

A 37. OTDK
KÉMIAI ÉS VEGYIPARI SEKCIÓ



**Adatbázisból felderített, új aromás ammónia-liáz szubsztráttartományának
feltérképezése és katalitikus hatékonyságának növelése**

TDK dolgozat

Szerző: Ágoston Gyopárka

MSc hallgató, Nano- és bioanyagok kémiája és technológiája, első év, Kémia és Vegyészmérnöki Kar,
Babeş-Bolyai Tudományegyetem

Témavezető: Dr. Bencze László-Csaba¹, Tomoiagă Raluca-Bianca², Boros Krisztina²

¹Egyetemi docens, Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutatóközpont, Kémia és Vegyészmérnöki Kar,
Babeş-Bolyai Tudományegyetem

²PhD hallgató, tudományos segédmunkatárs, Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutatóközpont, Kémia és
Vegyészmérnöki Kar, Babeş-Bolyai Tudományegyetem

Lezárva: 2024. május 24.

Tartalmi összefoglaló

Egy, a közelmúltban megjelent közleményben egy új típusú aromás ammónia-liázt mutattak be, az AL, mely szokatlanul magas, 92%-os konverzióval alakítja át a 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsavat 3,4-dimetoxi-L-fenilalaninná.[1] Kutatómunkánk során adatbányászati eszközöket felhasználva, azonosítottuk az AL-11 egy közeli rokonát, a *Loktanella atrilutea*-ból kinyert aromás ammónia-liázt (*LaAAL*). A két új fehérje katalitikus központjában fellelhető egyedi motívumok alapján feltételezhető, hogy ezek egy új PAL alosztályba tartoznak. Az evolucionáris kapcsolatok felderítésére filogenetikai analízist végeztünk a két enzim és hasonlóságvizsgálat során kiválasztott homológjaik, valamint ismert fenilalanin-, hisztidin- és tirozin ammónia-liázok szekvenciáit felhasználva. Emellett, a homológok katalitikus központjának összehasonlítása alapján, az *LaAAL* szerkezetének racionális áttervezését kíséreltük meg, megfigyelve a mutánsok aktivitását a 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsav és a 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin közötti ammónia addíciós és eliminációs modell reakciók során. Az enzim további karakterizálása céljából, meghatároztuk ennek optimális működési körülményeit a modell folyamatban, valamint szubsztráttartományának feltérképezése céljából ellenőriztük aktivitását több mono-, di- és poli-szubsztituált L-fenilalanin származékok szintézisében.

Tartalomjegyzék

1. Elméleti bevezető.....	4
2. Célkitűzések.....	10
3. Anyagok és módszerek	10
3.1 Filogenetikai analízis	10
3.2 Pontmutációk bevezetése.....	11
3.3 Plazmidok transzformációja különböző gazdasejtekbe és kolónia PCR	11
3.2 Fehérje termelés.....	13
3.5 Konverzió-alapú aktivitás vizsgálat egész-sejtes reakciókban	13
3.6 A mutáns és natív <i>LaAAL</i> konverzió-alapú aktivitásának vizsgálata	13
3.7 A rekombináns <i>LaAAL</i> izolálása és tisztítása	14
3.8 Az <i>LaAAL</i> optimális működési körülményeinek meghatározása	15
3.8.1 Aktivításvizsgálat spektrofotometriás módszerrel	15
3.8.2 A protein olvadáspontjának vizsgálata a reakcióközeg függvényében	15
3.8.3 Konverzió-alapú aktivitás vizsgálata a hőmérséklet függvényében.....	15
3.9 Szubsztráttartomány feltérképezés	16
3.10 Kinetikai paraméterek meghatározása	17
4. Eredmények	17
4.1 Szekvencia összerendezés és filogenetikai analízis.....	18
4.2 Mutagenézis.....	20
4.3 Transzformálás és fehérje termelés	22
4.4 Konverzió-alapú aktivitás vizsgálat egész-sejtes reakciókban	22
4.5 Rekombináns <i>LaAAL</i> izolálása és tisztítása.....	24
4.6 Az <i>LaAAL</i> optimális működési körülményeinek meghatározása	25
4.6.1 A pH hatása	25
4.6.2 A hőmérséklet hatása.....	27
4.7 Szubsztráttartomány feltérképezés	27
4.8 Kinetikai paraméterek meghatározása	28
5. Összefoglaló	29
6. Köszönetnyilvánítás.....	31
7. Irodalomjegyzék	32
Függelék	33

1. Elméleti bevezető

A 20 természetes α -aminosav a fehérjék felépítésében betöltött szerepük mellett, több funkcióval is rendelkezik a szervezetben, mint biológiailag aktív anyag. Szerepkörükbe tartozik például az optimális ozmotikus koncentráció fenntartása, indirekt energiaforrásként szolgálnak egyes folyamatokban és értékes anyagok kialakításában is részt vesznek különböző emésztési útvonalak során.[2,3] Mivel az élőlényekben fellépő emésztési és szabályozási folyamatok érzékenyek a molekulák kiralitására, a glicinen kívül, mely nem rendelkezik aszimmetrikus központtal, a legtöbb természetes aminosav L-enantiomerként jelenik meg az élővilágban.

Biológiai aktivitásukból következően, az enantiomertiszta L-aminosavak szintézise kiemelkedő helyet foglal el a gyógyszeripar, az agrokémia és az élelmiszeripar fejlődésében,[4] ugyanakkor ezen királis molekulák építőelemként szolgálnak a peptid alapú hatóanyagok előállításában. Azonban a mindössze 20 természetes α -aminosav jelentősen korlátozza az előállításra kívánt anyagok szerkezeti variációit, éppen ezért elengedhetetlen a nem-kanonikus enantiomertiszta aminosavak készletének feltérképezése, mivel magas fokú diverzitásukkal hozzájárulnak az aktív összetevők számának bővítéséhez.[5]

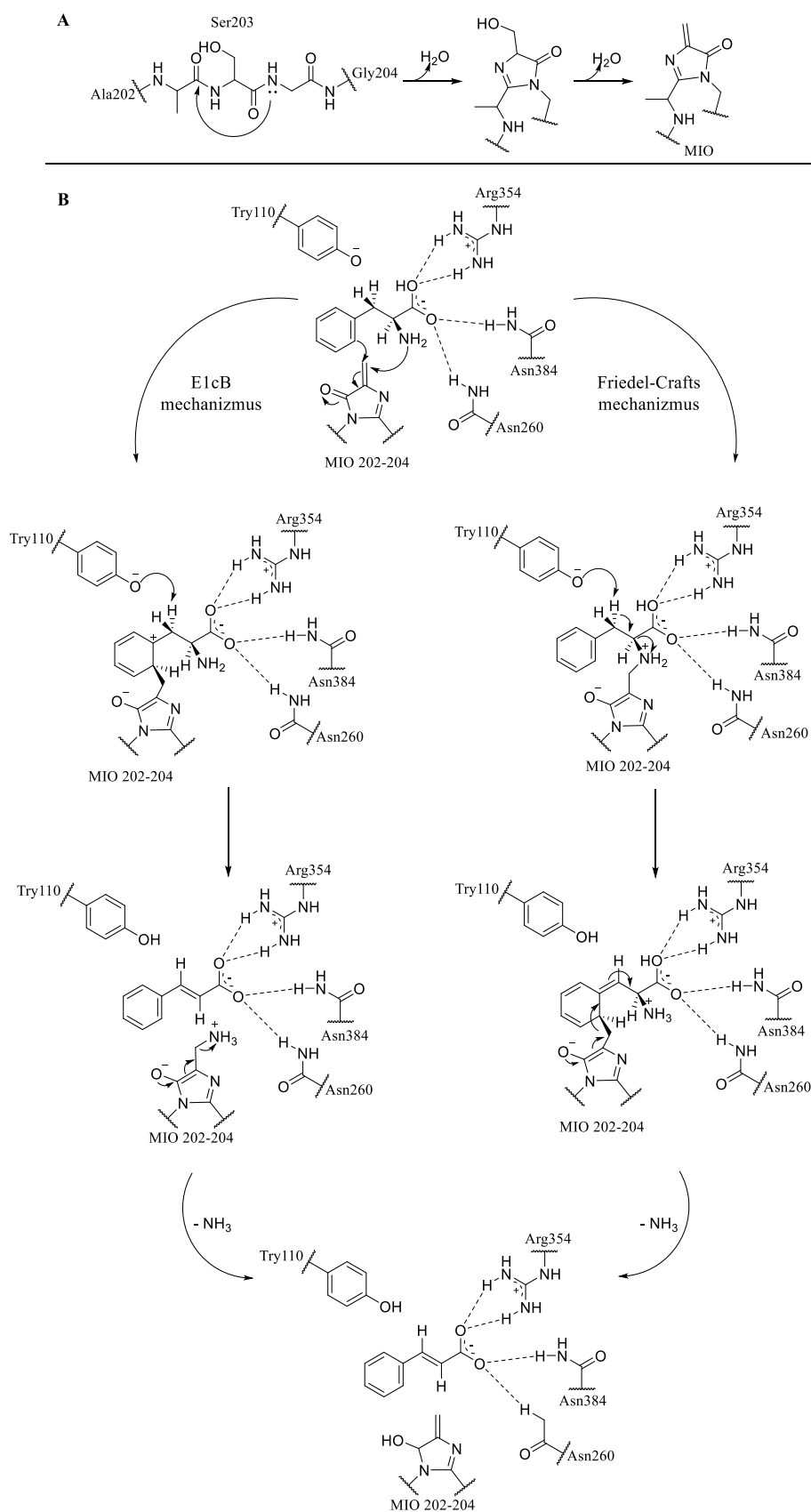
A nem-kanonikus aminosavak közül, nagymértékű jelentőségnek örvendenek az L-fenilalanin elektrondonor szubsztituensekkel rendelkező polisubsztituált deriváltjai, különösképpen a 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin, mely széles körben felhasználható több jelentős biológiai aktivitással rendelkező molekula szintézisében. Az említett molekula prekursora a Parkinson-kór kezelésére kifejlesztett hatóanyagnak, az L-DOPA-nak, emellett építőelemként szolgál többek között izokinolin származékok, királis katalizátorok, bisz-amino-acilált transzfer RNS-ek és egyes rák elleni diródium-komplex molekulák előállítási folyamataiban is.[6] Az említett aminosav előállítására egyelőre a klasszikus kémiai szintézis módszereit alkalmazzák. Magas hozammal érhető el az enantiomertiszta termék ruténium, ródium és nikkel komplexek által katalizált aszimmetrikus hidrogénezés által, viszont a több lépésből álló folyamatok során elkerülhetetlen a szélsőséges nyomás és hőmérséklet, illetve a gyúlékony oldószerek (pl. toluol, tetrahidrofurán) használata, valamint a nemkívánatos melléktermékek keletkezése.[3,7] Környezetkímélőbb és nagyobb atomhatékonysággal végbemenő folyamatok kidolgozása céljából, napjainkban egyre nagyobb figyelem irányul a nem-természetes, enantiomertiszta aminosavak biokatalizátorok segítségével történő előállítására. Elterjedt módszer az aciláz és proteáz enzimek felhasználása, azonban ezek kinetikus rezolváláson alapuló folyamatok, melyek maximális elméleti hozama 50%, hiszen a biokatalizátorok a racém elegyből kiindulva állítják elő szelektíven a hasznos enantiomert.[8]

A biokatalízisen alapuló aszimmetrikus szintézis alkalmazása egy 100%-os elméleti hozammal rendelkező megoldást kínál az említett problémára.[9] Több enzimescsoport alkalmazható katalizátorként az említett folyamatban, így például mutált aszpartát aminotranszferáz enzimet felhasználva 15 órás reakcióidő után 95,4%-os konverzióval termeltek 99% feletti enantiomertisztasággal rendelkező 3,4-dimetoxi-L-fenilalanint, 3,4-dimetoxifenil-piroszölősavból és L-aszparaginsavból kiindulva. Mivel a szükséges piroszölősav származék tiszta állapotban igen költséges, szintézisét három lépéses klasszikus kémiai módszerrel helyben végzik el, mely lényegesen hosszabbá teszi a folyamatot.[10]

Egy másik enzimescsoport, mely jövedelmezőnek mutatkozik aromás L-fenilalanin származékok előállítására az aromás ammónia-liázok (AAL) csoportja. A csoport tagjai közé tartoznak a fenilalanin ammónia-liázok (PAL), a hisztidin ammónia-liázok (HAL) és a tirozin ammónia-liázok (TAL). Az ammónia-liáz enzimek ezen alosztálya az ammónia reverzibilis eliminációs reakcióját katalizálja L-fenilalanin, -hisztidin és -tirozin esetén *transz*-fahéjsavat, *transz*-urokánsavat és *transz-para*-kumársavat eredményezve.[4] Megfelelő mennyiségű ammónia felesleg (2-8 M ammónia oldat) mellett az egyensúlyi reakció iránya eltolható az L-aminosavak előállítása felé, így megalapozva a körülményeket egy magas sztereoszelektivitással rendelkező előállítási folyamathoz.

Mivel az L-aminosavak ammónia eliminációs reakciója alacsony savasságú β -proton leszakításával jár, ezen enzimek katalitikus szitusában fellelhető egy hangsúlyozott elektrofil jelleggel rendelkező 5-metilidén-1,5-dihidro-4H-imidazol-4-on (MIO) prosztetikus csoport, mely autokatalizált módon, poszttranszlációs ciklizáció során alakul ki az alanin-szerin-glicin (egyes esetekben treonin-szerin-glicin) aminosav triádból két víz molekula kilépésével (**1. ábra - A**). A prosztetikus csoport erős elektrofil jellegét annak köszönheti, hogy a rajta lévő nitrogén szabad elektronpárjainak delokalizációja egy α,β -telítetlen-karbonil rendszer kialakítására blokkolva van, továbbá egy nukleofil addíciója során az imidazolon aromás jellegűvé válik. Az enzimatis reakció mechanizmusa során a MIO csoport és az aromás-aminosav szubsztrát amino csoportja nukleofil támadása révén kialakul egy amino-MIO kovalens adduktum, így jelentősen növelve a szubsztráton lévő leszakítandó β -proton savasságát.

Két féle mechanizmussal magyarázható a lejátszódó folyamat (**1. ábra - B**). Az E1cB mechanizmus alapján az adduktum létrejöttékor a MIO csoport benzil pozícióban kapcsolódik az aromás szubsztráthoz, mely a katalitikus zsebben lévő más aminosav végződés hatására deprotonálódik. Egy karbanion-intermedier állapot kialakulása után az adduktum szétválik és ammónia szabadul fel.[5,6] Egy másik, alternatív megközelítés alapján a MIO csoport a szubsztrát amino-csoportján keresztül alakítja ki az adduktumot, majd egy Friedel-Crafts típusú támadás megy végbe a szubsztrát aromás gyűrűjének *orto* pozíciójában.[9] A két javasolt mechanizmus közül a jelenlegi kísérleti eredmények alapján az E1cB, amino-MIO adduktum létrejöttét feltételező, reakciómechanizmus az elfogadottabb.[4]



1. ábra - (A) A MIO csoport kialakulása. (B) A MIO család enzimeinek mechanizmusa a *Petroselinum crispum*-ból származó PAL esetében bemutatta, az ammónia eliminációs reakció irányban.

