

A PAL és PAM enzimek tisztítása és vizsgálata

Szerző:

Várhelyi Melinda

Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, Kémia és Vegyészmérnöki Kar,
Vegyészmérnöki Szak, alapképzés, III. év

Témavezetők:

dr. Paizs Csaba mérnök, egyetemi docens,

Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, Kémia és Vegyészmérnöki Kar, Magyar Kémia és Vegyészmérnöki Intézet

Varga Andrea mérnök, doktorandus,

Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, Kémia és Vegyészmérnöki Kar, Magyar Kémia és Vegyészmérnöki Intézet

Tartalom

1. Bevezetés.....	3
1.1. Az ammónia-liázok és aminomutázok szerepe.....	3
1.2. A PAL és PAM enzimek jelentősége és felhasználása.....	4
1.3. A PAL és PAM enzimek szerepe a biokatalízisben.....	6
1.4. A PAL enzim szerepe a gyógyászatban.....	6
1.5. A PAL és PAM enzimek szerkezete.....	7
1.6. A PAL és PAM enzimek működése, mechanizmus.....	9
2. Kísérleti rész.....	10
2.1. Fehérje termeltetés.....	10
2.2. Sejtfeltárás.....	11
2.3. Fehérje tisztítása.....	11
2.3.1. Elektroforézis.....	12
2.4. <i>PcPAL</i> és <i>PaPAM</i> enzimek aktivitásának igazolása.....	14
2.4.1. <i>PcPAL</i> katalizálta reakciók.....	14
2.4.2. <i>PaPAM</i> katalizálta átalakulások.....	15
3. Következtetések.....	17
Irodalmi jegyzék.....	18

1. Bevezetés

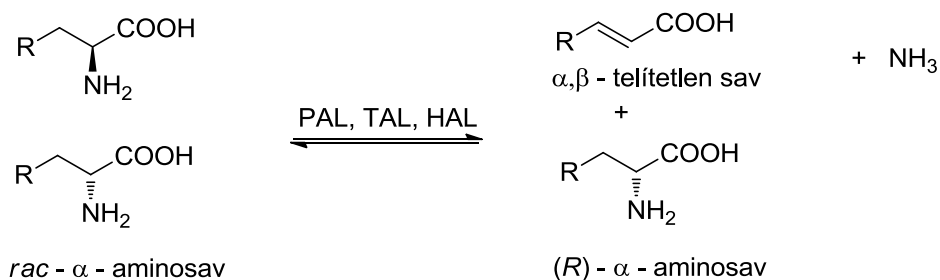
Napjainkban a biokatalitikus eljárások egyre nagyobb szerepet kapnak, ugyanis a biokatalízis, biotranszformáció céljaira felhasználható enzimek, mikroorganizmusok számos előnnyel rendelkeznek. A biokatalízis fő előnyei, hogy a felhasznált enzimek természetüknél fogva környezetbarátok, királis katalizátorok, nagyobb a szelektivitásuk és hatékonyságuk, az átalakulás általában vízben játszódik, nincs szükség szerves oldószerekre, és a reakciók normál légköri nyomáson, 100°C alatt végbemennek [1,2].

A szelektív szintézismódszerek iránti megnövekedett igény is hozzájárult a biokatalitikus eljárások fejlődéséhez. A szelektív reakciók (kemo-, regio-, diasztereomer-, illetve diasztereotópszelektív folyamatok) egy részét elvégezhetjük akirális reagensekkel vagy katalizátorokkal, az enantiomerszelektív és enantiópszelektív folyamatok lejátszódásához viszont királis reagensre vagy katalizátorra van szükség. Az enzimek alkalmazhatóak enantiomer- és enantiópszelektív reakciók elvégzésére is, mivel királis szerkezetűek, köszönhetően az őket felépítő királis aminosavaknak. Az enantiomerek tiszta előállítása nagyon fontos a gyógyszerek, növényvédőszer, finomkémiai, kozmetikai- és élelmiszeripari termékek gyártása terén [1].

A PAL (fenilalanin-ammónia-liáz) és PAM (fenilalanin-2,3-aminomutáz) enzimeknek is fontos szerepük van a biokatalitikus átalakulásokban, illetve különböző enantiomertiszta arilalaninok előállításában. A PAL és PAM baktériumokban, gombákban, növényekben előforduló enzimek.

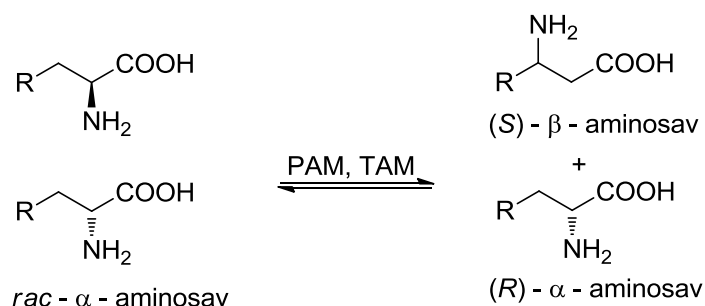
1.1. Az ammónia-liázok és aminomutázok szerepe

A liázok olyan enzimek, amelyek az atomok közötti kötések hasítását katalizálják. Az ammónia-liázok a C–N kötést hasítják úgy, hogy a termékben kettős kötés alakul ki ammónia elimináció következtében, vagy visszafele kettős kötésre való ammónia-addíció játszódik le [3,4].



1.1.ábra. Ammónia-liázok szerepe, az ammónia nem oxidatív eliminációja

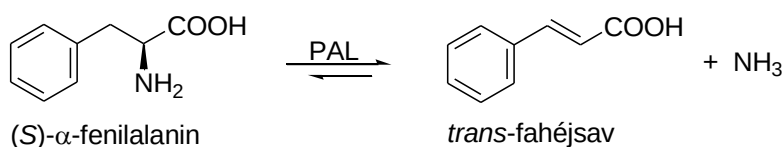
A mutázok olyan enzimek, amelyek az átrendeződési, izomerizációs reakciókat katalizálják. Az aminomutázok egy szubsztrátum szomszédos C-atomján levő aminocsoportja és hidrogénatomja közti reverzibilis átvándorlását, kicserélődését katalizálják [5,6].



