



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO:**

**SÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS NO CANÓNICOS.  
FENILALANINA AMONIO-LIASA.**

Autor: Alicia Rueda García

Fecha: 30 de junio del 2020

Tutor: Andrés R. Alcántara León

## **ÍNDICE:**

1. RESUMEN.....	3
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	4
4. OBJETIVOS.....	5
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	5
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5
6.1 <i>Mecanismos de acción de PAL</i> .....	5
6.2 <i>Estrategias de ingeniería enzimática</i> .....	11
6.3 <i>Técnicas de inmovilización enzimática</i> .....	14
6.4 <i>Aplicaciones de PAL en la Industria Farmacéutica</i> .....	17
7. CONCLUSIONES.....	19
8. BIBLIOGRAFÍA.....	19

## 1. RESUMEN

En los últimos tiempos, la síntesis quimioenzimática se ha postulado como una alternativa ecológica al uso de catalizadores químicos para la elaboración de compuestos con propiedades farmacológicas. La biocatálisis puede lograr una mayor sostenibilidad, ahorrar costos y mejorar la productividad y la calidad de los principios activos.

Las fenilalanina amonio-liasas pertenecen a una familia de enzimas muy interesantes para su uso como biocatalizadores, ya que poseen un rendimiento teórico del 100%, no necesitan un cofactor externo (lo que encarecería el coste) y no requieren el empleo de enzimas adicionales. Esta clase de enzimas cataliza la reacción de desaminación de arilaminoácidos, así como el proceso contrario, la aminación de sus respectivos compuestos arilacrilatos.

Los productos obtenidos a partir de estas reacciones se han comenzado a utilizar en industria para la elaboración de diversos fármacos peptidomiméticos. Además, se está empezando a plantear el uso de la enzima modificada en tratamientos de enfermedades como la fenilcetonuria, donde se observa una elevación en las concentraciones de fenilalanina.

Para que los procesos de biocatálisis sean rentables, se han desarrollado una serie de técnicas que incrementan el rendimiento mejorando la actividad enzimática como son los procesos mutagénicos, así como diferentes métodos para la recuperación y la reutilización de las enzimas los cuales consiguen el abaratamiento de los costes y su máximo aprovechamiento.

**Palabras clave:** *biocatalizadores, amonio-liasas, arilaminoácidos, peptidomiméticos, fenilalanina.*

## 2. ABSTRACT

Recently, chemo-enzymatic synthesis has been postulated as an ecological alternative to the usage of chemical catalysts for the production of compounds with pharmacological properties. Biocatalysis can achieve greater sustainability, save costs and improve the productivity and quality of the active ingredients.

Phenylalanine ammonia-lyases belong to a family of enzymes that are rather interesting as biocatalysts, since they have a theoretical yield of 100%, do not need an external co-factor (which would increase the cost) and do not require the use of additional enzymes. This class of enzymes catalyzes the arylaminoacid deamination reaction, as well as the opposite process, the amination of their respective arylacrylate compounds.

The products obtained from these reactions have begun to be used in the industry for the production of various peptidomimetic drugs. In addition, the employment of the modified enzyme in the treatment of diseases such as phenylketonuria, where an increase in phenylalanine concentrations is observed, is beginning to be considered.

In order to make biocatalysis processes profitable, a series of techniques have been developed to increase performance by improving enzymatic activity, such as mutagenic processes, as well as different methods for recovering and reusing enzymes, which reduce costs and make maximum use of them.

**Keywords:** *biocatalysts, ammonia-lyases, arylamino acids, peptidomimetics, phenylalanine.*

### 3. INTRODUCCIÓN

El interés despertado durante las últimas décadas en catalizadores de tipo enzimático es debido, en gran medida, a las muchas ventajas que poseen, tales como: su alta especificidad de reacción, la pequeña cantidad de desechos generados por dichos procesos y las condiciones moderadas con las que operan. Además, gracias a los avances biotecnológicos en áreas como la microbiología, la biología molecular, la ingeniería de proteínas y enzimática, las enzimas se han posicionado como una buena alternativa a la síntesis química.