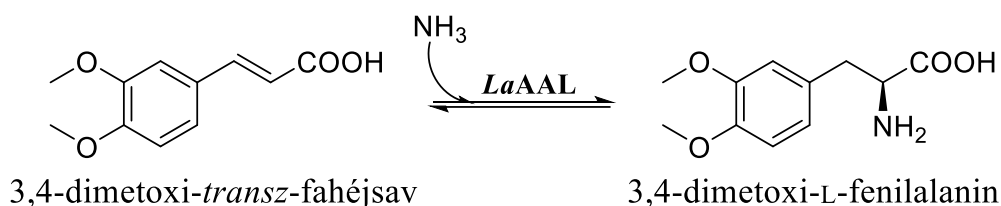
A PAL-ok az ammónia nem-oxidatív, reverzibilis addícióját katalizálják különböző szubsztituensekkel ellátott *transz*-fahéjsav származékokból megfelelő L-aminosavakat eredményezve. Az elmúlt évtizedekben nagy figyelem irányult ezekre a biokatalizátorokra, így a szakirodalom részletesen tárgyalja több eukarióta vagy bakteriális forrásból származó PAL szubsztrátspecifitását és szubsztráttartományuk bővítésének lehetőségét a katalitikus központ felderítése és mutációk bevezetése révén.[11,12] Monoszubsztituált aromás *transz*-fahéjsav származékok esetén magas konverziókat értek el a *Petroselinum crispum*-ból kinyert PcPAL racionális tervezése során nyert biokatalizátor segítségével, valamint a fehérjemérnökség módszereinek alkalmazásával kifejlesztett *Arabidopsis thaliana*-ból (AtPAL) és a *Rhodospiridium toruloides*-ből (RtPAL) származó mutáns PAL enzimek használata révén.[11] Mindazonáltal, legfőbb hiányossága az említett enzimcsoportnak, hogy az eddigi kutatások alapján alacsony aktivitást mutat az aromás gyűrűn di-, és tri-szubsztituált elektrondonor szubsztituenseket tartalmazó szubsztrátok átalakítására, mely problémát ez idáig nem sikerült kiküszöbölni a fehérjemérnökség módszertárával. A fenntartható fejlődés szempontjából ezen molekulák AAL-okkal való biotranszformációja nagy jelentőséggel bír, mivel építőelemei a lignin természetes polimernek, mely a növényi rostok stabilitásának kialakulásban játszik szerepet.[13] A lignin nagy mennyiségben fellelhető a növényi biomasszában, valamint a papírgyártáskor keletkező hulladék vízben is, tehát a PAL-ok szubsztráttartományának sikeres bővítése révén lehetővé válik értékes gyógyszeripari és agrokémiai alapanyagok előállítása, környezetkímélő és költséghatékony módon. Az eddigi legmagasabb hatásfokot (18%) a 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsav 3,4-dimetoxi-L-fenilalaninná való ammónia addíciós reakciója során az AtPAL L133A/I461V mutánsával érték el,[11] mely megegyezik a korábban publikált *Planctomyces brasiliensis*-ből kinyert PbPAL F113Y/L114I mutánsa által demonstrált konverzióval.[14] A racionális tervezési módszer a PAL-ok hidrofób központjában fellelhető sztérikus gátlást okozó aminosavak cseréjén alapult. A széles körben kutatott PcPAL katalitikus zsebében, a *meta* pozícióban szubsztituált fenilalanin származékok esetén, a 134-es leucin, a *para* helyzetnél a 137-es fenilalanin és a 460-as izoleucin, míg az *orto* pozícióban szubsztituált szubsztrátoknál a 259-es valin mutatkoztak befolyással rendelkező aminosav végződésnek.

A közelmúltban leírtak egy, új típusú aromás ammónia-liázt az AL-11-et, mely szokatlanul magas, 92%-os konverzióval alakítja át a 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsavat 3,4-dimetoxi-L-fenilalaninná.[1] Az AL-11-hez hasonló, a di-, és tri-szubsztituált *transz*-fahéjsav származékok felé magas aktivitással rendelkező biokatalizátorok felderítése érdekében adatbányászati eszközöket felhasználva a Babeş–Bolyai Tudományegyetem, Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutatóközpont munkatársai találtak egy, a *Loktanella atrilutea*-ból kinyerhető ammónia-liázt (LaAAL), mely ígéretesnek bizonyul ezen kutatás céljából.[15]

Az AL-11 és az *LaAAL* katalitikus központjában felfedezett egyedi motívumok alapján feltételezhető, hogy egy új PAL alosztályba tartoznak[15]. Annak érdekében, hogy fényt derítsünk ezen enzimek pontos funkciójára, valamint felderítsük a fennálló evolucionáris kapcsolataikat filogenetikai analízist végeztünk el az *LaAAL* és kiválasztott homológjai, valamint ismert PAL, TAL és HAL enzimek aminosav szekvenciáit felhasználva. A filogenetikai analízis biológiai entitások közötti leszármazási kapcsolatok feltérképezésére alkalmas módszer. Alapjául különböző statisztikai számítások szolgálnak, melyek a vizsgált információk összehasonlítását, valamint az egyes hasonló jelentőséggel rendelkező aminosav-elemek felcserélhetőségét veszik számításba.[16] A generált modell minden adathalmazra egyedi és az összefüggéseket a valószínűség függvényében ábrázolja. Munkánk során, a kiválasztott fehérjék aminosav szekvenciáit gyűjtöttük össze adatbázisokból és ezek összerendezése révén vizsgáltuk az *LaAAL* és homológjai közti evolucionáris kapcsolatokat, valamint a katalitikus központban elhelyezkedő, a szubsztrátspecifitást befolyásoló aminosavak változását az egyes, vizsgálatban szereplő szekvenciákban.

Megfigyeléseink alapján, három mutáns fehérjét terveztünk meg és hoztunk létre irányított mutagenézis révén, polimeráz-láncreakciót (angolul Polymerase Chain Reaction - PCR) és a megaprimer módszert alkalmazva.[17] A PCR során egy célzott DNS szekvencia sokszorosítása megy végbe, hőálló DNS polimeráz által katalizált enzimatisz szintézis során. Megfelelő hőmérsékleten, a dupla szálú DNS denaturálódik és a láncokhoz két előre megtervezett komplementer oligonukleotid, úgynevezett primer kapcsolódik. A primerpár kijelöli a polimeráz számára a felsokszorosítandó DNS fragmentum hosszát, melynek másolatait az enzim az oldathoz adagolt dezoxinukleotid trifoszfát (dNTP) készletből épít fel.[18] A mutációk bevitele a szekvenciába a primereken keresztül történik, a komplementer szakaszba tervezett változtatás (kodon csere) segítségével. A megaprimer módszer az egyik legegyszerűbb és legflexibilisebb módja a helyspecifikus mutagenézis megvalósításának.[19] A hagyományos módszerekkel ellentétben, kezdetben két nem átfedő primert használunk fel, melyek közül a kívánt mutációt csak az egyikbe szükséges bevinni (mutagén primer), míg a másik általában egy úgynevezett csendes (silent) primer, mely az adott DNS-en belül tervezéstől függően több pozícióban is odailleszthető (ezáltal különböző méretű megaprimerpárok generálhatók) és felhasználható más mutagén primerrel párosítva több típusú mutáció bevitelére, ha ezek elhelyezkedése megfelelő. A PCR reakció első lépéseiben a két nem átfedő oligonukleotidból létrejön a szensz és antiszensz megaprimer, melyek a két kezdeti primer egymás közötti távolságától függően lehetnek kicsi, közepes vagy nagy méretűek. A folyamat második felében a keletkezett megaprimerok lehetővé teszik a plazmid DNS sikeres felsokszorosítását.[17] A kinyert mutánsok konverzió-alapú aktivitását a natív enzimével szemben nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (angolul Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography - RP-HPLC)

segítségével mértük és hasonlítottuk össze a 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsav és 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin közötti ammónia addíciós és eliminációs reakciókban (**2. ábra**).



2. ábra - A 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsav LaAAL által katalizált 3,4-dimetoxi-L-fenilalaninná való biotranszformációja.

Az LaAAL karakterizálásának érdekében, vizsgáltuk ennek optimális működési körülményeit a 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsav és 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin közötti modell reakcióban (**2. ábra**), figyelembe véve a pH és ammónia forrás, valamint a hőmérséklet hatását az enzim aktivitására és stabilitására, mind az ammónia addíciós, mind az ammónia eliminációs irány esetében. A specifikus aktivitás meghatározására spektrofotometriás módszert alkalmaztunk, emellett a konverzió-alapú aktivitását is monitorizáltuk RP-HPLC-vel. A reakció környezet a protein hajtogatott szerkezetére (angolul protein fold) gyakorolt hatását az olvadáspont (T_m) differenciális pásztázó fluorimetriával (angolul differential scanning fluorimetry - DSF) való mérésével követtük. Egy fehérje olvadáspontja az a hőmérséklet, melyen a protein 50%-ban hajtogatott, 50%-ban kinyílt formában van jelen. A DSF költséghatékony és könnyen implementálható módszer, mely során a minta fluoreszcencia-emissziójának változását mérjük a hőmérséklet függvényében. A fehérje mintához kis mennyiségben hidrofób festékanyagot adagolunk, majd megfelelő energiájú fénnel sugározzuk be. A növekedő hőmérséklet hatására a festékanyag fluoreszcenciás tulajdonságú komplexet képez a kibomló protein belsejében fellelhető hidrofób aminosav végződésekkel, így az emisszió mértékének követésével meghatározható a protein olvadási hőmérséklete.[20]

Az optimális reakciókörülmények meghatározását követően, az LaAAL szubsztráttartománya került feltérképezésre a szintetikus szempontból kiemelkedő jelentőségnek örvendő ammónia addíciós reakcióút esetében, ahol az enzim számos, mono-, di- és poli-szubsztituált, elektron-donor és elektron-akceptor szubsztituensekkel ellátott *transz*-fahéjsav származék felé mutatott konverzió-alapú aktivitását kvantifikáltuk. További vizsgálatok során a természetes AAL szubsztrátok (L-fenilalanin, L-hisztidin és L-tirozin), valamint a magas konverzió értéket eredményező L-fenilalanin származékok esetén a Michaelis-Menten kinetikai paraméterek is meghatározásra kerültek. A Michaelis-Menten állandó (K_M) azon szubsztrát koncentráció értéket határozza meg, melyen a reakció sebessége eléri a maximum sebesség felét, így az enzim affinitásról ad információt az adott szubsztrát felé. Az átviteli szám (angolul turnover number - k_{cat}) adott egységnyi enzimmennyiség által átalakított szubsztrátmolekulák maximális számát írja le, míg

az átviteli szám és a Michaelis-Menten állandó hányada információval szolgál a biokatalizátor katalitikus hatékonyságáról.[21]

2. Célkitűzések

A Babeş–Bolyai Tudományegyetem, Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutatóközpontban végzett kutatásunk célkitűzése a közelmúltban felfedezett *Loktanella atrilutea*-ból kinyert aromás-ammónia-liáz karakterizálása, valamint a hozzá hasonló, elektron-donor szubsztituensekkel ellátott szubsztrátok átalakítására alkalmas új AAL-ok feltérképezése és szerepük vizsgálata.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Filogenetikai analízis

A filogenetikai analízishez szükséges adatbázis összeállításához, először BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) hasonlóságvizsgálatot alkalmaztunk (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) az *LaAAL* aminosav szekvenciáját összevetve az NCBI (National Center for Biotechnology Information) teljes szekvencia adatbázisával és kiválasztottuk azokat a magas lefedettségű homológokat, melyek legkevesebb 60%-os azonosságot mutattak és E szám értékük zéróval volt egyenlő, tehát egyedi, szignifikáns találatok voltak. Ezen enzimeket a MEGA-11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programban vetettük össze a szakirodalomból kiválasztott HAL-, TAL- és PAL-okkal. Az aminosav szekvenciák összerendezése a MUSCLE (MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation) módszert alkalmaztunk, mely különböző mérések alapján a legnagyobb pontossággal rendelkezik a többszörös aminosav szekvencia összerendező módszerek közül.[22] Az összerendezett sorra modell optimalizálást végeztünk el a MEGA-11 beépített rendszere segítségével, mely alapján a legnagyobb valószínűsége alapján alapuló módszer keretein belül, LG helyettesítési mátrixot[23] alkalmaztunk (LG+F), ahol a pozíciók mutációgyakoriságának heterogenitása gamma eloszlású és invariáns (G+I).

Az végrehajtott analízist 100-as bootstrap értékekkel végeztük el, mely alapján 100 alkalommal kerül megszerkesztésre a filogenetikai diagram és minden elágazás esetén megjelenik azon alkalomnak az aránya, melyek során ugyanaz a variáns jött létre, így gyakorlatilag ezek az értékek bizonyítják a generált diagram létezésének valószínűségét. A kapott törzsfa optimalizálásának érdekében Russo és Selvatti[24] által publikált protokoll alapján a RogueNaRok (<https://rnr.h-its.org/>) program segítségével kizártuk azokat a szekvenciákat az adathalmazból, melyek pozíciója nem teljesen biztos (az alacsony valószínűségi arány miatt), így negatívan járulnak hozzá a törzsfa rendezettségéhez.

3.2 Pontmutációk bevezetése

Az LaAAL és homológjai között szekvencia összerendezést végeztünk a Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) program segítségével és kiemeltük a PAL-ok esetén már széles körben tanulmányozott aminosavakat, melyek nagy jelentőséggel bírnak a katalitikus központ, szubsztrátspecifitását felelős, hidrofób részének kialakításában (**4. táblázat**).

A három mutáns enzim megvalósítását pontmutációk révén értük el, melyekhez szükséges volt az **1. táblázat**-ban felsorolt primerek megtervezése.

1. táblázat - A pontmutációk végrehajtásához tervezett primerek.

Primer neve	Szekvencia	T _m (°C)
A81S_F	5'-ATTGATGTGCAGAAAATTCGCTGTGGC-3'	65
Q84H_F	5'-TGTGGCACCATAAAAGCACCACCG-3'	66
N199S_F	5'-TAGCTCTGGTCAATGGAACCGGC-3'	65,8
I400L_F	5'-AGCCTGCATCTTGGCATGAATCAGATG-3'	66
Small_LN_R	5'-ATCTGATCGCGCGCTAAGTTGGC-3'	66
Small_IR_R	5'-TTGCCGCGGCTGCCAATATCC-3'	66

A PCR reakciók elvégzéséhez összekevertünk 100 ng templát DNS-t, 2,5 µL (500 nM végkoncentrációban) mutagén primer párt (forward és reverse primert), 0,1 µM dNTP-t, 1 U Phusion High Fidelity DNS polimeráz enzimet és 2% DMSO-t (dimetil-szulfoxid) a polimeráznak megfelelő puffer oldatban, feltöltve a keveréket 50 µL végtérfogatig steril vízzel. A PCR reakció protokollja a **2. táblázat**-ban van összefoglalva.

2. táblázat - A PCR protokoll szakaszai.

	T (°C)	Idő	Ciklusok száma	Lépés
Kezdeti denaturálás	95	3 perc	1	Megaprimer kialakítása
Primer kapcsolódás	95	30 mp	5	
	64	1 perc		
Lánchosszabbítás	72	1 perc		
Kapcsolódás	95	30 mp	25	Kívánt szekvencia amplifikálása
Lánchosszabbítás	72	8 perc		
Végso lánchosszabbítás	72	16 perc	1	

3.3 Plazmidok transzformációja különböző gazdasejtekbe és kolónia PCR

A natív LaAAL és a mutánsok génjét kódoló pET-15b plazmidokat két különböző törzsbe tartozó, kompetens, újrakódolt *Escherichia coli* (*E. coli*) gazdasejtbe (BL21 Gold (DE3), illetve Rosetta (DE3)

pLysS) transzformáltuk. A folyamat összes lépését steril fülke alatt, sterilizált felszereléssel végeztük a keresztszennyeződések elkerülése érdekében.

A BL21 Gold (DE3) elektrokompetens gazdasejt esetében a transzformálási folyamat elektroporálás révén megy végbe, mely során a magas intenzitású elektromos tér hatására a sejtfalon pórusok keletkeznek és a transzformálandó plazmid DNS bejut a sejtfalon belülré.[25]

A módszer alkalmazásakor először 5 μ L plazmidot adtunk az 50 μ L gazdasejt oldathoz, majd 1 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően a keveréket egy előhűtött elektroporálásra alkalmas, 1 mm-es küvettába helyeztük és az *E. coli* sejtmembránjának permeabilizálására legmegfelelőbb 1800 V feszültségű elektromos impulzus alá vetettük. Az elektroporálás révén transzformált baktériumokat 300 μ L SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) táptalajban növesztettük 37 °C-on, 250 rpm-en 1 órán keresztül.

A Rosetta (DE3) pLysS gazdasejtek esetében hősokkot alkalmaztunk a transzformálásra. A módszer során 100 μ L CaCl_2 -al kezelt, kémiaiilag kompetens gazdasejt oldathoz 4 μ L plazmidot adagolunk majd 20 percig jégen inkubáltuk. Az elegyet 45 másodpercig, 42 °C-os víz fürdőbe helyeztük, végül pedig jégen regeneráltuk a transzformált sejteket. A kapott elegyet 900 μ L LB (Luria broth) táptalajjal összekeverve az előző módszerhez hasonlóan, 1 órán keresztül 37 °C-on és 250 rpm-en inkubáltuk.

Az inkubálást követően a transzformált sejteket, 50 μ g/mL karbenicillint (CAR) tartalmazó agar lemezekre szélesztettük, majd éjszakán át 37 °C-on növesztettük. Másnap kolónia-PCR segítségével határoztuk meg a pozitív telepeket.