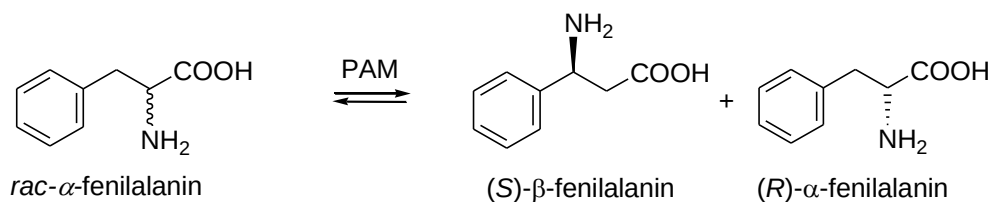
1.2.ábra. Aminomutázok szerepe, az (S)-α-aminosavak izomerizációja (S)-β-aminosavakká

1.2. A PAL és PAM enzimek jelentősége és felhasználása

A PAL enzim a *trans*-fahéjsav kepződését katalizálja L-alaninokból az ammónia nem oxidatív eliminációja során, a PAM enzim pedig az (S)-α-fenilalanin izomerizációját katalizálja (S)- vagy (R)-β-fenilalaninná, mely számos termék prekursorja a bioszintézisben [7,8]. A bakteriális eredetű PAM (S)-α-fenilalanin izomerizációját katalizálja (S)-β-fenilalaninná.



1.3.ábra. PAL szerepe, az ammónia nem oxidatív eliminációja (S)-α-fenilalaninból



1.4.ábra. Bakteriális PAM szerepe, az (S)-α-fenilalanin reverzibilis izomerizációja (S)-β-fenilalaninná

A PAL enzim jelen van egyes baktériumokban, gombákban és magasabb rendű növényekben. Magasabb rendű növényekben a *trans*-fahéjsav kiindulóanyag a fenilpropanoidok szintézisében, mint például flavonoidok, sztilbének, kumarinok, ligninek, oldható észterek és amidok, egyes alkaloidok esetében [9].

A PAL enzimet használják (S)-α-fenilalanin gyártására, felhasználva az enzim fordított reakcióját, az ammónia addícióját *trans*-fahéjsavra, magas pH-n. Az (S)-α-fenilalanin egy fontos aminosav és széles körben használják az élelmiszer- és gyógyszeriparban. Ezt a termelést ösztönözte a dietetikus aszpartám édesítőszer nagy kereslete is, mivel az édesítőszer egyik összetevője az (S)-α-fenilalanin az L-aszpartámsav mellett. A PAL ipari méretű termelése elsősorban *Rhodotorula glutinis* törzs felhasználásával történik. Annak érdekében, hogy a PAL enzim aktivitását és stabilitását növeljék, egyes kutatók kis koncentrációban Mg^{2+} , glicerin és redukálószeres hozzáadását tanácsolják. Általában az ipari folyamatokban az enzim ismételt és fenntartható alkalmazása miatt az újrahasználatosság és javított stabilitás lényeges paraméterek. A rögzítés az enzim terméktől való szétválasztására, hatékony kinyerésére és újrahasznosítására, tárolási és működési körülmények között fokozott stabilitásra nyújt könnyedséget [10].

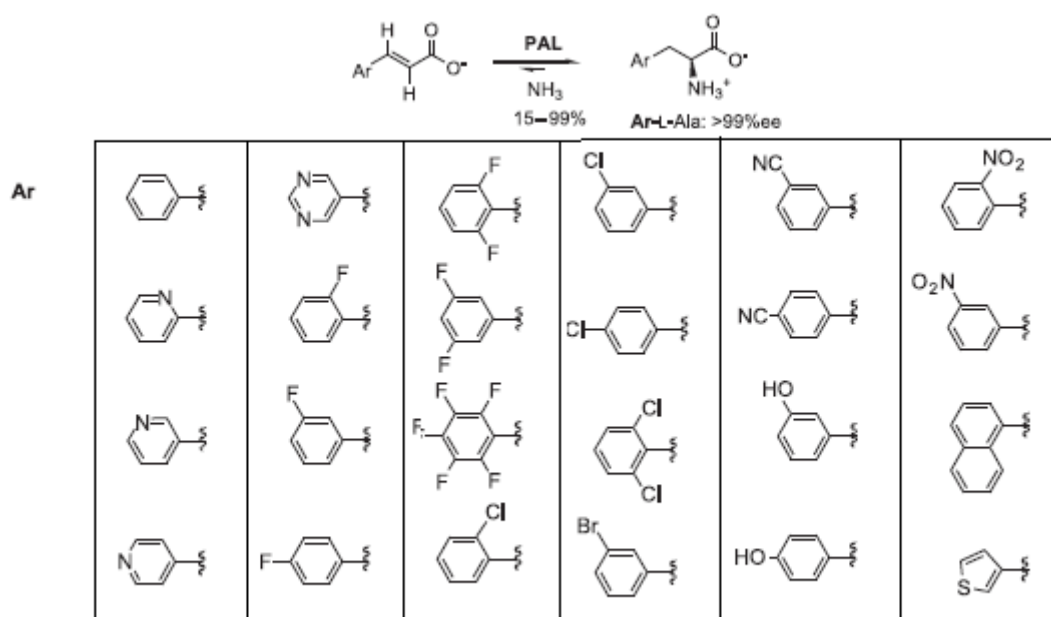
A mutázok az élővilágban az aminosavak katabolizmusában játszanak szerepet, továbbá számos biológiailag aktív termék bioszintézisében vesznek részt, mint például blaszticidin, viomicin és taxol [6].

Az α-fenilalanin átalakulása β-fenilalaninná a taxol bioszintézisének első lépése, amelyet a PAM enzim katalizál. A taxol egy diterpén-alkaloid, melyet a *Taxus brevifolia* dióból különítették el, és nagyszámú rákféleségek kezelésére használják, többet között méhrák esetében [11].

1.3. A PAL és PAM enzimek szerepe a biokatalízisben

Fenilalanin-ammónia-liáz (PAL) és fenilalanin-2,3-aminomutáz (PAM) olyan, baktériumokban, gombákban, és növényekben előforduló enzimek, melyek a fenilalanin metabolizmusában játszanak fontos szerepet. Ugyanakkor hatékonyan alkalmazhatóak biokatalitikus eljárásokban nem természetes α - és β -alaninok homokirális formában történő előállítására, melyek gyógyszerkémiailag szempontból rendkívül fontosak, biológiailag aktív molekulák alkotóelemei, királis vegyületek prekursorai.