Estos procesos biotecnológicos, han buscado principalmente desarrollar una producción eficiente de este tipo de catalizadores pretendiendo, a su vez, conservar su alta quimio-, regio- y estereoselectividad, mejorar su estabilidad, y compatibilizar con tecnologías sostenibles y procedimientos ambientalmente más ecológicos. Asimismo, gracias al desarrollo de áreas como la genómica y proteómica, ha sido posible tanto acceder a un extenso número de nuevas actividades enzimáticas de diferente origen, como manipular, diseñar y mejorar las nuevas y tradicionales actividades enzimáticas.

Uno de los principales problemas del uso de este tipo de biocatalizadores en industria es su recuperación al término de la catálisis. Esta limitante las convierte en un gasto fijo e impacta directamente al costo total del proceso. El desarrollo de métodos eficientes de inmovilización de enzimas, es decir, enzimas unidas física- o químicamente a un soporte inerte lo cual permite su fácil recuperación y reutilización, ha supuesto un gran avance en la consolidación del uso de enzimas a escala industrial. El uso de estas técnicas se ha incrementado de manera sustancial en las últimas décadas, debido a que no solo se ha comprobado que la inmovilización de enzimas permite reciclar el catalizador, sino que además ayuda a incrementar la estabilidad operacional del biocatalizador, permite un diseño más racional del reactor y, en algunos casos, incluso mejora la eficiencia catalítica de la enzima **(1)**.

La creciente demanda de acceso a aminoácidos ópticamente puros ha dado lugar al desarrollo de estos sintones a partir de diferentes rutas enzimáticas. Muchas de estas han sido desarrolladas usando acilasas, amidasas, hidantoidasas, aminotransferasas, amonio-liasas y aminoácido-deshidrogenasas.

Hasta la fecha, se ha observado que solo las aminotransferasas y las amonio-liasas son capaces de catalizar síntesis asimétricas sin la necesidad de reciclar el cofactor, implementar la dinámica cinética de las estrategias de resolución o de usar enzimas adicionales. Éstas consiguen que un sustrato prostereogénico pueda transformarse en un aminoácido ópticamente puro con un rendimiento teórico del 100%. Unos de los inconvenientes más comunes son: su baja estabilidad, sus estrechas especificidades de sustrato y su fuerte inhibición de sustrato, lo que conduce a bajas tasas de reacción. Asimismo, estas dos clases de enzimas pertenecen a una familia de enzimas dependiente del cofactor 4-metilidenimidazol-5-ona (MIO), el cual es sintetizado a partir de una reacción de condensación autocatalítica del tripéptido formado por Ala-Ser-Gly, y actúa como electrófilo en el mecanismo de reacción **(2)**.

Las fenilalanina amonio-liasas (PAL) se encuentran entre los biocatalizadores más estudiados para la producción de análogos ópticamente puros de *D* y *L*-fenilalanina, ya sean como células

enteras, enzimas puras o inmovilizadas, originando una amplia variedad de análogos de *L* y *D*-fenilalanina **(3)**.

En plantas, hongos y en algunas bacterias, la PAL tiene un papel fundamental siendo la primera enzima en la ruta de degradación de fenilalanina, catalizando la eliminación no oxidativa de amonio del aminoácido. El producto de esta reacción es el (*E*)-cinamato, precursor de un largo número de metabolitos como las ligninas, las cumarinas y los flavonoides. Además, en plantas monocotiledóneas, la fenilalanina amonio-liasa también tiene la capacidad de catalizar la reacción de desaminación de la tirosina, actuando con un mecanismo muy parecido al de la tirosina amonio-liasa (TAL) **(4)**.