A Petri-csészében növekedett kolóniák közül kiválasztottunk néhány könnyen elkülöníthető darabot, ezeket felhasználva templát DNS-ként a Thermo Scientific DreamTaq Green PCR Master Mix protokollja alapján elvégzett PCR eljárásban, majd további agaróz gélelektroforézis segítségével azonosítottuk a plazmidot tartalmazó gazdasejt kolóniákat.

A PCR reakció keverékben 20 μ L végtérfogatba 1-1 μ L (10 μ M) T7 promotor és T7 terminátor primerpárt, 10 μ L DreamTaq Green PCR Master Mix oldatot (tartalmaz DreamTaq DNS polimeráz enzimet, dNTP-eket, MgCl_2 -ot, színezéket, valamint megfelelő puffert), 7 μ L steril desztillált vizet és 1 μ L-nek számító a kiválasztott kolóniákból származó templát DNS-t szuszpendáltunk. A reakció protokollját a 3. táblázat mutatja be.

3. táblázat - A kolónia PCR protokollja.

	Kezdeti denaturálás	Denaturálás	Kiterjesztés	Végso láncosszabbítás
T (°C)	95	50	72	72
Idő	3 perc	30 mp	2 perc	16 perc

3.2 Fehérje termelés

A kolónia PCR eredményei alapján, kiválasztottunk egy-egy pozitív telepet, ezeket alkalmaztuk egy kisebb térfogatú (10 mL) 50 µg/mL CAR-t tartalmazó LB táptalaj (előkultúra) beoltására. Az előkultúrákat éjszakán át inkubáltuk 37 °C-on és 200 rpm-en.

A következő napon az indított tenyészetet 2%-osra hígítottuk, majd 37 °C-on és 200 rpm-en inkubáltuk, amíg a 600 nm-en mért abszorbancia (OD_{600}) 0,6 és 0,8 közé esett. Ekkor, 0,5 mM izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranoziddal (IPTG) indukáltuk a sejt kultúrát és éjszakán át növesztettük 25 °C-on és 180 rpm-en.

3.5 Konverzió-alapú aktivitás vizsgálat egész-sejtes reakciókban

A kellően megnövekedett nagy térfogatú sejt kultúrákból mintát vettünk és OD_{600} -on vizsgáltuk a sejtszámot spektrofotométer segítségével, majd eppendorf csövekbe helyeztük őket különböző végkoncentrációkban: $OD_{600} = 1$, $OD_{600} = 2$, $OD_{600} = 4$ és $OD_{600} = 6$. Az eppendorf csöveket 13300 rpm-en, 3-percig, 4 °C-on centrifugáltuk, majd a felülúszó tápoldatot lepipettáztuk a sejtekről.

Annak érdekében, hogy meghatározzuk melyik az optimálisabb gazdasejt a Rosetta (DE3) pLysS és a BL21 Gold (DE3) közül, valamint mekkora az ideális sejtszám, először próbát végeztünk a vad típusú LaAAL-el, ahol 20 órás addíciós reakcióban figyeltük a kapott konverzió értékeket a különböző enzim koncentrációk és gazdasejtek esetén.

A leülepedett sejtekre 200 µL reakció elegyet adagoltunk, mely az ammónia addíciós reakció esetén 2 mM-os 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsavat tartalmazott 4 M-os ammónium-karbamát oldatban, míg az eliminációs reakció esetén 2 mM 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin volt feloldva TRIS pufferben (20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 8,8). A reakciókat 18 órán keresztül, 30 °C-on inkubáltuk, folyamatos rázogató mellett. Minden vizsgált minta esetén három példányban végeztük el a mérést.

A konverziók meghatározását RP-HPLC segítségével, Agilent 1200 berendezést és Gemini NX-C18 (150 × 4,5 mm; 5 µm) oszlopot alkalmazva végeztük el. A mintákat 8 perces gradiens elúciós módban kromatografáltuk 1 mL/perc áramlási sebességgel, 25 °C-on. A mozgó fázis pH 9-es, 0,1 M-os NH_4OH (A) oldatból és metil-alkoholból (B) áll (%B: 20-tól 40-ig változott). A minták 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsav és 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin koncentrációját kalibrációs görbe (1. függelék és 2. függelék) segítségével határoztuk meg, mely összeállítására helyileg szintetizált anyagokat használtak.

3.6 A mutáns és natív LaAAL konverzió-alapú aktivitásának vizsgálata

A mutáns és natív LaAAL-t egész-sejtes katalizátorként alkalmazva vizsgáltuk a konverziót a 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin és 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsav közötti ammónia addíciós és eliminációs

reakcióban. A 200 μL végtérfogatú reakcióelegybe spektrofotométer segítségével meghatározott, $\text{OD}_{600} = 2$ mennyiségű biokatalizátort és 2 mM szubsztrátot adagoltunk. Az addíció esetén a folyamat 4 M-os ammónium-karbamát, oldatban, míg az elimináció esetén TRIS pufferben (20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 8,8) ment végbe. A reakcióelegyeket 30 °C-on folyamatos rázogató mellett inkubáltuk, majd a kapott konverzió értékeket RP-HPLC segítségével követtük. A méréseket minden vizsgált minta esetén három példányban végeztük el.

3.7 A rekombináns *LaAAL* izolálása és tisztítása

A natív *LaAAL* esetében szükségesnek bizonyult a fehérje izolálása és tisztítása. Ehhez első lépésben az indukált és éjszakán át növesztett sejt kultúrát 4000 rpm-en, 4 °C-on, 20 percig centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk és a leülepedett sejteket 50 mL lízis pufferben (50 mM TRIS, 300 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, pH 8) reszuszpendáltuk, hozzáadva 4-5 mg lizozimot, mely a kémiai sejteltérítést biztosítja, 100 μL fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PSMF) és egy fél proteáz inhibitor tablettát. Mechanikai sejteltérítésre ultrahangos szondát alkalmaztunk (4 mp pulzálás, 2 mp szünet, 40%-os amplitúdó, 18 °C). A lizátumot 25 percig, 10000 rpm-en és 4 °C-on centrifugáltuk, így elválasztva a sejtmarmagoktól az enzimet tartalmazó felülúszót.

A további lépésekben, Ni-NTA (Ni-nitrilotriecetsav) affinitás kromatográfiás módszert alkalmaztunk az *LaAAL* tisztítására. A centrifugálás során nyert felülúszót, perisztaltikus pumpa segítségével kétszer átvezettük a gravitációs oszlopba töltött 2 mL Ni-NTA-agaróz gyantán, mely során a rekombináns fehérje His-címkéje segítségével kapcsolódik a gyantán megkötött Ni^{2+} ionokhoz. Az oszlopot használat előtt kétszer desztillált vízzel, majd lízis pufferrel mostuk, a kötődési lépést követően pedig újból megmostuk először alacsony só koncentrációjú (50 mM HEPES, 30 mM KCl, pH 7,5), majd magas só koncentrációjú (50 mM HEPES, 300 mM KCl, pH 7,5) pufferekkel. A nem specifikusan kötődő fehérjéket 25 mM imidazollal tartalmazó oldattal távolítottuk el az oszlopról, míg a célfehérje eluálására 250 mM-os imidazol oldatot használtunk. A mosási és eluálási lépéseket Bradford-reagens segítségével követtük. Az oszlop végső mosására 1 M-os imidazol oldatot, kétszeresen desztillált vizet és 20%-os etanolt használtunk.

Minden lépés esetén mintát vettünk az adott frakcióból és nátrium dedocil szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis (angolul Sodium Dodecyl Sulphate- PolyAcrylamide Gel Electroforesis, SDS-PAGE) segítségével követtük a tisztítás sikerességét.

A tisztított enzim sóalanítására dialízist alkalmaztunk. 5 L előhűtött dialízis pufferben (20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 8) éjszakán át kevertettük a dialízis zsákocskákban lévő tisztított enzimet.

3.8 Az LaAAL optimális működési körülményeinek meghatározása

3.8.1 Aktivitásvizsgálat spektrofotometriás módszerrel

Az aktivitásvizsgálatokat UV-spektrofotometriás módszerrel végeztük el egy TECAN Spark 10M berendezés segítségével, 5 percen keresztül, 30 °C-on. Mintatartóként UV-transzparens, 96 lyukú mikrolemezeket alkalmaztunk, így 200 µL végtérfogatú mintában a szubsztrátkoncentráció 2 mM volt. A mérési eredmények kvantifikálásának érdekében kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg a moláris extinkciós koefficiens és az optikai úthossz szorzattát ($\epsilon \cdot l$), mely megtalálható az **3. függelékben**.

Az 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin és 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsav közötti ammónia eliminációs reakció esetén vizsgáltuk a tisztított enzim specifikus aktivitását 0,41 µM végkoncentráció mellett, különböző kémhatású pufferoldatok esetén: pH 6-7, illetve 11-12 között 100 mM-os foszfátpufferben, 7,5-9 között 20 mM TRIS, 100 mM NaCl-ban, pH 9,5-10,5 között pedig 100 mM-os NaHCO₃-Na₂CO₃-ban, 308 nm-en követve a 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsav keletkezésének átlagos sebességét.

Az ammónia addíciós reakció körülményeit szimulálva két féle, változó koncentrációjú ammónia forrás: 4 M-os ammónium-hidroxid (9-11,5 között változó pH-val, melyet CO₂ segítségével állítottunk be) és 2, illetve 4 M-os ammónium-karbamát (pH ~9,5) hatását vizsgáltuk az enzim aktivitására. A tisztított enzimet 30 percen keresztül inkubáltuk a különböző ammónia oldatokban, majd 0,82 µM végkoncentrációban hozzáadtuk a reakcióelegyhez és 345 nm-en követtük az aktivitását. Minden vizsgált minta esetén három példányban végeztük el a mérést.

3.8.2 A protein olvadáspontjának vizsgálata a reakcióközeg függvényében

A reakciókörnyezet hatását az enzim hajtogatott szerkezetének stabilitására a protein olvadáspontjának követésével differenciális pásztázó fluorimetriás módszerrel (30-90 °C között) vizsgáltuk, Bio-Rad CFX96 RT-PCR berendezés segítségével. Mintatartóként kemény fehér vázú 96 áttetsző lyukú mikrolemezeket (angolul white-clear-Hard Shell 96-well microplate) alkalmaztunk, melyeket Microseal B fóliával zártunk le. Az 50 µL végtérfogatú mintába 30 percig előkezelt 2,5 µM LaAAL-t adagoltunk, 5 µL 250×-es hígítású SYPRO Orange festékkel. Az előkezelésre a **3.8.1-es** fejezethez hasonlóan különböző kémhatású pufferoldatokat alkalmaztunk: pH 6-7, illetve 11-12 között 100 mM-os foszfátpuffert, 7,5-9 között 20 mM TRIS, 100 mM NaCl-ot és pH 9,5-10,5 között 100 mM-os NaHCO₃-Na₂CO₃-ot; illetve két féle változó koncentrációjú ammónia forrást: 4 M-os ammónium-hidroxid (pH 9-11,5 között) és 2, valamint 4 M-os ammónium-karbamát (pH ~9,5) oldatot.

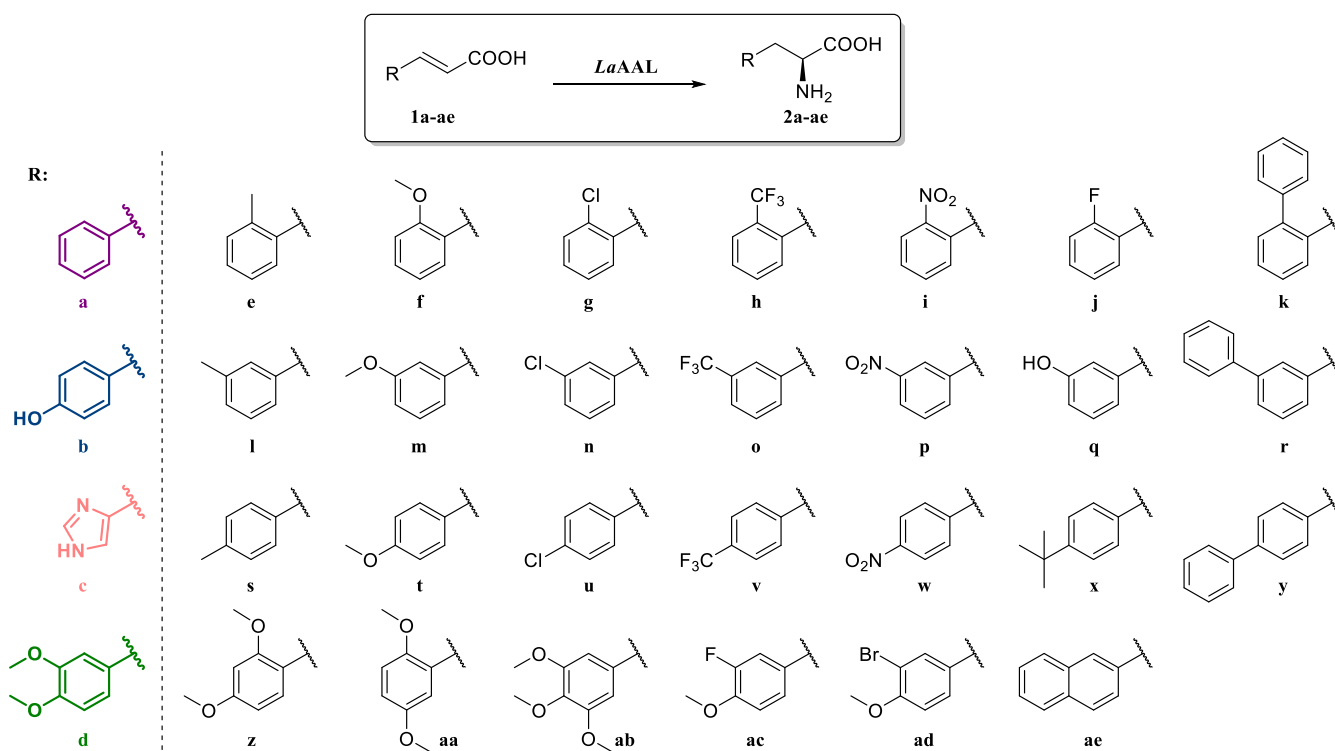
3.8.3 Konverzió-alapú aktivitás vizsgálata a hőmérséklet függvényében

Az ideális ammóniaforrás kiválasztását követően, a 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsav és 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin közötti, tisztított enzim által katalizált ammónia addíciós reakcióban vizsgáltuk 30-50 °C

tartományban a hőmérséklet hatását az enzim konverzió-alapú aktivitásának változására az időben. A 2 mL végtérfogatú, 2 mM szubsztrátot és 0,41 μM enzimet tartalmazó reakció oldatokat a meghatározott hőmérsékleteken, folyamatos rázogatós mellett inkubáltuk, majd a 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 és 24 óra reakcióidő elteltével vett minták konverzió értékeit RP-HPLC segítségével határoztuk meg. A méréseket három példányban végeztük el az összes minta esetén.

3.9 Szubsztráttartomány feltérképezés

Az ammónia addíciós reakciót esetén, alkalmazva a meghatározott optimális körülményeket, mértük az LaAAL konverzió-alapú aktivitását a **3. ábrán** bemutatott szubsztrát gyűjteménnyel szemben. A 0,41 μM végkoncentrációjú tisztított enzim mennyiség által katalizált folyamatokban mért konverzió értékeket RP-HPLC segítségével határoztuk meg, a **4. függelék**-ben összefoglalt metódusok alapján. A 200 μL végtérfogatú reakcióelegyben a legtöbb szubsztrát esetében a használt szubsztrátkoncentráció 2 mM volt, míg a nehezen oldódó anyagok esetén (**1k**, **1r**, **1x-y**) 0,5 mM végkoncentrációt alkalmaztunk 5 % DMSO hozzáadása, az **1ae** esetében pedig 20 % kolin-klorid:glicerín adagolása mellett. A vizsgálatokat minden esetben három példányban végeztük el.



3. ábra - Az LaAAL ammónia addícióban való katalitikus alkalmazhatóságának feltérképezése során ellenőrzött szubsztrát könyvtár.

Az egyes folyamatokban mért enantiomer felesleg (angolul enantiomeric excess - ee) értékét RP-HPLC segítségével mértük, Crownpak CR-I (+) királis oszlopot (150 $\times$ 3 mm; 5 μm) használva. A mozgó

fázis 1-es pH-jú HClO_4 (C) és acetonitril (D) keveréke volt, az alkalmazott metódusokat a **5.függelék** foglalja össze.