Az ammónia-liáz reakciók természetes irányukban sztereodestruktív természetűek, ezért a PAL enzim megfelel (R)-enantiomerek előállítására, a racém elegyből az (S)-enantiomer szelektív lebontásával zajló folyamatban. A természetessel ellentétes reakcióirány viszont sztereokonstruktív természetű, így felhasználható enantiomertiszta (S)-aril-alaninok előállítására aril-akrilátokból. A PAL képes katalizálni az ammónia aril-akrilátokra történő enantioszelektív addícióját amennyiben az ammónia koncentrációja 5 M fölé emelkedik [1].



1.5.ábra. PAL-katalízissel előállítható enantiomeriszta (S)- α -fenilalanin analógok

1.4. A PAL enzim szerepe a gyógyászatban

A PAL enzim a gyógyászatban a fenilketonuria kezelésében játszik fontos szerepet.

A fenilketonuria (PKU) a fenilalanin anyagcsere-zavarának öröklődő betegsége, amelyben a fenilalanin lebontásához szükséges egyik enzim hiányzik, és ez a vérben

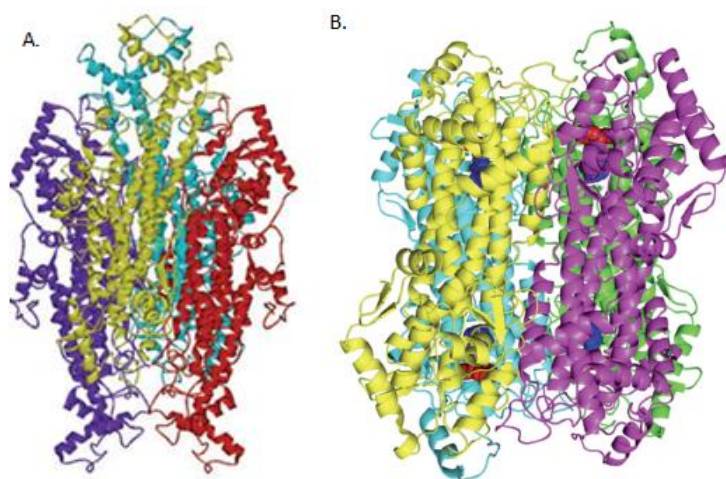
veszélyesen magas fenilalanin-szint kialakulásához vezet. A PKU kezelésére az eddigi egyetlen hatékony módszernek a rendkívül szigorú fenilalanin-mentes diéta bizonyult, mely során a szervezet fehérjeigényét speciális fenilalanin-mentes aminosav homogenizátumokkal, fehérjepótló tápszerekkel egészítik ki (félszintetikus diéta). Génterápiás gyógyítása, a fenilalanin-hidroxiláz (PAH) enzim reaktiválása eddig nem vezetett eredményre.

A PAL fenolketonuriában való gyógyászati alkalmazásának szerepe az enzim stabilitása és azon adottságának köszönhetően merült fel, miszerint a PAH-al szemben nem igényel kofaktort. A PAL emberi és állati szervezetekben az (S)-fenilalanint *trans*-fahéjsavvá alakítja át, ami koenzim-A által benzoessavvá alakul, mely végül glicinnel reagálva a vizelettel könnyen kiürülő ártalmatlan vegyületet képez.

Az első próba emlős állatokkal, majd emberekkel végzett hemodialízis volt, féligáteresztő membránon immobilizált PAL enzimekkel. A kísérlet sikerrel zárult, ugyanis sikerült csökkenteni a vér fenilalanin szintjét. Az eljárás költségesnek bizonyult, ezért a PAL enzimet zselatin-kapszulák formájában orálisan juttatták a szervezetbe, azonban a gyomor-bél traktusban hamar lebomlott. A módszer nagyon hatékonynak bizonyult (2 órán belül a vér fenilalanin szintje 44%-al csökkent), amikor az enzimet cellulóznitrát membránnal borított féligáteresztő mikrokapszulákba helyezték, mert az így védetté vált a proteázokkal szemben.

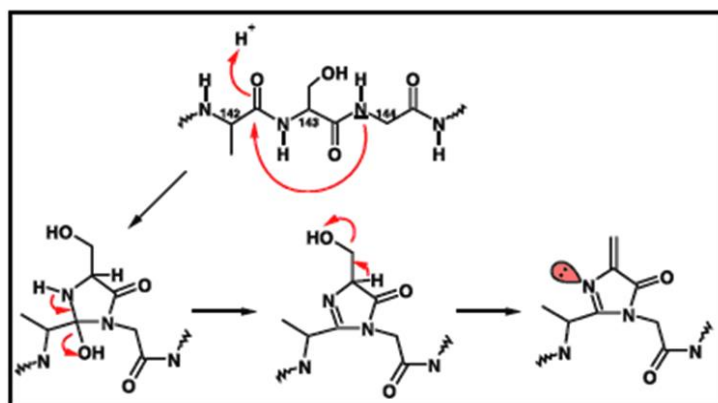
A terápiás alkalmazást már csak az enzim immunogén hatása hátráltatja, melynek csökkentése a jelenlegi kutatások célkitűzése [12-14].

1.5. A PAL és PAM enzimek szerkezete



1.7.ábra. *Petroselinum crispum* PAL enzim (A) és *Pantoea agglomerans* PAM (B) enzim tetramere

Az első rendelkezésre álló ammónia-liáz kristály szerkezetéből megállapították, hogy ezek az enzimek tartalmaznak egy szokatlanul módosított aktív helyzetű kofaktort, az ún. 4-metilidénimidazol-5-on-t (MIO-t). A MIO egy belső Ala-Ser-Gly tripeptid autokatalitikus poszttranszlációs ciklizációja során két vízmolekula eliminációját követően alakul ki, melynek jelenlétét 1999-ben, a *Pseudomonas putida* hisztidin-ammónia-liáz enzim kristályszerkezetének megfejtésekor fedeztek fel [17,18].



A MIO nagyon elektrofil, jelenlétét más ammonia-liázban, a tirozin-ammonia-liázban, valamint a szerkezeti és mechanizmusbeli hasonlóságokat mutató tirozin-2,3-aminomutáz (TAM) és fenilalanin-2,3-aminomutáz (PAM) enzimekben is igazolták [19].