#### 4. OBJETIVOS

El objetivo principal del trabajo es el conocimiento de los diferentes mecanismos de acción de la enzima PAL, por los que se obtienen arilaminoácidos (no) canónicos, útiles en la elaboración de fármacos peptidomiméticos. Como objetivo secundario, se describen diferentes métodos para la mejora del rendimiento de estos procesos, así como estrategias para su máximo aprovechamiento, como son la ingeniería enzimática y las técnicas de inmovilización. Por último, se exponen diferentes ejemplos de las aplicaciones clínicas de esta síntesis innovadora con buena perspectiva de futuro.

#### 5. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica con el fin de recopilar los conocimientos actualizados de la enzima PAL, utilizada hoy en día para la síntesis de varios aminoácidos (no) canónicos como son: *L-m*-(trifluorometil)fenilalanina, *D-m*-(trifluorometil)fenilalanina, *D-p*-metilfenilalanina, *L-p*-metoxifenilalanina, *L-m*-metoxifenilalanina y 3-(1-naftil)alanina. También se han investigado dos tipos de técnicas utilizadas para mejorar la rentabilidad de este tipo de síntesis.

Para la revisión bibliográfica se han consultado diferentes bases de datos científicas, siendo la más utilizada PubMed, en donde la búsqueda se ha centrado en artículos referentes a la fenilalanina amonio-liasa. Con el fin de entender la evolución a lo largo del tiempo de los conocimientos a cerca de PAL, se han escogido artículos publicados entre 1970 y la actualidad.

#### 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 6.1 Mecanismos de acción de PcPAL

###### 6.1.1 Mecanismo de eliminación $E_1cB$

El primer mecanismo de acción de PAL fue propuesto por Hanson y Havir en 1970 **(5)**, basándose en estudios realizados anteriormente sobre la histidina amonio-liasa (HAL) **(6)**, enzima perteneciente a la misma familia y análoga tanto estructuralmente como

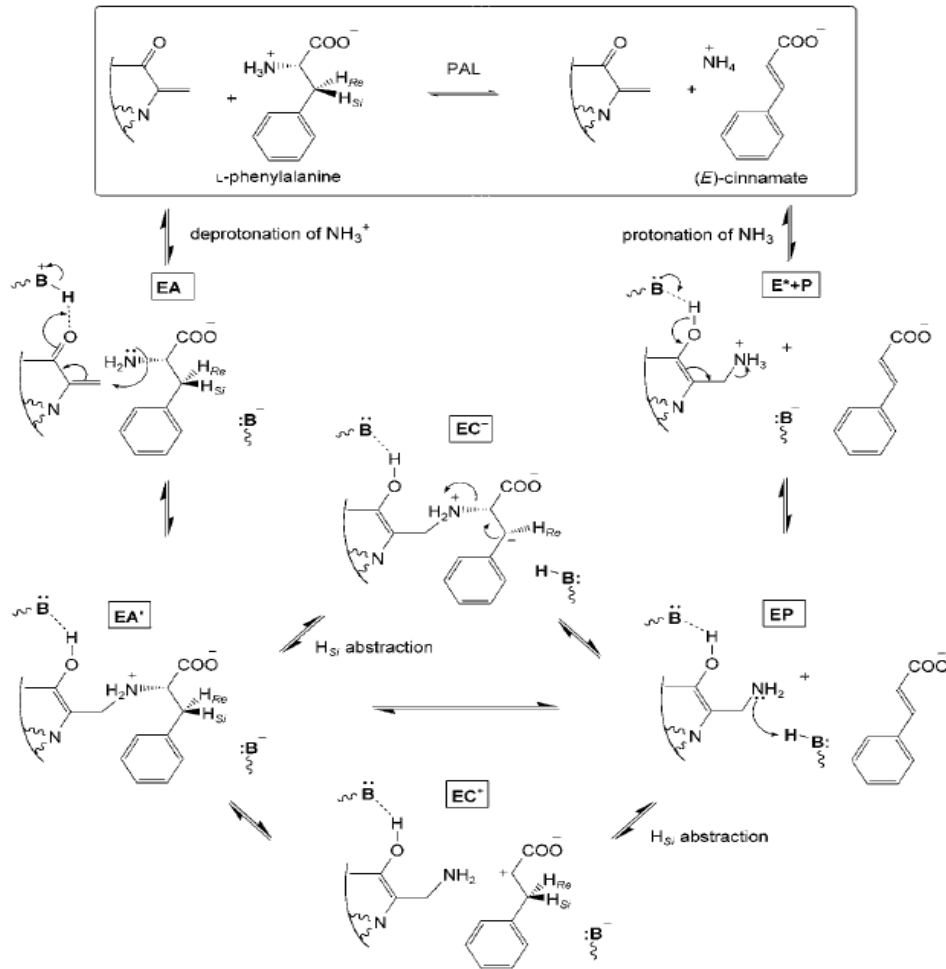
catalíticamente. Este biocatalizador facilita las reacciones de aminación y desaminación de la *L* y *D*-histidina y otros aminoácidos análogos.

