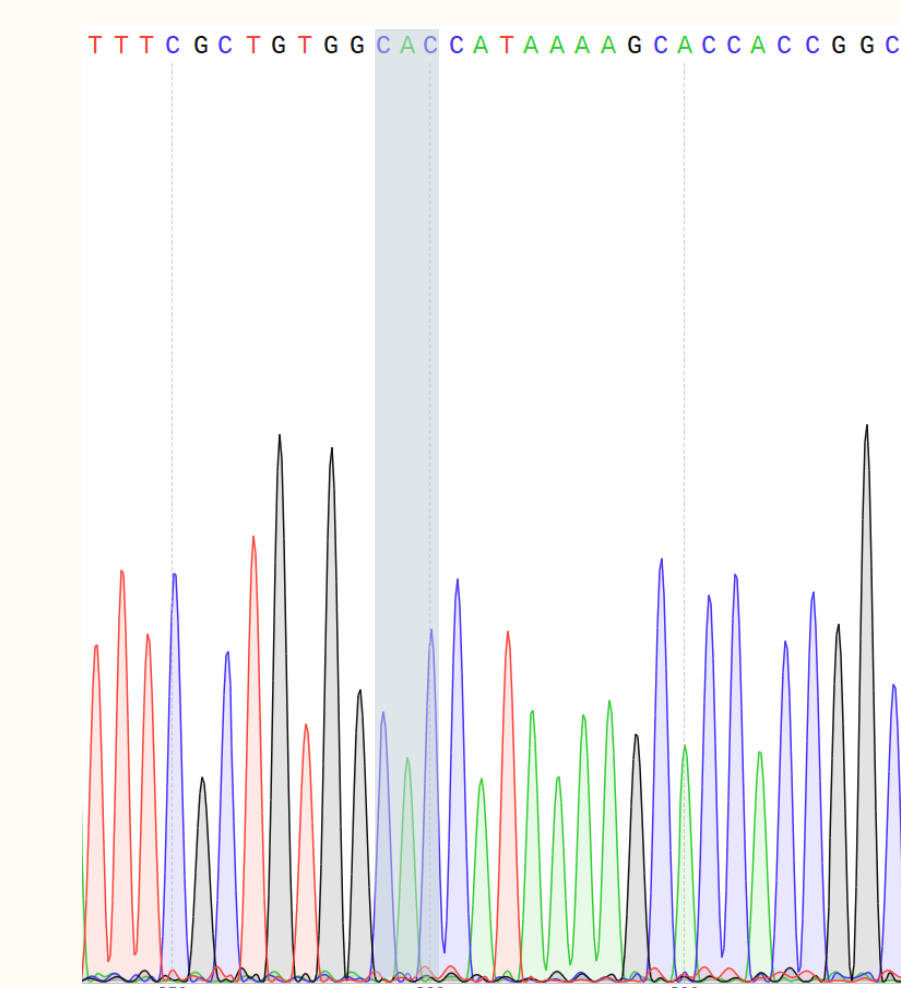
Pozíció az LaAAL-ban	81	84	85	144-146	199	400
RcTAL	...QQN L IY HL AT...TVG	ASG	DLT...LAL V	NGT...GAQ V	TAT...	
PpHAL	...QRS L VL SH AA...SVG	ASG	DLA...LAL L	NGT...IAQ V	TAA...	
AvPAL	...QTN L VW FL KT...SIG	ASG	DLV...LAM M	NGT...GLQ I	CGN...	
AL-11	...QKI A LW QH KS...SIG	ASG	DLV...LAL N	NGT...SLH I	GMN...	
LaAAL	...QKI A LW QH KS...SIG	ASG	DLV...LAL N	NGT...SLH I	GMN...	
RtPAL	...QKA A LE FQ LCG...TIS	ASG	DLS...LGL V	NGT...GLD I	AAA...	
AtPAL	...QTE L IR FL NAG...TIT	ASG	DLV...LAL V	NGT...GAE I	AMA...	
PcPAL	...QKE L IR FL NAG...TIT	ASG	DLV...LAL V	NGT...GAE I	AMA...	