3.10 Kinetikai paraméterek meghatározása

Az enzim szubsztráttartományának további vizsgálatára meghatároztuk a Michaelis-Menten kinetikai paramétereket (K_M , k_{cat} és k_{cat}/K_M) a **2a**, **2q**, **2m**, **2d**, **2ab** és **2ac** szubsztrátok ammónia eliminációs reakciója esetén, alkalmazva a meghatározott ideális pH és hőmérséklet körülményeket, 0,025-40 mM szubsztrátkoncentráció tartományban, kiindulási anyagtól függően. A méréseket TECAN Spark 10M berendezés segítségével végeztük el, 15 perc alatt követve a megfelelő *transz*-fahéjsav származék keletkezésének sebességét az elnyelési maximumot mutató hullámhosszon (**3. függelék**). Az eredmények kvantifikálására felhasználtuk a kalibrációs görbék segítségével meghatározott moláris extinkciós koefficiens és az optikai úthossz szorzatának értékét (**3. függelék**). A **2b** és **2ae** szubsztrátok esetén az alacsony oldhatóság miatt nem volt lehetséges a Michaelis-Menten görbék felvétele, ezért alacsony szubsztrátkoncentráció mellett (25-50 μM) meghatároztuk k_{cat}/K_M katalitikus hatékonyság értékét.

4. Eredmények

Kutatásunk kiindulópontja, az irodalomban nemrég leírt AL-11[1] biokatalizátorhoz hasonló, a 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin szintézisére alkalmas PAL enzimek fellelése volt. Miután az AL-11 szekvenciája alapján kiválasztottuk az általunk vizsgált *LaAAL*-t és ellenőriztük ennek katalitikus hatékonyságát a céltermék szintézisével szemben, feltérképeztünk 16 homológ enzimet, melyek aminosav szekvenciája jelentős hasonlóságokat mutat az *LaAAL*-lal.

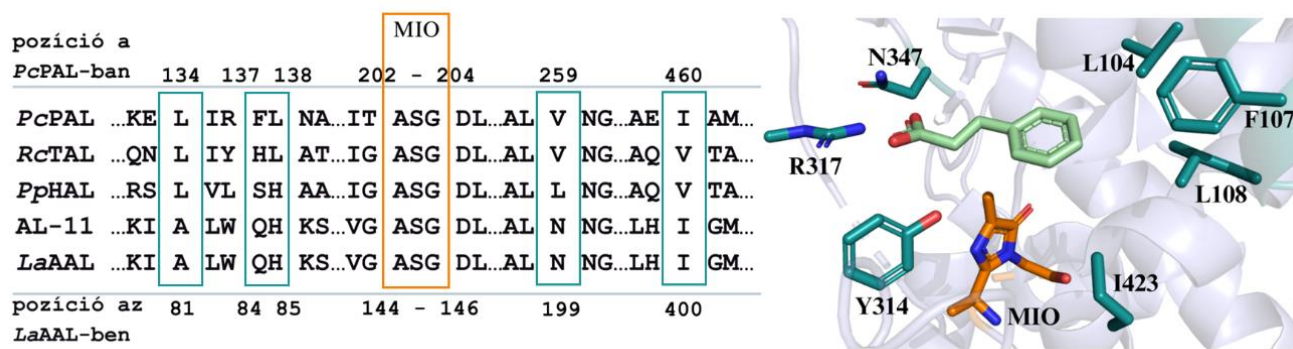
Ezen homológ enzimek katalitikus központjának összehasonlítása során észrevettük olyan aminosavak jelenlétét a hidrofób szubsztrát-kötő zsebben, melyek teljesen egyediek, mind az *LaAAL*-lal, mind az ismert PAL, TAL és HAL enzimekkel szemben. Ennek alapján felmerült ezen aminosavak szerepe a szubsztrátspecifitás alakításában, ezért olyan mutációkat terveztünk, melyek által ezen különböző homológok aminosav oldallánc-mintázatával egyező hidrofób központtal rendelkező *LaAAL* variánsokat kapunk. Továbbá vizsgáltuk, hogy ezen változtatások milyen hatással vannak a natív enzim aktivitására a 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsav és 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin reverzibilis ammónia addíciós reakciójában.

Az új enzim kiemelkedő katalitikus hatékonysága alátámasztotta további karakterizálásának jelentőségét. Kiválasztva a szintetikus szempontból jelentős reverzibilis 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsav és 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin között lejátszódó ammónia addíciós reakciót, mint modellt meghatároztuk az enzim ideális működési körülményeit a pH-t és a hőmérsékletet tekintve. Az enzim katalitikus alkalmazhatóságának további felfedezése céljából, alkalmazva a meghatározott optimális

reakciókörülményeket, az *LaAAL* konverzió-alapú aktivitását vizsgáltuk egy széles körű, mono-, di- és poli-szubsztituált *transz*-fahéjsav származékokból álló szubsztrát könyvtár ammónia addíciójában. Végül a legjobban működő szubsztrátok esetén a Michaelis-Menten kinetikai paraméterek is meghatározásra kerültek.

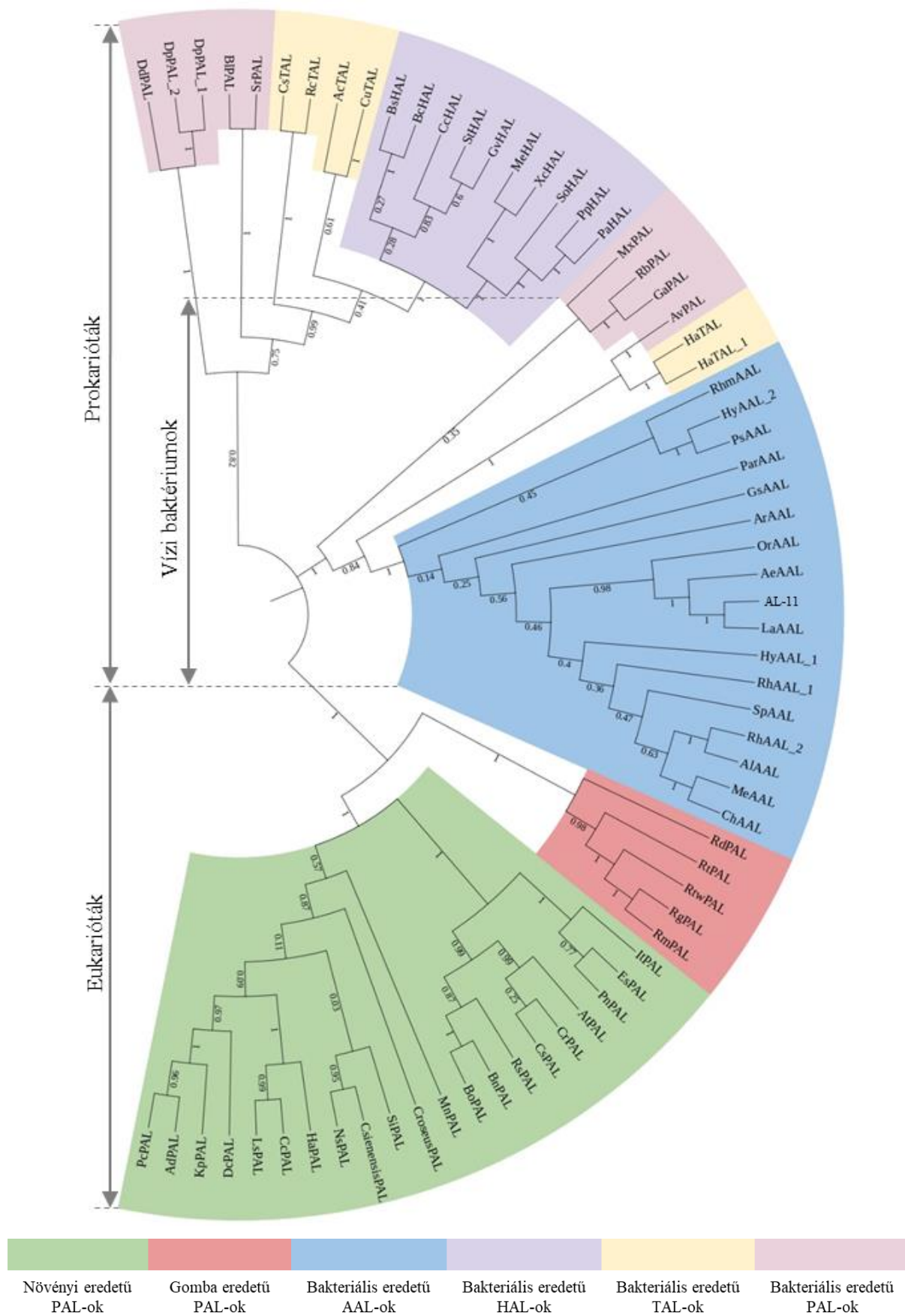
4.1 Szekvencia összerendezés és filogenetikai analízis

Az *LaAAL* aminosav szekvenciájára végzett BLAST hasonlóságvizsgálat alapján kiválasztott homológok (6. függelék), illetve a szakirodalomból összegyűjtött PAL, HAL és TAL biokatalizátorok (7. függelék) aminosav szekvenciáinak többszörös összerendezése során a MIO csoportot alkotó alanin-szerin-glicin (ASG) motívum minden esetben fellelhető volt, így levonható a következtetés, hogy az újonnan fellelt *LaAAL* és homológjai a MIO enzimesalád részét képezik (4. ábra).



4. ábra - Szekvencia összerendezés az *LaAAL*, *PcPAL*, *RcTAL*, *PpHAL* és *AL-11* között, kiemelve az elektrofil központban kulcsszerepet játszó aminosavakat, valamint a MIO prosztetikus csoportot (táblázat). Az *LaAAL* katalitikus központja az *AvPAL* (PDB: 5LTM) enzim kristályszerkezete alapján modellezve (ábra).

A filogenetikai analízis eredménye az 5. ábra által bemutatott leszármazási kapcsolatokat összefoglaló törzsfa. A magas bootstrap értékekkel, tehát nagy megbízhatósággal (1, 1 és 0,82) rendelkező fő elágazások az analízis sikerességét igazolják, ahol elsősorban a prokarióta és eukarióta élőlényekből származó enzimek válnak el egymástól. A vizsgált különböző vizekből származó, bakteriális eredetű AAL-ok inkadrálódnak a többi elősejtmagos ammónia-liázok közé, míg az eukarióta forrásokból (ez esetben növényekből 5. ábra - zölddel jelölt rész és gombákból 5. ábra - pirossal jelölt rész) származó enzimek külön ágat alkotnak. Az *LaAAL* és homológjai szintén magas valószínűségi értékekkel (0,84 és 1) egy elhatárolt egységet alkotnak (5. ábra - kézzel jelölt rész) a vízi baktériumokból származó PAL-okkal, valamint a tavi vizekben megtalálható *Herpetosiphon aurantiacus*-ból kinyert hisztidin ammónia-liázzal.



5. ábra - A generált filogenetikai fa.

A katalitikus központban megtalálható MIO prosztetikus csoport jelenléte, valamint a filogenetikai analízis során megfigyelt kapcsolatok alapján nagy valószínűséggel kijelenthető, hogy a vizsgált AAL-ok a MIO enzimes család egy új alosztályát képezik, mely bakteriális eredetű fenilalanin ammónia-liázokból fejlődött ki az evolúció során.

További kutatásaink során, az említett közvetlen közös felmenők rekonstrukcióját és a katalitikus központjaikban fellelhető aminosavak vizsgálatát tervezzük, mely információk alapján tisztább képet nyerhetünk a tanulmányozott AAL-ok természetes funkciójával kapcsolatban.

4.2 Mutagenézis

Az *LaAAL* és homológjai aminosav szekvenciáinak összehasonlítása során különböző mértékű változásokat vettünk észre, melyek a **4. táblázat**-ban vannak kiemelve.

4. táblázat - A szubsztrátspecifitást befolyásoló aminosavak változása az *LaAAL* és homológjai között a MIO csoport alosztályainak reprezentatív enzimeivel szemben (*PcPAL*, *PpHAL* és *RcTAL*).

Nr.	Rövidítés	Aminosav a megfelelő pozícióban				Megfelelő <i>LaAAL</i> mutáció
		<i>PcPAL</i>				
		L134	F137 L138	V259	I460	
		<i>PpHAL</i>				
		L80	S83 L84	L195	V387	
		<i>RcTAL</i>				
		L87	H90 L91	V213	V410	
1	<i>LaAAL</i>	A81	Q84 H85	N199	I400	A81S
2	<i>AeAAL</i>	A	QH	N	I	
3	<i>AL-11</i>	A	QH	N	I	
4	<i>RhAAL</i> ₁	A	HH	N	I	
5	<i>SpAAL</i>	A	HH	N	I	
6	<i>ChAAL</i>	A	HH	N	I	Q84H
7	<i>HyAAL</i> ₁	S	HH	N	I	
8	<i>OrAAL</i>	A	QH	N	V	
9	<i>MeAAL</i>	A	HH	N	I	
10	<i>RhAAL</i> ₂	A	QH	N	I	N199S
11	<i>AlAAL</i>	A	QH	N	I	
12	<i>HyAAL</i> ₂	S	HH	S	L	
13	<i>PsAAL</i>	S	HH	S	L	I400L
14	<i>ParAAL</i>	A	QH	N	V	
15	<i>RhmAAL</i>	A	QH	N	I	
16	<i>ArAAL</i>	A	TH	N	V	
17	<i>GsAAL</i>	A	QH	N	I	

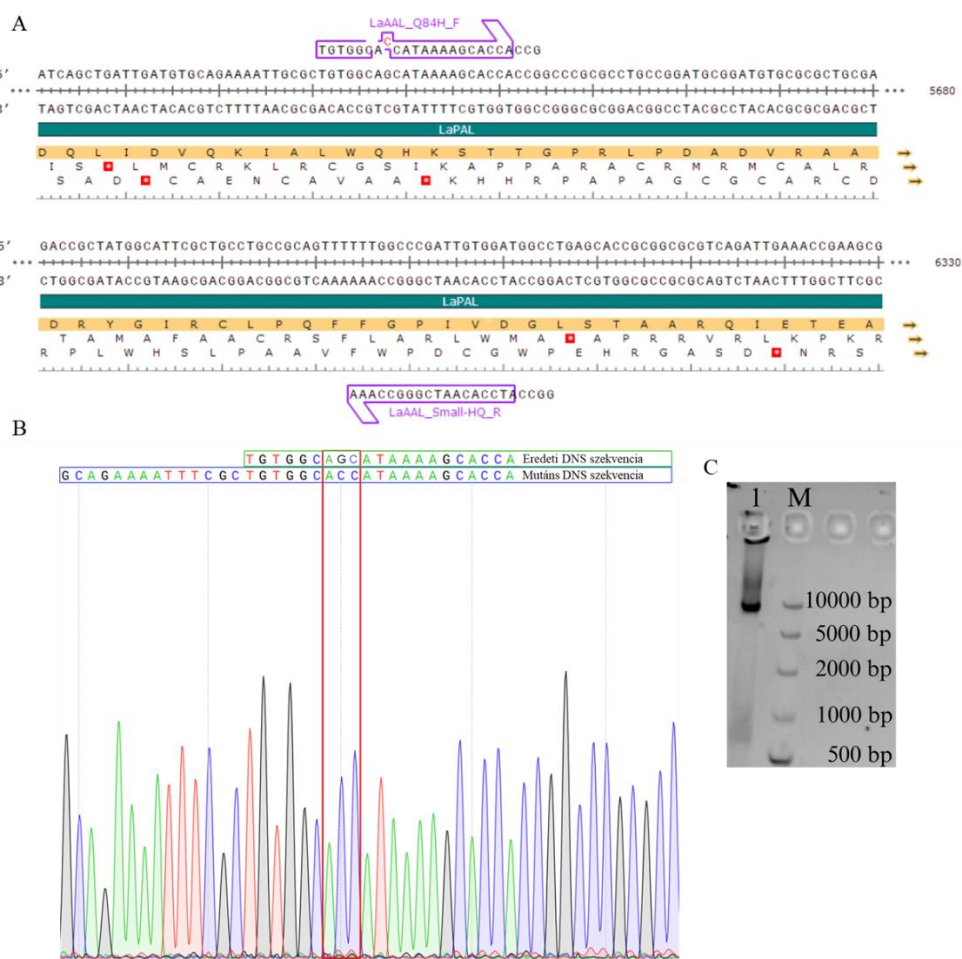
Annak érdekében, hogy átültessük ezen homológok szerkezetét az *LaAAL* elektrofil központjába, valamint növeljük a szubsztrát rendelkezésére álló helyet a katalitikus szituszban, négy mutációt

terveztünk: a 81-es pozícióban levő alanint szerinre, a 84-es glutamint hisztidinre, a 199-es aszparagint szerinre, valamint a 400-as izoleucint leucinra cseréltük. Ezek alapján három mutáns enzim variánst hoztunk létre, melyek kettő, három és négy mutációt tartalmaznak (5. táblázat).