En experimentos dirigidos a la identificación del centro electrófilo, encontraron que la enzima podía ser inhibida irreversiblemente por  $\text{NaBH}_4$ . Las investigaciones empleando  $\text{NaBH}_4$  tritiado, les condujeron a sugerir que un residuo de deshidroalanina estaba presente en el sitio activo. La naturaleza del procedimiento de reducción, la correlación observada entre la pérdida de actividad enzimática y la incorporación de tritio, y la magnitud de la incorporación sugirieron que se había llevado a cabo la reducción del centro electrófilo, y que el átomo de hidrógeno del borohidruro de sodio había sido incorporado al centro activo consiguiendo su reducción.

Después de una hidrólisis con HCl se obtenía como producto la *DL*-alanina-*t*, marcada con el átomo de tritio perteneciente al borohidruro sódico. Además, observaron que en la mayoría de los casos el tritio había sido sustituido en la posición  $\beta$ . En la interpretación de este resultado asumieron que la inactivación y la tritiación eran una y pertenecían al mismo proceso, un átomo de H del borohidruro era incorporado al sitio activo reduciéndolo. Como la reducción con borohidruro implicaba un ataque al centro electrófilo, propusieron entonces que el centro electrófilo involucrado en la catálisis era directamente tritiado, por lo tanto, concluyeron que el sitio activo debía contener un residuo de deshidroalanina que al reducirse formaba el residuo de alanina tritiado.

Los resultados obtenidos demostraban que la posición beta del residuo de deshidroalanina era el centro electrófilo del sitio activo. El mecanismo propuesto comenzaba con la desprotonación del grupo amonio de la *L*-fenilalanina, continuando con la adición nucleofílica en  $\beta$  de éste al residuo de deshidroalanina. Desde este punto, Hanson y Havir propusieron dos caminos diferentes: el primero era un mecanismo de tipo  $E_{1cB}$ , el más apoyado por los enzimólogos, en que se abstraía el  $H_\beta$  de la fenilalanina formándose un carbanión bencílico. El segundo camino era un mecanismo de tipo  $E_1$  en el que se producía la hidrólisis del enlace  $N-C^\alpha$ , dando lugar a un carbocatión, al que posteriormente se le abstraería el  $H_\beta$ , llegando al mismo producto. No obstante, la ocurrencia de ambos mecanismos era poco probable, ya que el valor de  $pK_a$  para la abstracción de un protón bencílico era de más de 40, por lo que se necesitaría una base muy fuerte en condiciones extremas para tal abstracción; y el carbocatión en  $\alpha$  a un grupo carboxilo poseía también una energía muy elevada. Aunque ambos pasos eran químicamente viables, eran improbables por los intermedios de alta energía que se encontraban involucrados. Posteriormente, Hermes propuso una tercera alternativa (**7**), dónde proponía un mecanismo de tipo  $E_2$ , en el cual se pasaba directamente del paso  $EA'$  al EP. (**Esquema 1**)

Aunque el mecanismo  $E_{1cB}$  poseía ciertos puntos inexplicables como la desprotonación de un protón no ácido en posición  $\beta$  por parte de una base enzimática ( $EC^-$ ), fue aceptado por los enzimólogos y estuvo reconocido durante casi 30 años. La postulación de una alternativa a este mecanismo surgió de manera indirecta. Se originó en la búsqueda del precursor del residuo de deshidroalanina.