MIO

sp|P21310|Psp-HAL -----LDDDLVRLIMVLKINSLSRGFSGIRRKVIDALIALVNAEVYPHIPLKGSV¹⁴⁶ASGD

sp|B8ZV94|Myx-TAM -----FPDEVVRAIMTVRINCLMKGYSGISPEALQLLATMNLNRGIHPVIPMQGSL¹³³ASGD

tr|Q7N4T3|Phl-PAL -----MSKPCIKASQFTMLLSVCKGWSATRPIVAQAIVDHIHNDIVPLVPYKGSV¹⁵³ASGD

tr|Q2EYY5|Sace-TAL -----LAPFVSRLLILWLRIQNMRRKGYSAVSPVFVQKLADLWNKGFTPAIPRHGTV¹⁵⁰ASGD

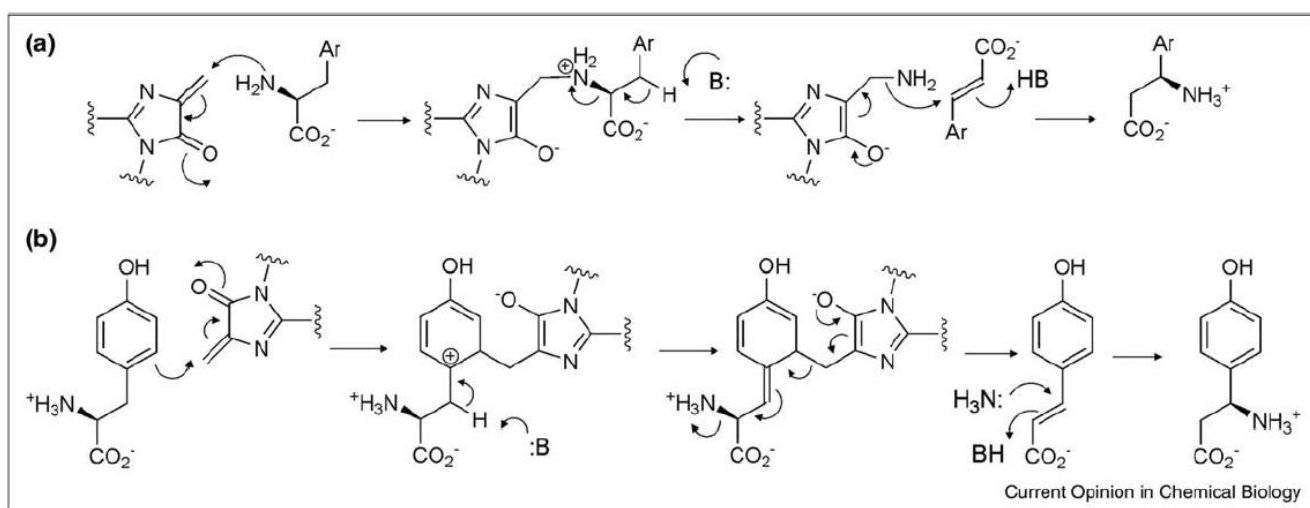
tr|Q6GZ04|Tc-PAM GSVDELPAATRSAMLLRLNSFTYGCSGIRWEVMEALEKLLNSNVSPKVPYLRGSV¹⁷⁸ASGD

: : : : : * * : : : * * * * *

1.10.ábra. A MIO motívum a PAL, TAL, HAL, PAM, TAM enzimekben

1.6. A PAL és PAM enzimek működése, mechanizmus

Két különböző mechanizmus elképzelés létezik a PAL, illetve PAM enzimekre. Az első egy E_1cb mechanizmus, a MIO csoport a szubsztrátum amin-csoportjára való elektrofil támadásán alapszik. A javasolt mechanizmusban a benzil-proton pK_a értéke magas ($pK_a > 40$), tehát nem eléggé savas, az α -karbokation energiája pedig túl magas. Ez okból kifolyólag Rétey és munkatársai javasoltak egy másik mechanizmust, melyben a MIO elektrofil támadást intéz a szubsztrátum aromás csoportjára, mely kölcsönhatás kellőképpen megsavanyíthatja a β -pozíciót, s ezzel a mechanizmussal értelmezhetővé válna az E_1cb mechanizmussal kapcsolatos nem eléggé savas β -proton enzimatis bázis által való lehasításának kérdése [20].



1.11.ábra. A PAL és PAM enzimkatalízisére javasolt mechanizmusok:

a) E_1cb mechanizmuson alapuló, b) Friedel-Crafts típusú mechanizmus

2. Kísérleti rész

Munkánk során a növényi eredetű *Petroselinum crispum* PAL (PcPAL) és a bakteriális eredetű *Pantoea agglomerans* PAM (PaPAM) enzimeket tanulmányozzuk.

2.1. Fehérje termeltetés

Elkészítjük az LB-tápoldatot, amit autoklávban sterilizálunk 121°C-on 30 percig.

A tápoldat kihűlése után steril fülke alatt, 1%-ához klóranfenikol (CA) és karbenicillin (CAR) antibiotikumokat teszünk, majd beoltjuk a kívánt sejt kultúrával (PcPAL vagy PaPAM). A beoltott tápoldatot egyéjszakás inkubálás alá vetjük 37°C-on.

37°C-on termosztált egyéjszakás transzformáns kultúrából 500 µL-t oltunk át 500 mL, a megfelelő antibiotikumot/-okat tartalmazó LB-tápoldatba, és a növekedést az optikai denzitás mérésével követjük, 600 nm-en mérjük az abszorbanciát a sejtmentes LB-tápoldattal szemben. OD₆₀₀ = 0,6–0,7 között 1 mM Izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid-ot (IPTG)-t indukálunk, megindítva a plazmidon kódolt fehérje expresszióját. Az expresszió ideje 19–20 óra, hőmérséklete pedig 25°C.

Név	Rövidítés	Törzsoldat koncentrációja	LB tápoldat koncentrációja
Klóranfenikol	CA	30 mg/mL (100% etanol)	21 µg/mL
Karbenicilin	CAR	50 mg/mL (steril víz)	50 µg/mL

1.táblázat. A használt antibiotikumok

LB-tápoldat: 10 g Triptont, 5 g Élesztőkivonatot és 10 g NaCl-ot feloldunk kb. 1 L desztillált vízben, majd beállítjuk az oldat pH-ját 7,0-re

2.2. Sejtfeltárás

A termeltetés után a sejteket 4°C-on, 5000 rpm-en 25 percig centrifugáljuk, melynek következtében a sejtek kiülednek a centrifuga-edény aljára. A felülúszót leöntjük, majd a sejteket az expressziós térfogat 1/10-ének megfelelő térfogatú, jégbe hűtött lízis pufferben szuszpendáljuk, amihez frissen Pefabloc-oldatot, Lizozimot, Rnázt illetve *SigmaFAST*TM EDTA-mentes komplex proteáz tablettát adunk.