A pontmutációk bevezetéséhez tervezett primerek (6. ábra - A) felhasználásával végzett PCR reakció végbemenetelét 1%-os agaróz gélen való elektroforézissel ellenőriztük (6. ábra - C), valamint a mutációk sikeres bevételét az *LaAAL*-t kódoló gén szekvenciába szekvenálással igazoltuk (6. ábra - B).

5. táblázat - A mutáns *LaAAL* variánsok összefoglalása.

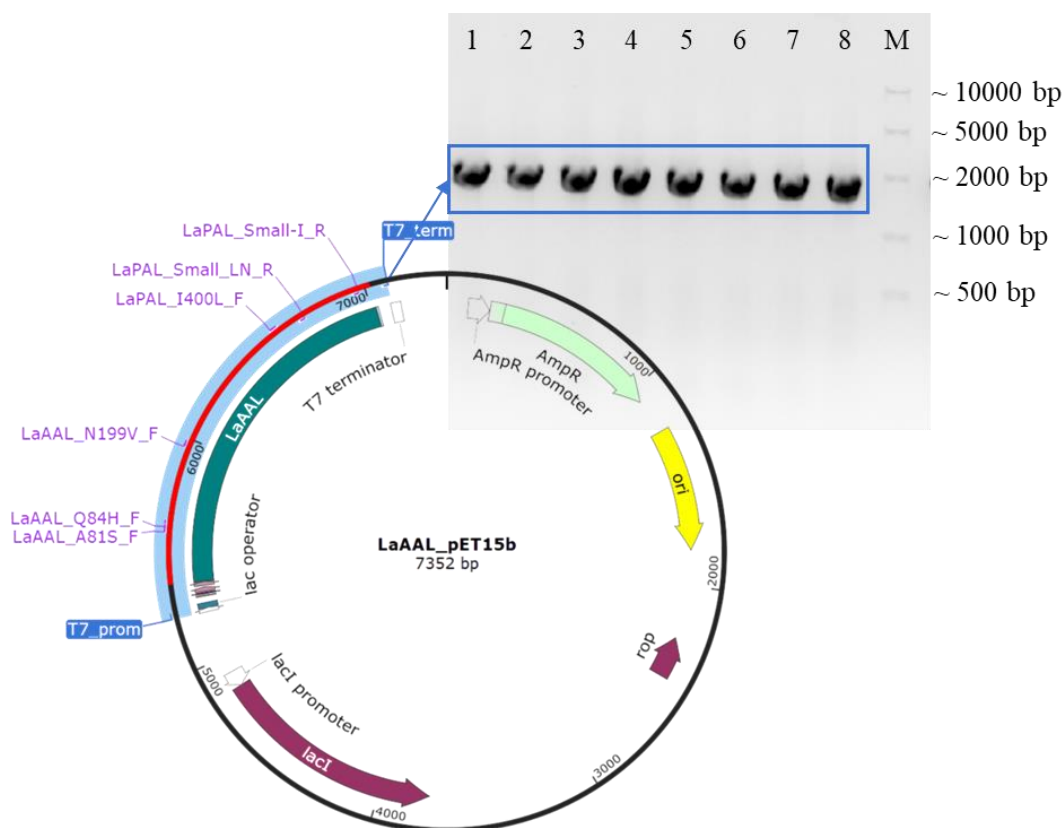
<i>LaAAL</i> varián sorszáma	Mutációk
1	Q84H/I400L
2	A81S/Q84H/I400L
3	A81S/Q84H/N199S/I400L



6. ábra - Reprezentatív mutagenézis eredmények, a Q84H pontmutáció esetében. (A) A mutagén primerek szekvenciái átfedésben a komplementer *LaAAL* gén szekvencia részletével. (B) A gén-szekvenálás eredménye. (C) A PCR segítségével sokszorozított mutáns gén gélelektroforézis vizsgálata (1- a mutáns gén ~ 7352 bp; M- FastRuler DNS létra).

4.3 Transzformálás és fehérje termelés

A kolónia-PCR alapján (7. ábra), mind a BL21 Gold (DE3), mind a Rosetta (DE3) pLysS gazdasejtek esetében is sikeres volt a rekombináns enzimet kódoló plazmidok transzformálása, így mindkét expressziós rendszer esetén végrehajtottuk a fehérje termelés lépéseit, majd a kapott egész-sejtes biokatalizátorokat próbareakcióknak vetettük alá.



7. ábra - A kolónia PCR eredménye 1%-os agaróz gélen. (1-8- a transzformált Rosetta (DE3) pLysS és BL21 Gold (DE3) gazdasejt kolóniák – a felsokszorozított DNS szekvencia hossza ~ 1870 bp; M- FastRuler DNS létra.)

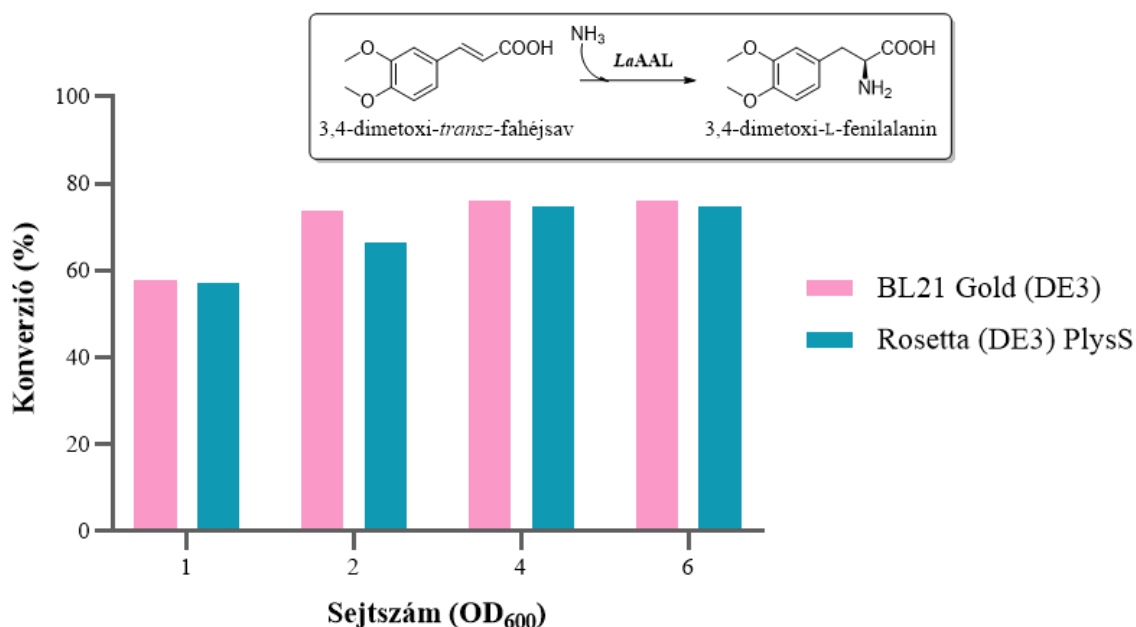
4.4 Konverzió-alapú aktivitás vizsgálat egész-sejtes reakciókban

A konverzió értékek meghatározása érdekében kalibrációs görbéket (1. függelék és 2. függelék) állítottunk össze, mind az addíciós, mind az eliminációs reakció esetében, melyek felvételekor különböző molarányú 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin és 3,4-dimetoxi-transz-fahéjsav keverékét injektáltuk a HPLC oszlopra a megfelelő elválasztási módszert alkalmazva (8. függelék). A kalibrációs görbék segítségével meghatároztuk a relatív válaszfaktor (R_f) értékét (6. táblázat) mindkét reakcióút esetén, mely alapján kiszámíthatóak a konverzió értékek.

6. táblázat - Az alkalmazott HPLC metódus az ammónia addíciós és eliminációs reakciók konverzió értékeinek meghatározására.

Retenciós idő (perc)		Relatív válaszfaktor (Rf)		Hullámhossz (nm)
3,4-dimetoxi-L-fenilalanin	3,4-dimetoxi-transz-fahéjsav	Ammónia addíció	Ammónia elimináció	220
3,5	4,9	1,9	0,41	

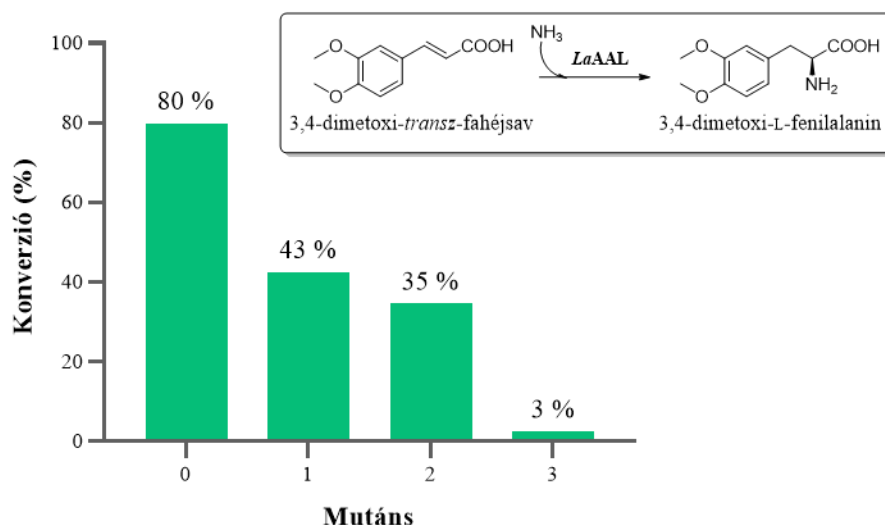
A vad típusú enzim esetében elvégzett próbareakciók során nyert konverzió értékeket a **8. ábra** mutatja be. Az eredmények alapján a további reakciók során a BL21 Gold (DE3) gazdasejtbe transzformált biokatalizátorokat alkalmaztuk, OD₆₀₀ = 2 sejtsűrűség koncentráció mellett, mivel ezen gazdasejt minden esetben nagyobb aktivitást mutatott a Rosetta (DE3) pLysS-szel szemben. Továbbá OD₆₀₀ = 2 sejtsűrűség felett nagyon alacsony a konverzió növekedésének mértéke, így költséghatékonysági szempontból érdemes ennél az egész-sejtes biokatalizátor mennyiségnél maradni.



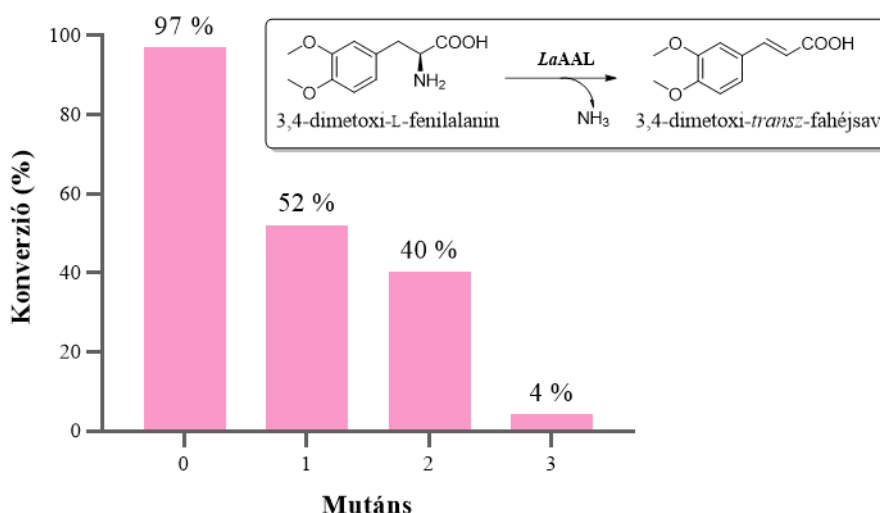
8. ábra - A vad típusú LaAAL esetében elvégzett ammónia addíciós próbareakciók konverzió eredményei, a különböző gazdasejtek és az alkalmazott egész-sejtes LaAAL biokatalizátor mennyiségének függvényében, 20 órás reakció idő után, HPLC-n mérve.

Az alkalmazott mutációk az LaAAL esetében nem növelték az aktivitást a 3,4-dimetoxi-szubsztituált szubsztrátokkal szemben (**9. ábra** és **10. ábra**), ezért a továbbiakban kérdéses marad, hogy ezen aminosav oldalláncok milyen szerepet töltenek be az újonnan azonosított PAL enzimek katalitikus központjának hidrofób zsebében. Ugyanakkor további fontos kérdés maradt, hogy ezen oldallánc mintázat milyen eltérő szubsztrátspecifitást kölcsönöz a vizsgált homológ PAL enzimek számára. Nem utolsósorban, figyelemre méltó az LaAAL kiemelkedő katalitikus hatékonysága a 3,4-dimetoxi-szubsztituált szubsztrátok

átalakításában, mely megnyitja az utat a PAL enzimek alkalmazására a lignin bomlása során keletkező anyagok átalakításában.



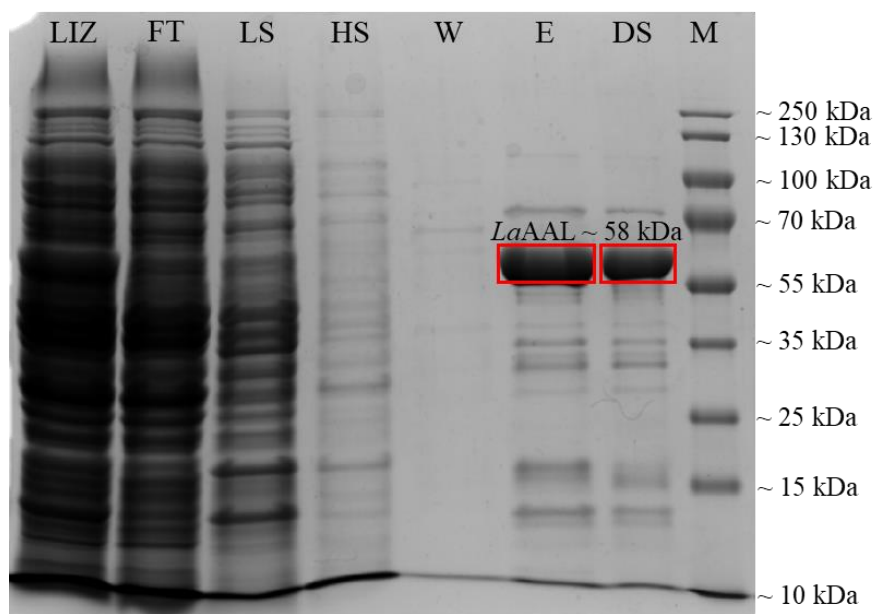
9. ábra - Az egész-sejtes ammónia addíciós reakciók konverzió értékei 18 órás reakció idő után HPLC-n mérve.



10. ábra - Az egész-sejtes ammónia eliminációs reakciók konverzió értékei 18 órás reakció idő után HPLC-n mérve.

4.5 Rekombináns LaAAL izolálása és tisztítása

E. coli BL21 Gold (DE3) gazdasejtre alapozott expressziós rendszer alkalmazásával végrehajtottuk rekombináns célfehérje termelését, izolálását és tisztítását, a különböző tisztítási lépésekből vett mintákat SDS-PAGE segítségével vizsgáltuk, illetve igazoltuk az LaAAL enzim jelenlétét az izolált enzim frakcióban a molekulatömege alapján (**11. ábra**). A dialízist követően a sóalanított, tisztított enzim koncentrációját Bradford módszer segítségével kvantifikáltuk.