**Esquema 1.** Mecanismo de acción de PAL propuesto por Hanson y Havir (5) y modificado por Hermes et al. (7).

### 6.1.2 Mecanismo de tipo Friedel-Crafts

Se sabía que la deshidroalanina podía formarse por la deshidratación de una serina. La cuestión se resolvió mediante mutaciones específicas de los residuos de serina que se observaron en varias secuencias análogas de HAL y PAL. La mutación de Ser 143 en HAL de *P. putida* (8) y Ser202 en PAL (9) de *Petroselinum crispum* a alanina condujo a una disminución de la actividad de la enzima en un factor de más de 1000. La mutación de otros residuos de serina conservados tuvo poco o ningún efecto en la actividad. Este resultado identificó los dos residuos de serina mencionados como los precursores del residuo de deshidroalanina catalíticamente esencial.

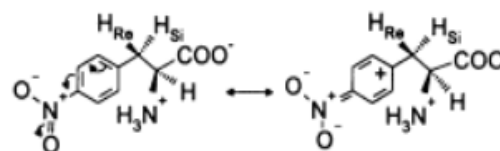
J. Rétey et al. (10), estimulados por el descubrimiento en el que se observó la función del grupo prostético de deshidroalanina de HAL (11) como catalizador electrofílico en la activación del átomo de hidrógeno en  $\beta$ , decidieron examinar la reacción de PAL haciendo uso de mutantes sin la deshidroalanina y, además, utilizaron otros sustratos alternativos. Tras asegurarse de qué aminoácido había que mutar para evitar la formación del grupo prostético, se procedió a realizar la mutagénesis dirigida al sitio en el que se intercambiaba la serina 202 por una alanina y por una treonina. Estos mutantes y la enzima salvaje tras un tratamiento

con borohidruro sódico se consideraron inactivos para la *L*-fenilalanina, viéndose reducidos sus valores de  $V_{\max}$  entre  $10^3$  y  $10^4$  veces.

Klee et al. (12) encontraron que la 5-nitrohistidina era también un sustrato de HAL. Observaron que la presencia del grupo nitro llevaba a una disminución de la electrodensidad del anillo de imidazol y, por lo tanto, a un aumento de la acidez de los átomos de hidrógeno en posición  $\beta$ . En consecuencia, se dedujo que la abstracción del protón en  $\beta$  ya no era el paso que determinaba la velocidad de reacción.

Este resultado sugirió que la función del residuo de deshidroalanina podía ser similar a la del grupo nitro en la 5-nitrohistidina, la acidificación del átomo de hidrógeno en  $\beta$ . Para probar esta idea, se midió la actividad de la 5-nitrohistidina tanto con HAL de tipo silvestre como con derivados de HAL mutados en Ser143 o inactivados por el tratamiento con  $\text{NaBH}_4$  (11). La velocidad de reacción fue prácticamente independiente del derivado de HAL utilizado. En otras palabras, la presencia del grupo nitro hacía innecesaria la presencia del grupo electrófilo.