A keverékben összesuszpendált sejtek falát ultrahanggal törjük össze: 1500000 J-on, 2 s ultrahang, 2 s szünet. A sejtörmeléket és az oldhatatlan fehérjét ezután 20 percig tartó centrifugálással választjuk el (5000 rpm, 4°C), s a felülúszót használjuk a további munkához, mivel ez tartalmazza az értékes intracelluláris enzimet.

20 mM Pefabloc-oldat: 4,8 mg Pefablocot feloldunk 1 mL desztillált vízben

Lízis puffer: 50 mM Tris, 300 mM NaCl és 0,5 mM EDTA, pH 8,0 frissen adunk hozzá 50 mL-hez: egy spatulahegynyi RNázt, egy spatulahegynyi Lizozimot, Pefablocot, egy *SigmaFAST*TM EDTA-mentes komplex proteáz tablettát

2.3. Fehérje tisztítás

A felülúszót Ni-affinitású kromatográfiával tisztítjuk, nikkel-nitrilo-triacetsav (Ni-NTA) töltésű oszlopon. A fehérje N-terminális-végén lévő tízszeres hisztidin, imidazol gyűrűk a nikkel- ionnal való koordinációs komplex képződése által rögzülnek a tölteten.

A tisztítás megkezdése előtt az oszlopot átmoszuk 6–7 töltetnyi desztillált vízzel, és csak utána töltjük rá a felülúszót. Az oszlopot átmoszuk 4–5 töltetnyi alacsony sókoncentrációjú (LS)-pufferrel, 2 töltetnyi magas sókoncentrációjú (HS)-pufferrel, végül megint 2–4 töltetnyi LS-pufferrel. A nem specifikus enzimeket, sejtörmelékeket 20 mM-os imidazol-oldattal távolítjuk el a töltetről. A szennyező molekulák eltávolításának mértékét Bradford-reagenssel ellenőrizzük: 400–400 µL Bradford-reagenshez egy-egy csepp hozzáadásakor követjük nyomon a színváltozást. Ha a Bradford-reagens kék színűvé válik, akkor az oszlopon még szennyező fehérjemolekulák vannak. Addig folytatjuk a 20 mM-os imidazol-oldattal való mosást, míg a Bradford-reagens szürkés színe nem változik a csepp hozzáadásával. A cél fehérjét (*PcPAL* vagy *PaPAM*) 500 mM-os imidazol-oldattal eluáljuk le az oszlopról, ezt is Bradford-reagenssel követjük nyomon: addig folytatjuk a mosást, míg a Bradford-reagens szürke marad a csepp hozzáadásakor, a kék szín intenzitása a fehérje-

koncentrációt jelzi. Végül 1 M-os imidazol-oldattal mindenféle fehérjeszennyeződést eltávolítunk a töltetről, majd desztillált vízzel átmoszuk az oszlopot és 20%-os etanolban tároljuk.

A tisztítás eredményességét SDS-PAGE gélen ellenőrizzük.

Az 500 mM imidazzollal eluált fehérjeoldatot az eluált térfogatnak megfelelő 500-szoros mennyiségű 50 mM PBS pH 7,5 dializáltuk 16–18 órán át, majd a dializátumot 10 kDa vágáserértékű centrifugális töményítőcellával (Vivaspin®) töményítettük be. A bekonzentrált enzimhez 20% glicerint teszünk és –80°C-on tároljuk.

A különböző koncentrációjú imidazol-oldatok elkészítésekor LS-puffert használunk.

LS-puffer (Low Salt-puffer): pH=7,5, 50 mM HEPES, 30 mM KCl

HS-puffer (High Salt-puffer): pH=7,5, 50 mM HEPES, 300 mM KCl

Dialízis puffer (50 mM PBS): 1,23 g NH_4Cl -t, 0,51 g KCl-ot, 21,63 g NaCl-ot, 8,52 g NaH_2PO_4 -t és 46,31 g Na_2HPO_4 -t oldunk fel 4 L desztillált vízben, a pH-t pedig 8,0-ra állítjuk be.

2.3.1. Elektroforézis

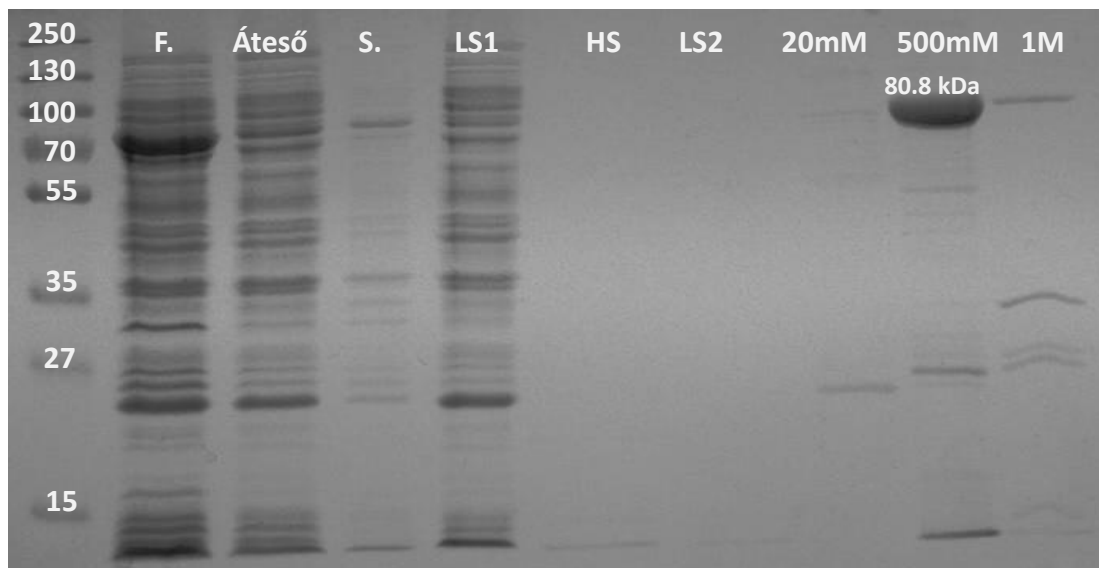
A tisztítás sikerességét nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) ellenőrizzük.