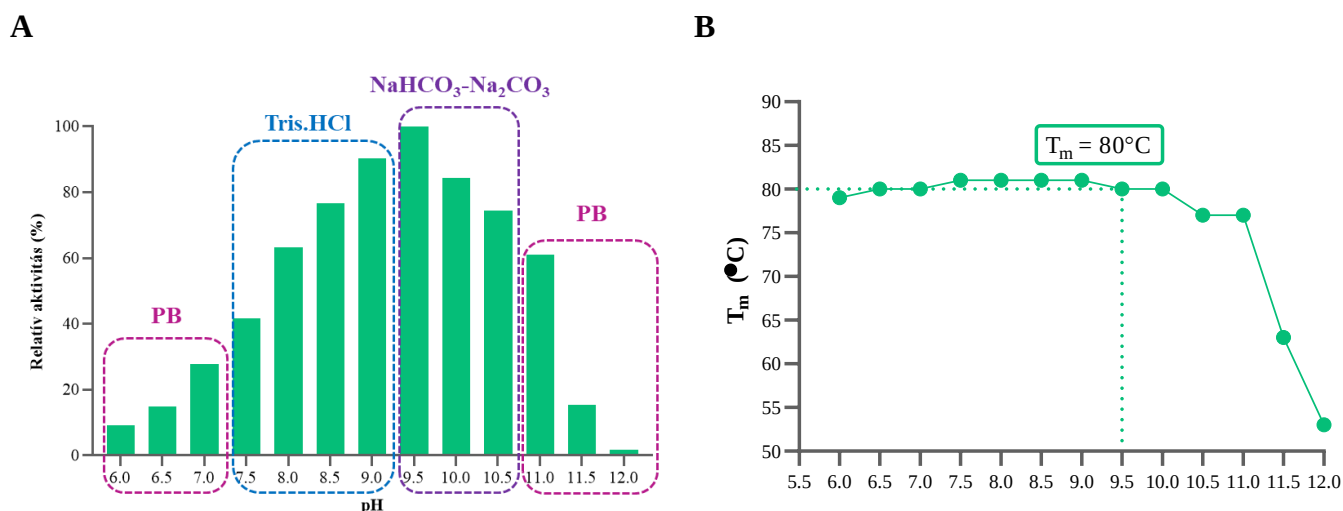


11. ábra - Az LaAAL tisztításának különböző szakaszaiban vett minták SDS-PAGE analízise. LIZ- lizátum; FT- a Ni-NTA affinitás kromatográfiás oszlopon 2x áthaladó nem kötődő frakció (flow-trough); LS- 25 mM KCl-al történő mosás (low salt); 300 mM KCl-al történő mosás (high salt); W- nem specifikusan kötődő fehérjék mosása 25 mM-os imidazol oldattal (wash); E- specifikusan kötődő His-címkével rendelkező fehérje eluálása 250 mM-os imidazol oldattal; DS- dialízis utáni minta; M- Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained protein marker.

4.6 Az LaAAL optimális működési körülményeinek meghatározása

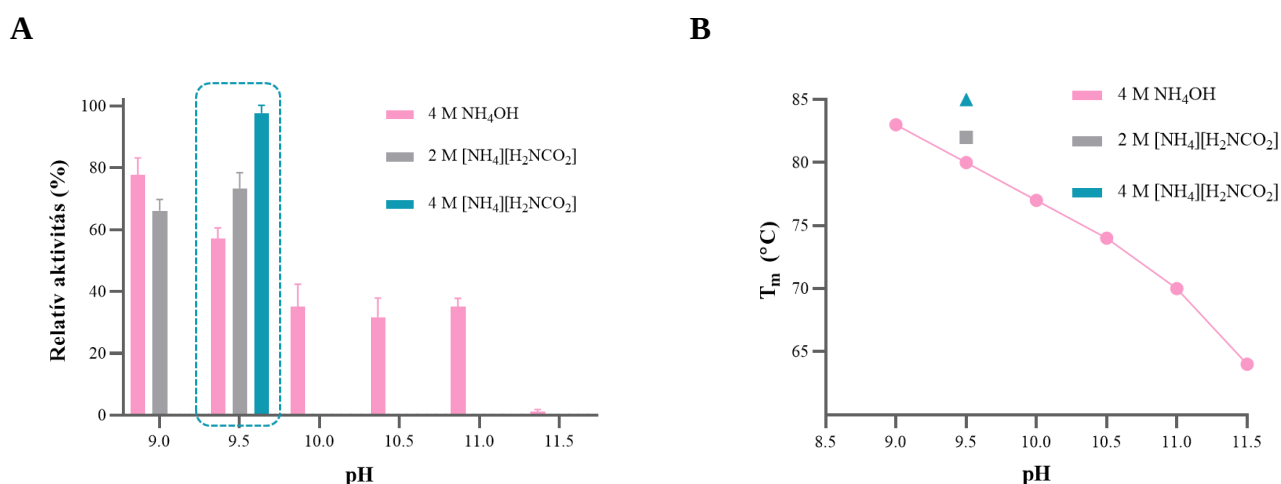
4.6.1 A pH hatása

A 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin és 3,4-dimetoxi-transz-fahéjsav közötti LaAAL által katalizált ammónia eliminációs reakció ideális kémhatású reakcióközegének kiválasztásakor figyeltük az enzim aktivitásának változását a pH függvényében (**12. ábra - A**). Az eredmények alapján levonható a következtetés, hogy az enzim a legmagasabb specifikus aktivitást a 9,5-ös pH-jú 100 mM-os NaHCO_3 - Na_2CO_3 pufferoldatban mutatta. Vizsgálva a protein olvadáspontjának változását különböző 6-12 pH tartományban változó pufferoldatokban való inkubálást követően (**12. ábra - B**), megfigyelhető, hogy az ideálisnak bizonyult 9,5-ös pH nincsen negatív befolyással az enzim hajtogatott szerkezetének stabilitására és a protein olvadáspontja, a semleges pH-n inkubált variánshoz hasonlóan $\sim 80^\circ\text{C}$ maradt. Ezen eredmények alapján az ammónia eliminációs reakció esetében optimális reakcióközegként 9,5-ös pH-jú 100 mM-os NaHCO_3 - Na_2CO_3 pufferoldatot választottuk ki.



12. ábra - A pH hatása az enzim aktivitására és stabilitására az ammónia eliminációs reakció esetén. (A) Az LaAAL relatív aktivitásának változása a 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin és 3,4-dimetoxi-transz-fahéjsav közötti ammónia eliminációs reakció során különböző kémhatású pufferoldatokban, UV-spektrofotometriás módszerrel mérve 308 nm-en. (B) Az enzim olvadáspontjának változása változó kémhatású pufferoldatokban való 30 perces inkubálást követően.

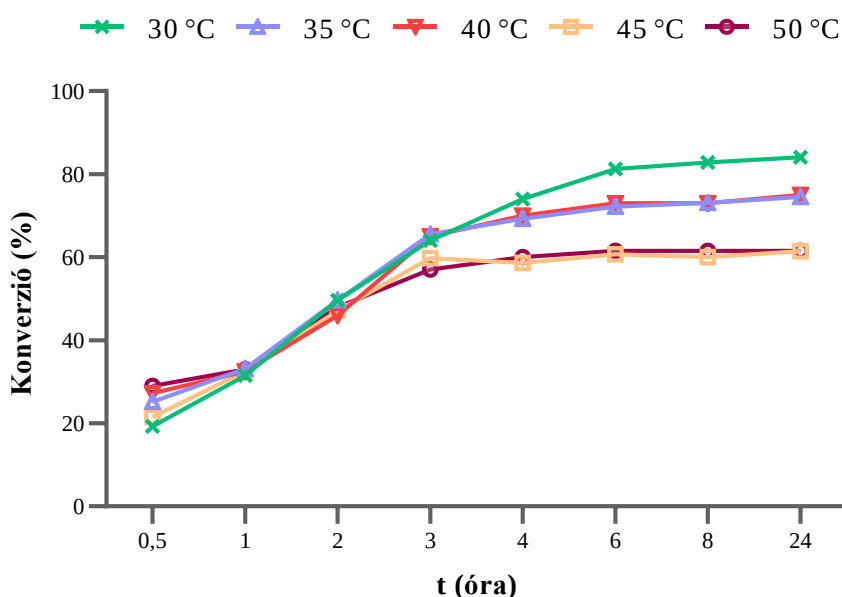
A megfelelő ammóniaforrás kiválasztása érdekében végzett aktivitásvizsgálat eredményei alapján, az LaAAL legnagyobb mértékben a 4 M-os ammónium-karbamát (pH ~9,5) oldatban való inkubálás után tartotta meg aktivitását (**13. ábra - A**). Az ammónia forrás nem rendelkezett degradáló hatással a protein hajtogatott szerkezetének stabilitására sem, az oldatban való inkubálást követően is a fehérje kiemelkedően magas, 85 °C-os olvadáspontot mutatott (**13. ábra - B**). A kapott eredmények alapján, az LaAAL által katalizált, 3,4-dimetoxi-transz-fahéjsav és 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin közötti ammónia addíciós reakcióban ideális ammónia forrásként az ammónium-karbamátot választottuk ki, melynek nem igazított pH-ja ~9,5.



13. ábra - A pH az enzim aktivitására és stabilitására kifejtett hatása az ammónia addíciós környezet szimulációja esetén (az enzim 30 perces inkubálása után különböző kémhatású ammónia forrásokban). (A) Az LaAAL relatív aktivitásának változása a 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin és 3,4-dimetoxi-transz-fahéjsav közötti ammónia eliminációs reakció során, UV-spektrofotometriás módszerrel mérve 345 nm-en. (B) Az enzim olvadáspontjának változása.

4.6.2 A hőmérséklet hatása

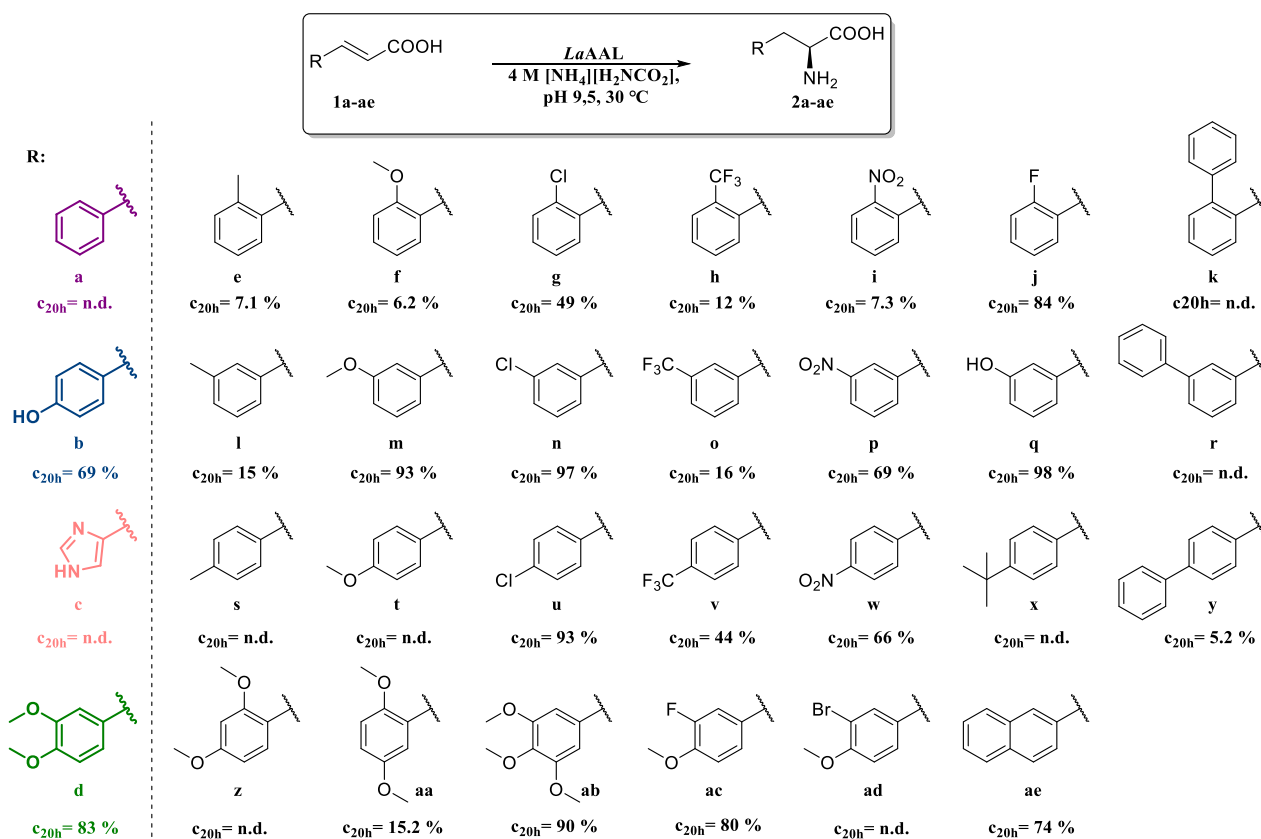
Alkalmazva az ideális 4 M-os ammónium-karbamát ammónia forrást, követtük a 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsav és 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin közötti ammónia addíciós reakció idő-konverzió profilját a hőmérséklet függvényében (**14. ábra**). Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a reakció megközelítőleg hat órán belül eléri a maximális konverzió értéket 30 °C-on, mely eredmény költséghatékonyság szempontjából is jelentős.



14. ábra - A 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsav és 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin közötti ammónia addíciós reakció idő-konverziója profilja a hőmérséklet függvényében RP-HPLC-vel követve.

4.7 Szubsztráttartomány feltérképezés

A szubsztráttartomány-analízis az optimalizálási lépések során meghatározott reakciókörülmények alkalmazásával ment végbe, tehát 30 °C-on, 4 M-os ammónium-karbamát (pH ~ 9,5) oldatban. Az enzim széles körű katalitikus felhasználhatóságot mutatott, számos *transz*-fahéjsav származék ammónia addíciójában magas konverzió értékeket eredményezve (**15. ábra**). A mért enantiomer felesleg (*ee* %) értékek az összes termékre 99 % felettiak voltak, kivéve a **2w** és **2p** nitro-szubsztituált aminosavak esetében, melyeknél sorban 9 %-os és 20 %-os eredményekhez jutottunk. A monoszubsztituált *transz*-fahéjsav származékok esetében, a *meta* pozícióban elektron-donor szubsztituensekkel ellátott szubsztrátok, így például a *meta*-metoxi-*transz*-fahéjsav (**1m**) és a *meta*-tirozin (**1q**) kiemelkedően magas konverzió értékeket mutattak, sorra 93 %-ot és 98 %-ot (reprezentatív HPLC kromatogrammok - **9. függelék** és **10. függelék**). Több nagy térkiterjedésű szubsztrát esetén is magas konverzió értékek megfigyelhetők, például a 3,4,5-trimetoxi-*transz*-fahéjsav (**1ab**) átalakításakor 90 %-os, a 3-(2-naftil)-*transz*-akrilsav (**1ae**) transzformációjakor pedig 74%-os eredményekhez jutottunk.



15. ábra - Az LaAAL ammónia addícióban való katalitikus alkalmazhatóságának feltérképezése során ellenőrzött szubsztrát könyvtár és a RP-HPLC-vel mért konverzió eredmények összefoglalása.

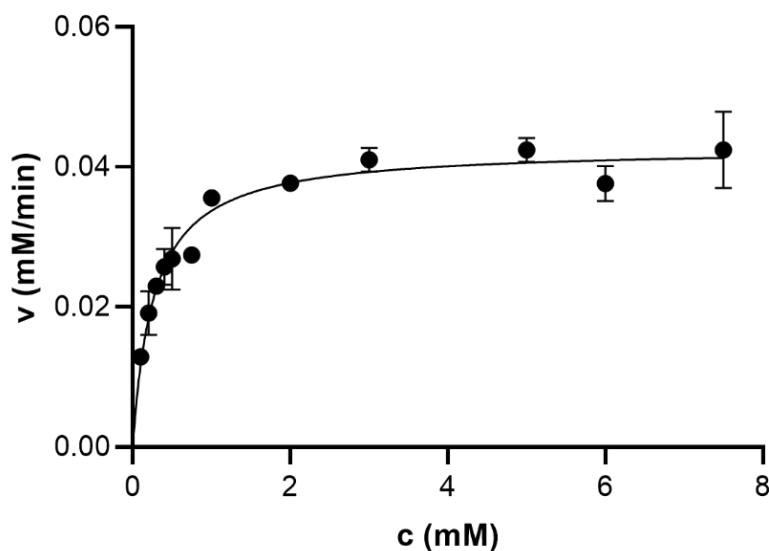
4.8 Kinetikai paraméterek meghatározása

A Michaelis-Menten kinetikai paramétereket az eliminációs reakció esetén, a meghatározott ideális reakciókörülmények között, azaz 30 °C-on, 9,5-ös pH-jú, 100 mM-os NaHCO₃-Na₂CO₃ pufferben vizsgáltuk (**7. táblázat**). Az ammónia addíciós reakciók esetén az enzimkinetikai mérések nem voltak kivitelezhetőek, mivel a magas koncentrációjú ammónia abszorbancia értéke hozzáadódott a minta abszorbanciájához, így a mért érték a berendezés detektálási határán kívül esett. Az eredmények alapján a természetes AAL szubsztrátok közül az LaAAL nem mutatott aktivitást az L-hisztidin irányába, illetve az L-fenilalanin felé is nagyon alacsony katalitikus hatékonyságot lehet megállapítani melyeket a magas K_M , (5,88 mM) illetve az alacsony k_{cat} (0,51 s⁻¹) és k_{cat}/K_M (0,09 s⁻¹ · mM) értékek is alátámasztanak, ezzel ellentétben az L-tirozin irányába 3,62 s⁻¹ mM-os k_{cat}/K_M értéket határoztuk meg, mely eredmény az LaAAL-t a természetes AAL-ok közül a TAL-ok csoportjába kategorizálja. Emellett az enzim kiemelkedően magas, 6,43 és 6,42 s⁻¹·mM-os katalitikus hatékonyságot mutatott az L-2-naftilalanin (**2ae**) és a *meta*-metoxi-L-fenilalanin (**2m**) felé (a mérési adatok alapján felállított Michaelis-Menten görbe megtekinthető a **16. ábrán**, valamint a kalibrációs görbe a **11. függelékben**, mely során különböző *meta*-

metoxi-*transz*-fahéjsav koncentrációk abszorbancia értékeinek követésével meghatározásra került az extinkciós koefficiens és az optikai úthossz szorzata.