Többszörös szekvencia összeillesztés, ismert PAL/TAL/HAL enzimekkel

### PCR reakció ellenőrzése



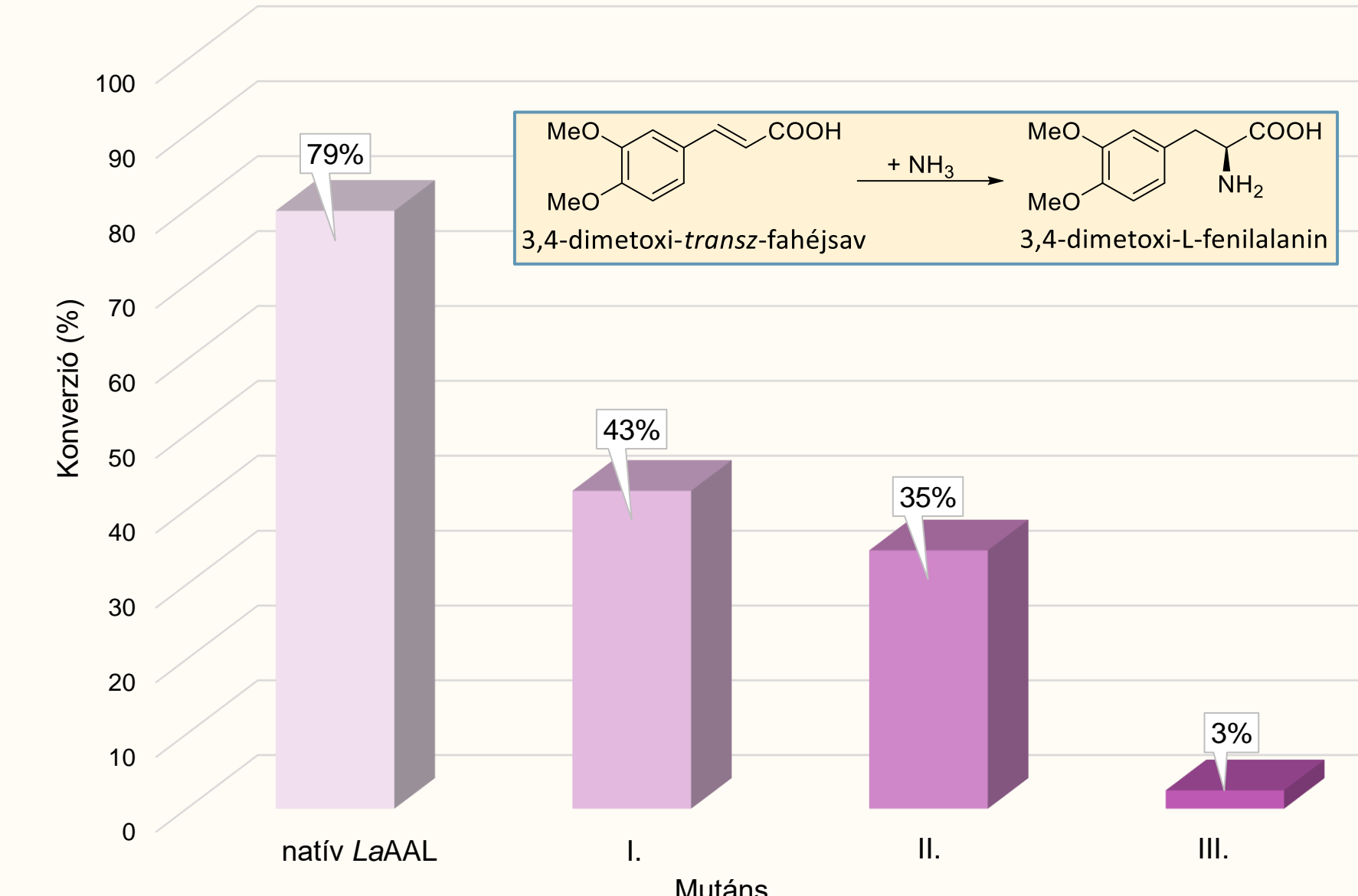
A PCR segítségével felszorzósított mutáns gének (I- I. Mutáns, II- II. Mutáns, III- III. Mutáns, +- pozitív kontroll, M- FastRuler DNS létra)