Az elektroforézis a biológiai makromolekulák meghatározásának egyik legfontosabb eszköze, elektromos tér hatására a makromolekulák molekulatömegüktől függően különböző távolságokra vándorolnak.

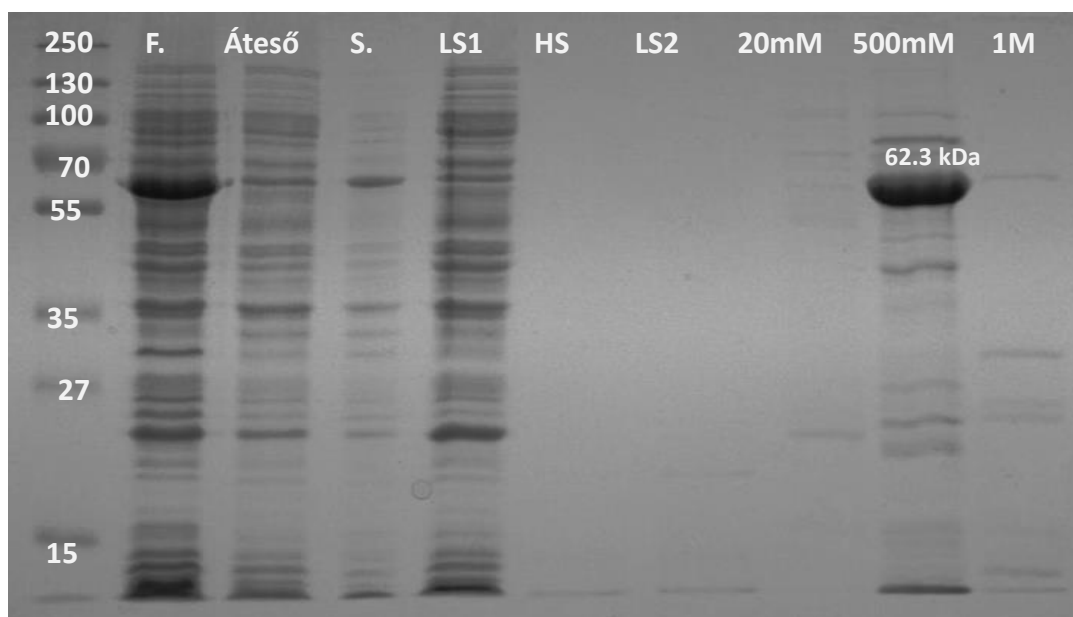
A gélöntés két részből áll: az elválasztó és a koncentrálo gél készítéséből. Az elválasztó gélbe beöntjük a készülékbe a két etanollal megtisztított üveglap közé, majd feltöltjük desztillált vízzel. A dermedési idő, a polimerizáció kb. 40 perc. A desztillált vizet leöntjük a megdermedt elválasztó gélről, majd az oldat elkészítése után azonnal ráöntjük a koncentrálo gél oldatát. A fésűt sem felejtjük el rátenni. A koncentrálo gél dermedési ideje is kb. 40 perc.

Az SDS-page mintakoktól 10–10 μL -ben feloldunk a Ni-affinitású kromatográfiával való tisztítás során nyert frakciókból 40–40 μL -t, felfőzzük a mintákat, majd a gél zsebeibe pipetázuk. Az utolsó zsebbe „létrát” teszünk, mely egy standard fehérje-sorozat. Az elektromos tér hatására az enzimek vándorolni kezdenek, a futattás után a feltett minták

vándorlási helyét összehasonlítjuk a létrával, és ebből meghatározzuk a fehérje-molekulatömegének nagyságát. Ismerve a *PcPAL* és *PaPAM* molekulatömegét, a gélkép alapján következtethetünk a tisztítás eredményességét. A gélét festjük Coomassie Brilliant Blue festékkel.



2.1.ábra. *PcPAL* gélképe



2.2.ábra. *PaPAM* gélképe

SDS-page mintakoktél: 10% 250 mM nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 10% ditiotritol, β -merkaptoetanol (DTT, β -ME), 30% 250 mM TRIS, 50% glicerin, 0.05% brómfenol-kék.

Elválasztó gél: 1100 μ L desztillált víz, 1300 μ L 1,5 M TRIS (pH: 8,8), 2500 μ L akrilamid-oldat,

50 µl SDS 10%, 50 µL ammónium-perszulfát (APS), 2 µl N,N,N',N'-tetrametiletilén-diamin (TEMED)

Az APS-t és TEMED-et közvetlenül öntés előtt adjuk az oldathoz.

Koncentráció gél: 1400 µL desztillált víz, 250 µL 1 M TRIS (pH: 6,8), 330 µL AA-oldat, 20 µL SDS 10%, 20 µL APS, 2 µL TEMED

Az APS-t és TEMED-et közvetlenül öntés előtt adjuk az oldathoz.

2.4. PcPAL és PaPAM enzimek aktivitásának igazolása

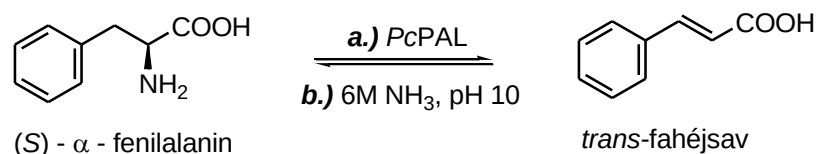
A PcPAL és PaPAM enzimek aktivitását az általuk katalizált természetes reakciójukban vizsgáltuk. A PcPAL enzim az (S)- α -fenilalanint alakítja *trans*-fahéjsavvá az ammónia nem oxidatív eliminációja során, míg a PaPAM az (S)- α -fenilalanin izomerizációját katalizálja (S)- β -fenilalaninná.