7. táblázat - A 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin és 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsav közötti ammónia eliminációs reakció kinetikai paraméterei, különböző szubsztrátok esetén.

Szubsztrát	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ ·mM)
L-fenilalanin (2a)	$5,88 \pm 0,55$	$0,51 \pm 0,01$	0,09
L- <i>m</i> -tirozin (2q)	$0,29 \pm 0,03$	$0,63 \pm 0,01$	2,14
<i>m</i> -MeO-L-fenilalanin (2m)	$0,27 \pm 0,03$	$1,72 \pm 0,04$	6,42
3,4-diMeO-L-fenilalanin (2d)	$1,11 \pm 0,08$	$1,14 \pm 0,03$	1,02
3,4,5-triMeO-L-fenilalanin (2ab)	$2,59 \pm 0,22$	$0,77 \pm 0,01$	0,30
3-F,4-MeO-L-fenilalanin (2ac)	$6,26 \pm 0,78$	$0,14 \pm 0,02$	0,02
L-2-naftilalanin (2ae)	-	-	6,43
L-tirozin (2b)	-	-	3,62



16. ábra - A meghatározott Michaelis-Menten görbe a meta-metoxi-L-fenilalanin, LaAAL által katalizált ammónia eliminációs reakciója esetén.

5. Összefoglaló

Kutatásunk fő célja új, elektron-donor szubsztituensekkel szemben magas katalitikus hatékonysággal rendelkező aromás ammónia-liáz enzimek feltérképezése volt. Az adatbányászati eszközök segítségével kiválasztott, *Loktanella atrilutea*-ból kinyert aromás ammónia-liáz kiemelkedően magas aktivitást mutatott a 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin szintézisében, így az aminosav szekvenciája alapján hasonlóságvizsgálatot végeztünk el, homológ enzimek kiválasztásával. Többszörös szekvencia összerendezés és filogenetikai analízis során megállapítottuk, hogy a nemrég felfedezett enzimcsoport nagy valószínűséggel a MIO

enzimcsalád egy alosztályát képezi mely bakteriális eredetű fenilalanin ammónia-liázokból fejlődött ki az evolúció során.

Az *LaAAL* és homológjainak katalitikus szitusának vizsgálata alapján, PCR révén a megaprimer módszerrel pontmutációkat vezettünk be a cél enzim katalitikus központjába, tükrözve a felkutatott homológok katalitikus központjának elektrofil részében megjelenő, az *LaAAL*-tól eltérő aminosav végződéseket, valamint növelve a katalitikus zseb nagyságát. Az egész-sejtes biokatalizátorok tesztelése során felfedeztük, hogy az alkalmazott mutációs módszer nem javította az *LaAAL* aktivitását a 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsav felé a reverzibilis ammónia addíciós reakció esetén, sugallva, hogy ezen aminosav oldalláncok nem az elektrondonor szubsztituenseket tartalmazó szubsztrátok iránti specificitást növelik. Ezért a közeljövőben ezen homológok klónozását és szubsztráttartományuk meghatározását is tervezzük. Ugyanakkor, a kinyert *LaAAL* mutánsok aktivitásának tesztelése további szubsztrátok esetén kiegészítő információval szolgálhat a katalitikus központ hidrofób zsebének ezen új oldallánc-mintázatának szerepéről.

A natív *LaAAL* ígéretes katalitikus alkalmazhatóságának fényében célul tűztük ki az enzim karakterizálását is. A 3,4-dimetoxi-*transz*-fahéjsav és 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin közötti reverzibilis ammónia addíciós reakció esetén meghatározásra kerültek az enzim optimális működési körülményei, melyek 30 °C-on, az ammónia addíciós út esetén 4 M-os ammónium-karbamát (pH ~ 9,5) reakcióoldat, az eliminációs reakció esetén pedig 100 mM-os NaHCO₃-Na₂CO₃, pH 9,5 pufferoldat. Alkalmazva az optimális reakciókörülményeket, a szintetikus szempontból értékes ammónia addíciós reakcióban feltérképezésre került az *LaAAL* szubsztráttartománya, az enzim konverzió-alapú aktivitásának követésével számos mono-, di- és poli-szubsztituált *transz*-fahéjsav származékkal szemben. Az enzim széles körű katalitikus adaptabilitást mutatott, magas konverzió értékek mellett átalakítva több mono-szubsztituált elektron-donor szubsztituensekkel ellátott szubsztrátot (pl. *meta*-metoxi-*transz*-fahéjsav) és nagyobb térkiterjedésű szubsztrátot is (pl. 3-(2-naftil)-*transz*-akrilsav). Az enzimkinetikai paraméterek meghatározását követően, kijelenthető, hogy a MIO enzimcsalád tagjai közül az *LaAAL* a tirozin ammónia-liázok csoportjába inkadrálható, hiszen a három természetes AAL szubsztrát esetében az L-tirozin átalakításában rendelkezett a legmagasabb katalitikus hatékonysággal.

Az új AAL-ok természetes szerepének meghatározása érdekében további vizsgálatokra van szükség, így például az enzimcsoport genomikus kontextusának feltérképezése, valamint az *LaAAL* és homológjainak különböző szubsztrátokkal szembeni aktivitásának mérése.

6. Köszönetnyilvánítás

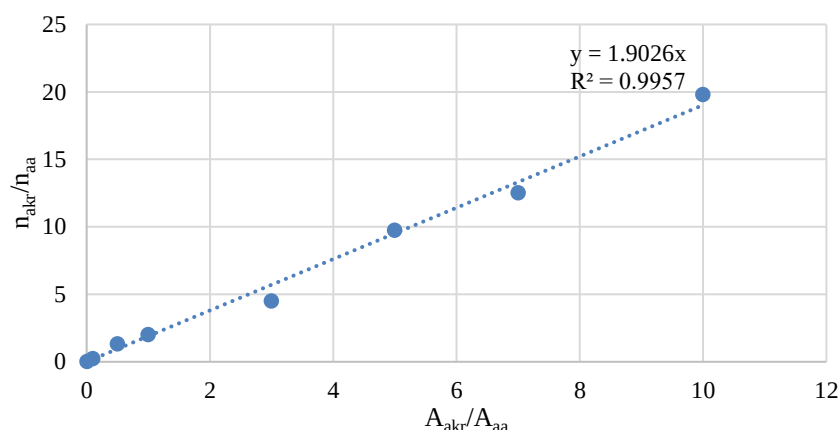
A bemutatott kutatómunka A Babeş–Bolyai Tudományegyetem, Enzimológia és Alkalmazott Biokatalízis Kutatóközpontjában volt elvégezve.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Bencze László-Csabának, valamint Tomoiagă Raluca-Bianca és Boros Krisztina doktorandusz hallgatóknak a kutatás során nyújtott iránymutatásért és támogatásért.

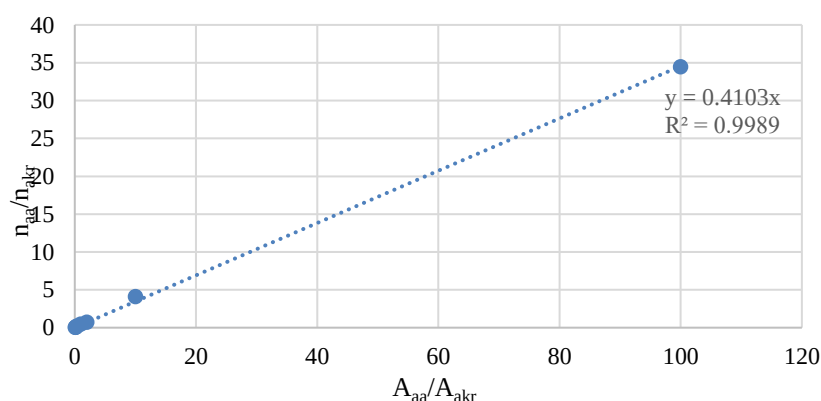
7. Irodalomjegyzék

- 1 E. E. Kempa, J.L. Galman, F. Parmeggiani, J. R. Marshall, J. Malassis, C.Q. Fontenelle, J.-B. Vendeville, B. Linclau, S. J. Charnock, S. L. Flitsch, N. J. Turner és P. E. Barran, *JACS Au*, 2021, **1**, 508.
- 2 V. R. Arava, S. R. Amasa, B. K. G. Bhatthula, L. S. Kompella, V. P. Matta és M.C.S. Subha, *ChemInform*, 2014, **45**, chin.201401078.
- 3 Y. N. Belokon, V. I. Bakhmutov, N. I. Chernoglazova, K. A. Kochetkov, S. V. Vitt, N. S. Garbalinskaya és V. M. Belikov, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1988, 305.
- 4 F. Parmeggiani, N. J. Weise, S. T. Ahmed és N. J. Turner, *Chemical Reviews*, 2018, **118**, 73.
- 5 F. Peng, U. Engel, H. Aliyu és J. Rudat, *Frontiers in Genetics*, 2022, **13**, 851738.
- 6 N. S. Punekar, *ENZYMES: Catalysis, Kinetics és Mechanisms*. Springer Singapore, 2018.
- 7 Z.-P. Yang, D. J. Freas és G. C. Fu., *Journal of the American Chemical Society*, 2021, **143**, 8614.
- 8 G. F. Matcher, R. A. Dorrington és S. G. Burton, *Unnatural Amino Acids*, (Pollegioni, L. & Servi, S.) Humana Press, 2012, **794**, 37.
- 9 E.Z.A. Nagy, S. D. Tork, P. A. Lang, A. Filip, F. F. Irimie, L. Poppe, M. I. Toşa, C. J. Schofield, J. Brem, C. Paizs és L. C. Bencze, *ACS Catalysis*, 2019, **9**, 8825.
- 10 J. Yu, J. Li, S. Cao, T. Wu, S. Zeng, H. Zhang, J. Liu és Q. Jiao, *Catalysis Communications*, 2019, **120**, 28.
- 11 S. D. Tork, M. E. Moisă, L. Cserepes, A. Filip, L. C. Nagy, F. D. Irimie és L. C. Bencze, *Scientific Reports*, 2022, **12**, 10606.
- 12 J. L. Galman, F. Parmeggiani, L. Seibt, W. R. Birmingham és N. J. Turner, *Angewéste Chemie International Edition*, 2022, **61**, e202112855.
- 13 M. Christiernin, *Plant Physiology és Biochemistry*, 2006, **44**, 693.
- 14 S. T. Ahmed, F. Parmeggiani, N. J. Weise, S. L. Flitsch és N. J. Turner, *ACS Catalysis*, 2018, **8**, 3129.
- 15 R. B. Tomoiagă, S. D. Tork, A. Filip, L. C. Nagy és L. C. Bencze, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, **107**, 1243.
- 16 J. P. Bielawski, *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, Elsevier, 2016, 61.
- 17 X. Feng, J. Sanchis, M. T. Reetz és H. Rabitz, *Chemistry – A European Journal*, 2012, **18**, 5646.
- 18 J. M. Wages, *Encyclopedia of Analytical Science*, Elsevier, 2005, 243.
- 19 Z. Xu, A. Colosimo és D. C. Gruenert, *E. coli Plasmid Vectors*, Humana Press, 2003, **235**, 203.
- 20 K. Gao, R. Oerlemans és M. R. Groves, *Biophysical Reviews*, 2020, **12**, 85.
- 21 B. Srinivasan, *The FEBS Journal*, 2022, **289**, 6086.
- 22 R. C. Edgar, *Nucleic Acids Research*, 2004, **32**, 1792.
- 23 S. Q. Le és O. Gascuel, *Molecular Biology and Evolution*, 2008, **25**, 1307.
- 24 C.A.D.M Russo és A. P. Selvatti, *Molecular Biology és Evolution*, 2018, **35**, 2327.
- 25 F. Cadoret, C. Soscia és R. Voulhoux, *Pseudomonas Methods és Protocols*, (Filloux, A. & Ramos, J.-L.) Springer New York, 2014, **1149**, 11.

Függelék



1. függelék - Kidolgozott kalibrációs görbe 3,4-dimetoxi-transz-fahéjsav és 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin közötti ammónia addíciós reakció konverzió értékeinek meghatározására, HPLC módszer segítségével.



2. függelék - Kidolgozott kalibrációs görbe 3,4-dimetoxi-L-fenilalanin és 3,4-dimetoxi-transz-fahéjsav közötti ammónia eliminációs reakció konverzió értékeinek meghatározására, HPLC módszer segítségével.

3. függelék - Meghatározott mérési hullámhosszok és a moláris extinkciós koefficiens és optikai úthossz felhasznált szorzata az enzim aktivitási és kinetikai mérések esetén.

Szubsztrát	Hullámhossz (nm)	$\epsilon \cdot l$ (mM ⁻¹ ·cm ⁻¹)
2a	290	6.27
2b	290	7.48
2d	308	10.9
2m	290	5.61
2q	310	2.32
2ab	308	6.96
2ac	308	7.39
2ae	310	9.48

4. függelék - Alkalmazott RP-HPLC metódusok és relatív válaszfaktorok a konverzió értékek meghatározására. Agilent 1200 berendezés és Gemini NX-C18 (150 × 4,5 mm; 5 µm) oszlop. Mozgó fázis pH 9-es, 0,1 M-os NH₄OH (A) oldatl és metil-alkohol (B).

Szubsztrát	Eluens (% B)	Áram (mL/perc)	Hőmérséklet (°C)	Hullámhossz (nm)	Retenció idő (perc)		Relatív válaszfaktor (R _f)
					Aminosav	Akrilát	
1b	40	0,5	25	230	3,41	9,30	1,64
1e	25→40, 8 perc alatt	1	25	220	4,05	7,27	4,17
1f	25→32, 8 perc alatt	1	25	220	3,55	6,17	4,16
1g	10→60, 9 perc alatt	1	20	220	6,33	9,63	3,48
1h	35→50, 8 perc alatt	1	30	220	3,89	5,87	2,12
1i	10	1	50	210	4,6	8,63	2,43
1j	10→39, 12 perc alatt	1	20	220	4,58	9,41	7,16
1l	25→40, 8 perc alatt	1	25	220	4,36	7,69	4,20
1m	25→32, 8 perc alatt	1	25	220	3,30	5,83	2,87
1n	10→60, 9 perc alatt	1	20	220	7,47	10,65	3,76
1o	35→50, 8 perc alatt	1	30	220	4,65	6,80	4,55
1p	10	1	50	210	4,95	9,79	5,76
1q	45	0,5	25	210	3,31	9,13	2,09
1u	10→60, 9 perc alatt	1	20	220	7,70	10,77	1,31
1v	35→50, 8 perc alatt	1	30	220	4,93	7,12	1,65
1w	10→32, 9 perc alatt	1	20	260	6,61	9,08	0,92
1y	40→70, 8 perc alatt	1	30	270	6,88	7,73	0,88
1aa	20→40, 8 perc alatt	1	25	220	5,44	7,79	3,11
1ab	20→40, 8 perc alatt	1	20	220	5,13	6,54	2,25
1ae	35→65, 8 perc alatt	0,7	25	220	6,74	8,66	0,29

5. függelék - Alkalmazott HPLC metódusok beállítása az enantiomer felesleg meghatározása érdekében Crownpak CR-I (+) királis oszlopon (150 × 3 mm; 5 µm) mérve. A mozgó fázis 1-es pH-jú HClO₄ (C) és acetonitril (D) keveréke .