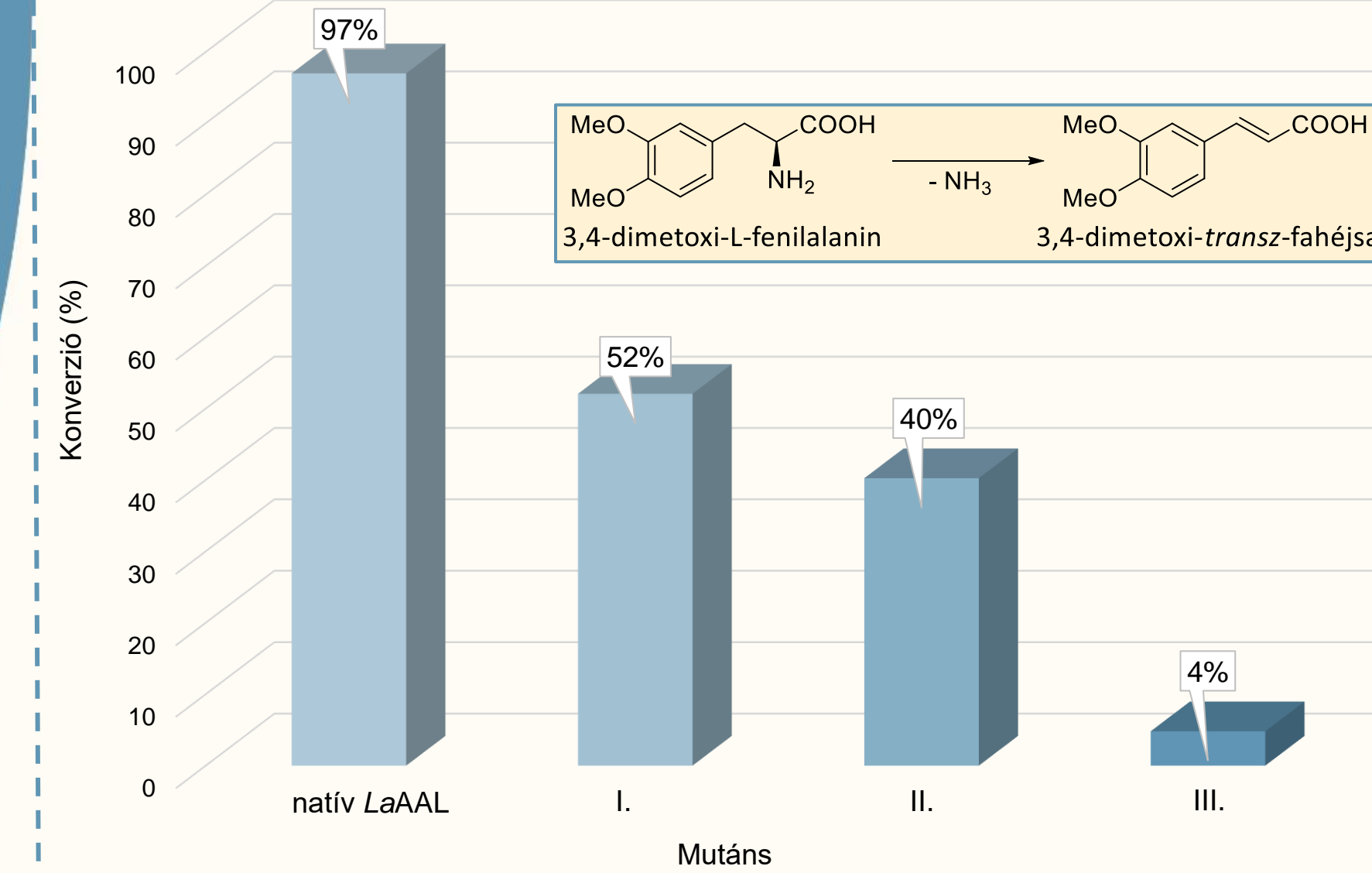
Szekvenálási eredmények a Q84H LaAAL mutáns esetén

### A mutánsok katalitikus aktivitása

Ammónia addíciós reakció



Ammónia eliminációs reakció



### Következtetések

A *Loktanella atrilutea*-ból kinyert, új aromás ammónia-liáz és homológjai részét képezik a MIO-enzimsaládnak.

A tervezett LaAAL mutánsok aktivitásának tesztelése előrevetíti az új aromás ammónia-liázok katalitikus hatékonyságának főbb jellemzőit és alkalmazhatóságát ligninből származó szubsztrátok átalakítására.

### Referenciák:

[1] Tork S. D., Moisa M. E., Cserepes L., Filip A., Nagy L. C., Irimie F. D., Bencze L. C., *Sci Rep*, 2022, 12, 10606  
[2] Tomoiaga R. B., Tork S. D., Filip A., Nagy L. C., Bencze L. C., *Appl Microbiol Biotechnol*, 2023, 107, 1243-1256