2.4.1. PcPAL katalizálta reakciók

Eliminációs és addíciós reakciók

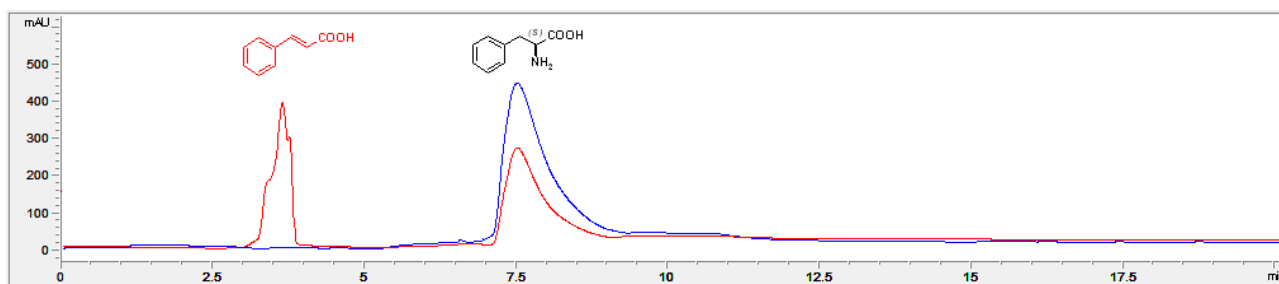
Eliminációs reakció (**a.**): 2 mg (12 mmol) (S)- α -fenilalanint beoldunk 1 mL, 0,1 M NH₄OH-oldatba (pH 8,5), majd hozzáadunk 67 µL (0,4 mg) PcPAL enzimet.

Addíciós reakció (**b.**): 2 mg (12 mmol) *trans*-fahéjsavat beoldunk 1 mL, 6 M NH₄OH-oldatba (pH 10), majd hozzáadunk 67 µL (0,4 mg) PcPAL enzimet.



2.3.ábra. PcPAL eliminációs és addíciós reakciója

Az átalakulásokat királis HPLC segítségével követtük nyomon. Chiralpack ZWIX(+) királis oszlopot használtunk, a mozgó fázisként MeOH(50mM FA+25mM DEA):ACN:H₂O 49:49:2 keverékét.

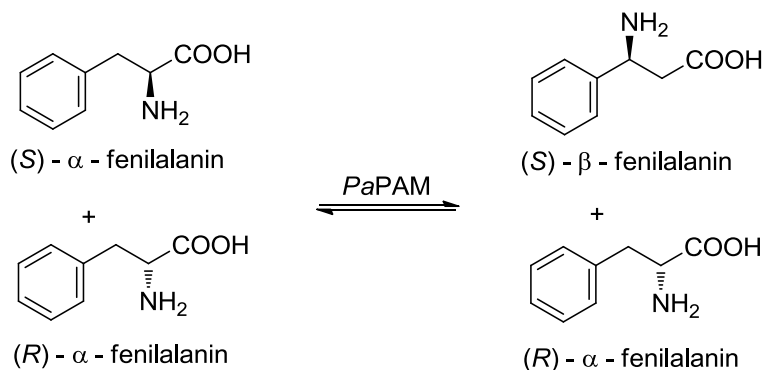


2.4.ábra. Az (S)- α -fenilalanin illetve a trans-fahéjsav kromatográfiás spektruma. Az (S)- α -fenilalanin maximális elnyelési hullámhossza 210nm (kék), a trans-fahéjsavnak pedig 260 nm (piros)

2.4.2. PaPAM katalizálta átalakulások

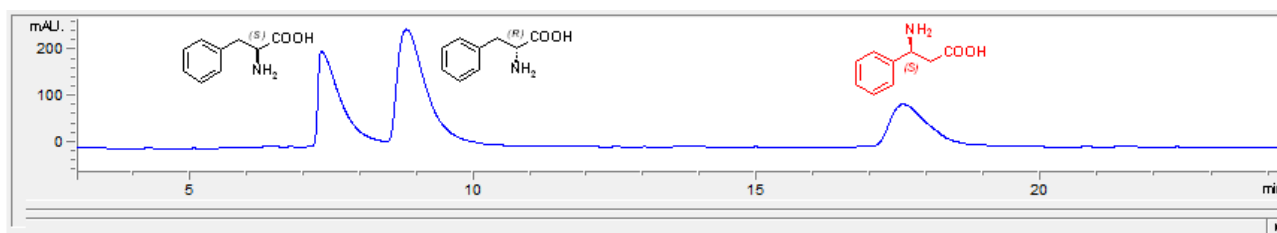
a. A rac- α -fenilalanin aminocsoportjának az izomerizációja

2 mg (12 mmol) rac- α -fenilalanint beoldunk 1 mL 0,1 M NH_4OH -oldatban (pH 8,5), majd hozzáadunk 100 μL (0,6 mg) PaPAM enzimet.



2.5.ábra. A PaPAM katalizálta rac- α -fenilalanin izomerizációja

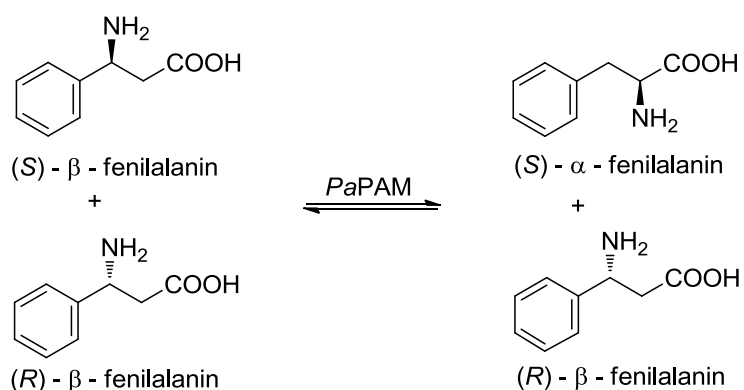
Az átalakulásokat ebben az esetben is királis HPLC segítségével követtük nyomon.



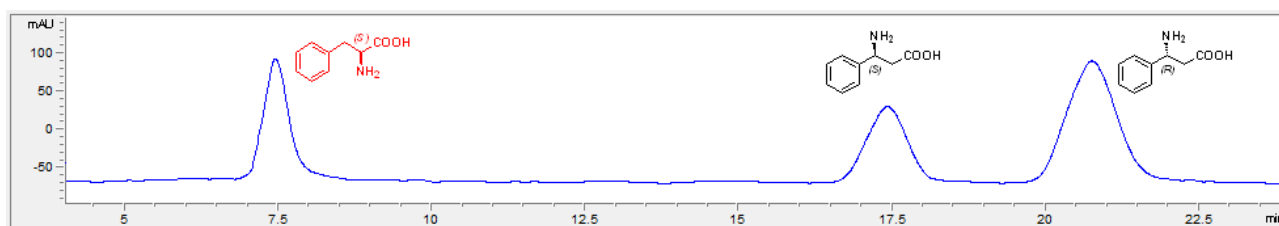
2.6.ábra. A rac- α -fenilalanin átalakulása PaPAM jelenlétében. A reakció 17 óra elteltével.

b. A *rac*- β -fenilalanin aminocsoportjának az izomerizációja

2 mg (12 mmol) *rac*- β -fenilalanint beoldunk 1 mL 0.1 M NH_4OH -oldatban (pH 8,5), majd hozzáadunk 100 μL (0,6 mg) PaPAM enzimet.