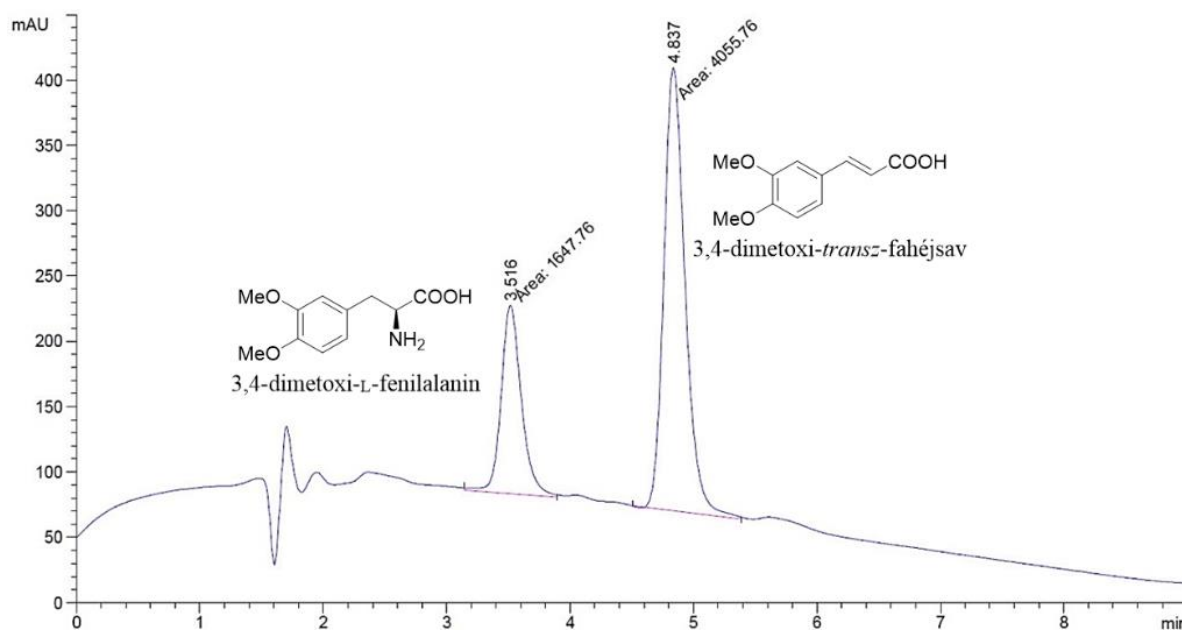
Szubsztrát	Eluens (C%D%)	Hőmérséklet (°C)	Hullámhossz (nm)	Retenció idő (min)	
				D	L
b	70:30	17	220	3,1	6,2
d	80:20	25	220	4,2	8,2
e	80:20	25	220	4,0	7,4
f	80:20	25	220	3,7	6,8
g	80:20	15	220	4,4	9,1
h	70:30	25	220	3,2	4,4
i	70:30	25	220	5,7	9,2
j	80:20	15	220	3,9	7,5
l	80:20	25	220	4,4	9,7
m	80:20	25	220	3,5	6,7
n	80:20	15	220	5,5	15,0
o	70:30	25	220	3,5	8,1
p	70:30	25	220	6,2	10,1
q	80:20	17	220	3,3	6,3
u	80:20	20	220	3,7	5,6
v	70:30	25	220	3,5	6,7
w	70:30	25	260	4,0	7,5
ab	80:20	25	220	3,7	6,5
ae	75:25	20	250	6,7	12,5

6. függelék - Az LaAAL kiválasztott homológjai a BLAST alapján kapott szekvenciákból, az E szám értéke az összes esetben zéróval egyenlő.

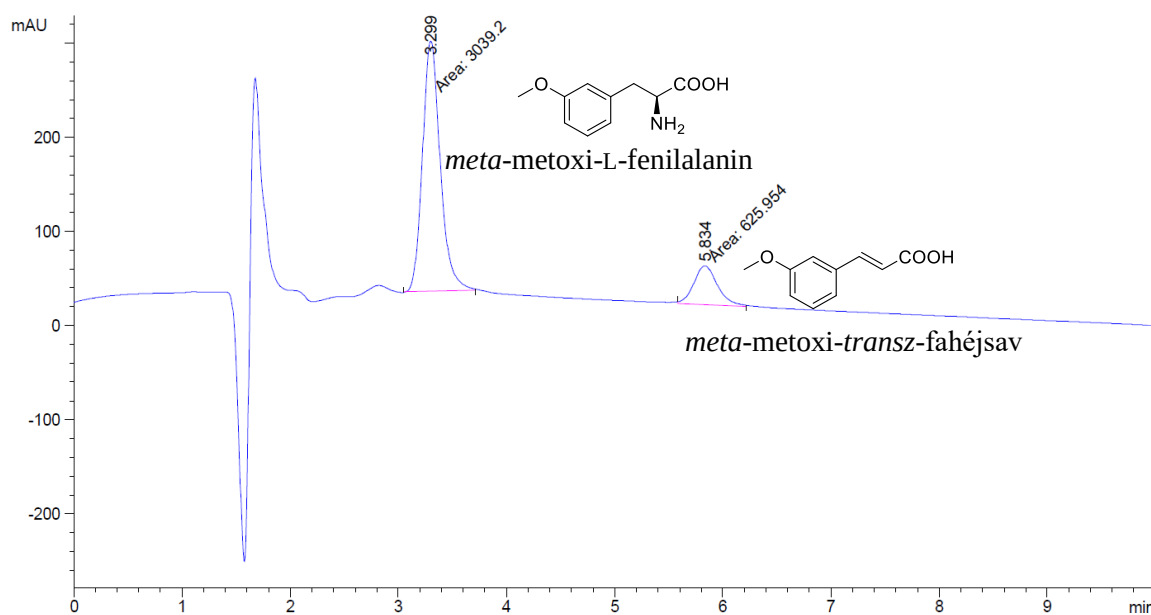
Nr.	Nr. NCBI	Faj	Család	Rövidítés	Lefedettségi %	Azonosság %
1	WP_178352722.1	<i>Loktanella atrilutea</i>	Rhodobacteraceae	LaAAL	-	-
2	WP_212536965.1	<i>Aestuariicoccus sp.</i> KMU-90	Rhodobacteraceae	AeAAL	100	85,40
3	QOV09174.1	kultúrátlan baktérium	-	AL-11	100	97,45
4	MBO6716438.1	Rhizobiaceae	Rhizobiaceae	RhAAL ₁	100	64,48
5	PVE48351.1	<i>Pararhodobacter aggregans</i>	Rhodobacteraceae	PaAAL	100	56
6	MBV9883721.1	Sphingomonadaceae	Sphingomonadaceae	SpAAL	99	66,30
7	WP_169285622.1	<i>Chelativorans sp.</i> ZYF759	Phyllobacteriaceae	ChAAL	99	65,20
8	MBV8104808.1	Hyphomicrobiales	Hyphomicrobiaceae	HyAAL ₁	99	64,29
9	MCI5076028.1	<i>Oricola sp.</i>	Phyllobacteriaceae	OrAAL	99	73,08
10	MCG6115566.1	<i>Mesorhizobium sp.</i>	Phyllobacteriaceae	MeAAL	99	65,75
11	MBL0935101.1	Rhizobiaceae	Rhizobiaceae	RhAAL ₂	98	67,61
12	WP_051375809.1	<i>Aliihoeflea sp.</i> 2WW	Phyllobacteriaceae	AlAAL	98	67,65
13	KAB2913557.1	Hyphomicrobiaceae	Hyphomicrobiaceae	HyAAL ₂	98	62,73
14	MBZ0140868.1	<i>Pseudorhodoplanes</i>	Hyphomicrobiaceae	PsAAL	98	62,55
15	WP_185801870.1	<i>Parasphingopyxis sp.</i> GrpM-11	Sphingomonadaceae	ParAAL	98	60,07
16	WP_221123718.1	<i>Rhizobium</i>	Rhizobiaceae	RhmAAL	97	60,49
17	WP_104045095.1	<i>Arthrobacter sp.</i> ZGTC412	Micrococcaceae	ArAAL	99	61,17
18	WP_163479703.1	<i>Geodermatophilus sabuli</i>	Geodermatophilaceae	GsAAL	99	60,59

7. függelék - Kiválasztott TAL, HAL és PAL enzimek a filogenetikai analízis megvalósításához.

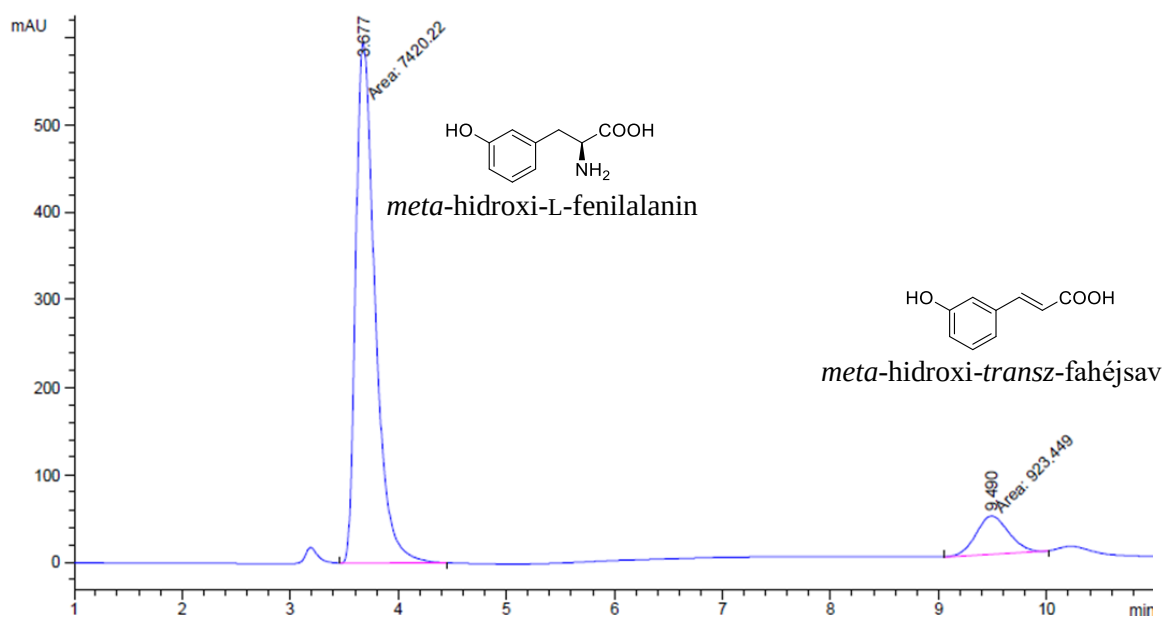
Csoport	Nr. NCBI	Faj	Rövidítés
HAL	Q7NCB3	<i>Gloeobacter violaceus</i>	GvHAL
	Q8PAA7	<i>Xanthomonas campestris</i>	XcHAL
	P21310	<i>Pseudomonas putida</i>	PpHAL
	Q9HU85	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PaHAL
	Q8EKJ4	<i>Shewanella oneidensis</i>	SoHAL
	P10944	<i>Bacillus subtilis</i>	BsHAL
	Q81AC6	<i>Bacillus cereus</i>	BcHAL
	A0A2H3LB72	<i>Candidatus Chloroploca asiatica</i>	CcHAL
	Q67JH4	<i>Symbiobacterium thermophilum</i> IAM 14863	StHAL
	B0UQ15	<i>Methylobacterium</i> sp. 4-46	MeHAL
TAL	Q3IWB0	<i>Cereibacter sphaeroides</i>	CsTAL
	MCI0391353.1	<i>Acidobacteriota bacterium</i>	AcTAL
	A0A1M4NET9	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	RcTAL
	WP_019449725.1	<i>Cupriavidus</i> sp. BIS7	CuTAL
	ABX04526.1	<i>Herpetosiphon aurantiacus</i>	HaTAL
	KR095308.1	<i>Herpetosiphon aurantiacus</i>	HaTAL ₁
PAL	P24481.1	<i>Petroselinum crispum</i>	PcPAL
	XP_003293982.1	<i>Dictyostelium purpureum</i>	DpPAL ₁
	F1A2T8	<i>Dictyostelium purpureum</i>	DpPAL ₂
	WP_144987405.1	<i>Gimesia aquarii</i>	GaPAL
	P45724	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtPAL
	F0SIS6	<i>Rubinisphaera brasiliensis</i>	RbPAL
	P11544	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	RtPAL
	A0A4Y5QZX1	<i>Angelica decursiva</i>	AdPAL
	AYJ76815.1	<i>Kitagawia praeuptora</i>	KpPAL
	XP_017258532.1	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i>	DcPAL
	O04058.2	<i>Helianthus annuus</i>	HaPAL
	XP_010515816.1	<i>Camelina sativa</i>	CsPAL
	NP_001303204.1	<i>Brassica napus</i>	BnPAL
	XP_006410883.1	<i>Eutrema salsugineum</i>	EsPAL
	XP_006290660.1	<i>Capsella rubella</i>	CrPAL
	BAA95629.1	<i>Catharanthus roseus</i>	CroesusPAL
	XP_011094662.1	<i>Sesamum indicum</i>	SiPAL
	P45726.1	<i>Camellia sinensis</i>	CsienensisPAL
	CAL91169.1	<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i>	CcPAL
	WP_012330172.1	unclassified <i>Methylobacterium</i>	MxPAL
	P10248.2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	RmPAL
	XP_023767814.1	<i>Lactuca sativa</i>	LsPAL
	KAA8518742.1	<i>Nyssa sinensis</i>	NsPAL
	AAK60275.1	<i>Manihot esculenta</i>	MnPAL
	ADY02661.1	<i>Parrya nudicaulis</i>	PnPAL
	AHB63479.1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	RgPAL
	ADL09136.1	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	BoPAL
	ABF50788.1	<i>Isatis tinctoria</i>	ItPAL
	TNY17356.1	<i>Rhodotorula diobovata</i>	RdPAL
	XP_018484019.1	<i>Raphanus sativus</i>	RsPAL
	POY71177.1	<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	RtwPAL
	XP_644510.1	<i>Dictyostelium discoideum</i> AX4	DdPAL
	WP_003337219.1	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	BlPAL
	KEF02660.1	<i>Streptomyces rimosus</i>	SrPAL
	Q3M5Z3.1	<i>Anabaena variabilis</i>	AvPAL



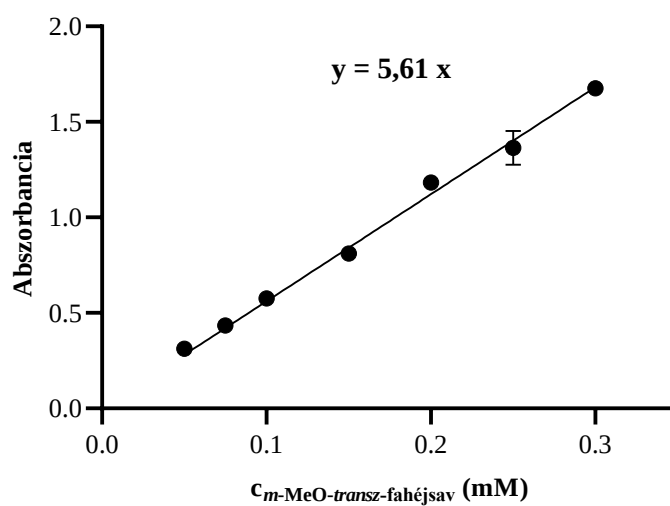
8. függelék - Reprezentatív HPLC kromatogram a konverzió értékek meghatározására az ammónia addíciós és eliminációs reakciók során.



9. függelék - HPLC kromatogram a konverzió értékek meghatározására a meta-methoxy-*trans*-fahéjsav LaAAL által katalizált, 20 órás ammónia addíciós reakciója esetében.



10. függelék - HPLC kromatogram a konverzió értékek meghatározására a *meta*-hidroxi-transz-fahéjsav LaAAL által katalizált, 20 órás ammónia addíciós reakciója esetében.



11. függelék - 290 nm-en meghatározott kalibrációs görbe a moláris extinkciós koefficiens és optikai úthossz szorzatának meghatározására a *meta*-metoxi-transz-fahéjsav esetén.