2.7.ábra. A PaPAM katalizálta *rac*- β -fenilalanin izomerizációja.



2.8.ábra. A *rac*- β -fenilalanin átalakulása PaPAM jelenlétében. A reakció 19 óra elteltével.

A PaPAM által katalizált reakciónál azt észleltük, hogy az (S)- α - illetve az (S)- β -fenilalanin közt beáll egy egyensúly, amelyet többszörös enzim mennyiséggel sem változott.

3. Következtetések

Sikerült nagy tisztaságú *PcPAL* és *PaPAM* enzimet előállítani. A tisztaságot elektroforézissel ellenőriztük, az enzimek aktivitását pedig az általuk katalizált természetes reakciójukban vizsgáltuk, fordított fázisú HPLC-vel követtük nyomon az átalakulásokat.

A *PcPAL* enzim katalizálja az (*S*)- α -fenilalaninból az ammónia eliminációját, de ugyanakkor az ammónia *trans*-fahéjsavra történő addícióját is, körülményektől függően.

A *PaPAM* enzim katalizálja az (*S*)- α -fenilalanin és az (*S*)- β -fenilalanin izomerizációját is.

A *PAL* és *PAM* enzimek biokatalizátorként, illetve enantiomertiszta aminosavszármazékok előállítására alkalmazhatóak.

További terveink között szerepel a reakciók preparatív léptékben való kiterjesztése, illetve a *PaPAM* katalizálta reakciókban a fellépő egyensúly eltolása.

Irodalmi jegyzék:

- [1] Poppe László, Rétey János, Újabb eredmények a szintetikus biokatalízis terén: a fenilalanin ammónia-liáz reakció vizsgálata és alkalmazása, *A Magyar Biokémiai Egyesület tájékoztatója*, **2003**, 3, 57-64
- [2] http://technologia.chem.elte.hu/hu/zoldkemia/06_Katalizis_Bio.pdf
- [3] <http://taplalkozas.bioenergetikus.hu/enzimek.php>
- [4] http://www.nyf.hu/others/html/biologia_intezet_elemei/biokemia/5/enzimek.ppt
- [5] <http://www.och.bme.hu/ifj-nagy/Biomol/b-5-enzm.pdf>
- [6] Bian Wu, Wiktor Szymanski, Matthew M. Heberling, Ben L. Fering, Dick B. Janssen, Aminomutases: mechanistic diversity, biotechnological applications and future perspectives, *Trends in Biotechnology*, **2011**, 7, 352-362
- [7] Andreas Gloge, Jerzy Zon, Ágnes Kövári, László Poppe, János Rétey, Phenylalanine Ammonia-Lyase: The Use of Its Broad Substrate Specificity for Mechanistic Investigations and Biocatalysis – Synthesis of L-Arylalanines, *Chem. Eur.*, **2000**, 18, 3386-3390
- [8] Christopher Chesters, Matthew Wilding, Mark Goodall, Jason Micklefield, Thermal Bifunctionality of Bacterial Phenylalanine Aminomutase and Ammonia Lyase Enzymes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 4344-4348
- [9] Christoph Appert, Elke Logema, Klais Hahlbrock, Jurg Schmid, Nikolaus Amrhein, Structural and catalytic properties of four phenylalanine ammonia lyase isoenzymes from parsley, *Eur. J. Biochem*, **1994**, 225, 491-499
- [10] Jian-Dong Cui, Si Zhang, Li-Mei Sun, Cross-Linked Enzyme Aggregates of Phenylalanine Ammonia Lyase: Novel Biocatalysts for Synthesis of L-Phenylalanine, *Appl Biochem Biotechnol*, **2012**, 167, 835-844
- [11] Christopher L. Steele, Yijun Chen, Brian Dougherty, Wenying Li, Sandra Hofstead, Kin Lam, Zizhuo Xing, Shu-Jen Chiang, Purification, cloning, and functional expression of phenylalanine aminomutase: The first committed step in Taxol side-chain biosynthesis, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2005**, 438, 1-10
- [12] Merrick, J., Aspler, S. & Schwarz, G., Phenylalanine-restricted diet should be life long. A case report on long-term follow-up of an adolescent with untreated phenylketonuria, *Int. J. Adolesc. Med. Health.*, **2003**, 15, 165-168
- [13] Harding, C. O., Neff, M., Jones, K., Wild, K. & Wolff, J. A., Expression of phenylalanine hydroxylase (PAH) in erythrogenic bone marrow does not correct hyperphenylalaninemia in *Pahenu2* mice, *J. Gene Med*, **2003**, 5, 984-993

- [14] Sarkissian, C. N., Shao, Z., Blain, F., Peevers, R., Su, H., Heft, R, Chang, T. M. & Scriver, C. R., A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 2339-2344
- [15] Sebastian Bartsch, Gjalt G. Wybenga, Maaike Jansen, Matthew M. Heberling, Bian Wu, Bauke W. Dijkstra, Dick B. Janssen, Redesign of a Phenylalanine Aminomutase into a Phenylalanine Ammonia Lyase, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2013**, 438, 1-10
- [16] Ritter H., Schulz G. E., Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase, *Plant Cell*, **2004**, 16, 3426-3436
- [17] Calabrese J. C., Jordan D. B., Bodhoo A, Sariaslani S., Vanelli T., Crystal structure of phenylalanine ammonia-lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis, *Biochemistry*, **2004**, 43, 11403-11416
- [18] Röther, D., Merkel, D., Rétey, J., Spectroscopic evidence for a 4-methylidene imidazol-5-one in histidine and phenylalanine ammonia-lyases, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl*, **2000**, 39, 2462–2464
- [19] Walker Kevin D., Klettke Karin, Akiyama Takumi, Croteau, Rodney, Cloning, Heterologous Expression, and Characterization of a Phenylalanine Aminomutase Involved in Taxol Biosynthesis, *J. of Biol. Chem* , **2004**, 279 (52), 53947–53954
- [20] Nicholas J Turner, Ammonia Lyases and aminomutases as biocatalysts for the synthesis of α -amino and β -amino acids, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2011**, 15, 1-7