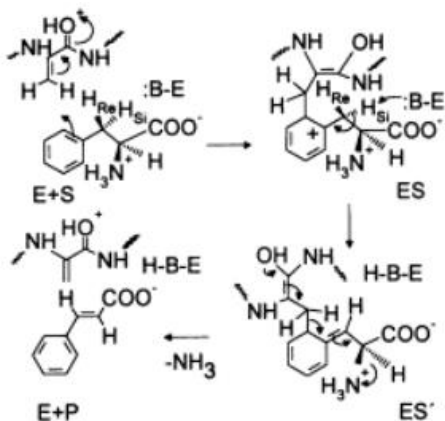
Análogamente, J. Rétey et. al (10) comprobaron que los mutantes PAL Ser202Ala, Ser202Thr y la enzima salvaje inactivada con borohidruro sódico reaccionaban mucho más rápido con la 4-nitrofenilalanina (**Esquema 2**) que con el sustrato natural. Su  $V_{\max}$  incrementaba dos órdenes de magnitud con respecto al sustrato no sustituido. Por tanto, se sugirió que el grupo 4-nitro podía sustituir parcialmente a la deshidroalanina prostética.



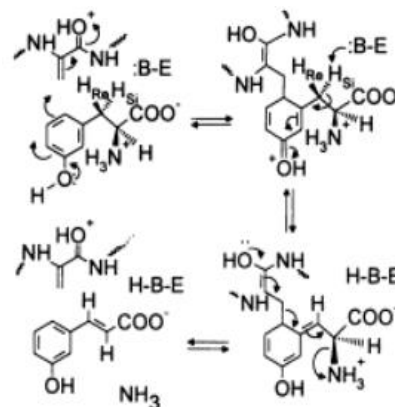
**Esquema 2.** Estructuras resonantes de 4-nitrofenilalanina mostrando la activación de  $H_\beta$ .

Además, la relativa facilidad con la que PAL reaccionaba con la *L*-4-nitrofenilalanina contradecía lo propuesto anteriormente dónde se creía que el mecanismo comenzaba con un ataque nucleofílico del grupo  $\alpha$  amino de la deshidroalanina. Estas consideraciones, junto con los resultados de un estudio en el que salía a la luz los mecanismos de acción de HAL y de la urocanasa (13), donde el ataque del  $C_5$  del imidazol uniéndose al grupo prostético modificaba la reactividad del  $H_\beta$ , sugirió un rol análogo del grupo prostético de la PAL. Esto confirmaba un ataque electrofílico al grupo fenilo, sobre el cual aún se tenía muy poco conocimiento en enzimología. Por tanto, si el grupo carbonilo de la amida de la deshidroalanina era protonado, su función equivaldría a la de un catión vinílico, es decir, el anillo aromático atacaría a la deshidroalanina cargada positivamente. Se concluyó entonces la presencia de un mecanismo de tipo Friedel-Crafts que comenzaba con una acilación electrofílica. Como resultado, la carga positiva del anillo aromático facilitaba la abstracción de  $H_\beta$  por una base enzimática. Tras esta abstracción, se produciría simultáneamente rearomatización del anillo y la eliminación de amonio de la fenilalanina (**Esquema 3**).



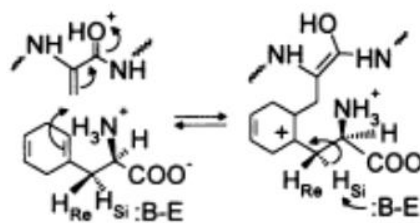


**Esquema 3.** Mecanismo de acción propuesto por J. Rétey (10) en el que se muestra un ataque electrofilo de tipo Friedel-Crafts por parte del grupo prostético deshidroalanina.



**Esquema 4.** Mecanismo de reacción de PAL con m-tirosina como sustrato.

Además, Rétey et al. quisieron verificar el mecanismo con la tirosina, siendo ésta otro posible sustrato, un poco más reactivo, de PAL. Si la reacción de tipo Friedel-Crafts propuesta era válida, la m-tirosina (3-hidroxifenilalanina) debía ser mejor sustrato que la L-tirosina. Y en efecto, fue el caso (**Esquema 4**). PcPAL incluso reaccionaba un 10-20% más rápido con m-tirosina que con L-fenilalanina. El grupo OH en la posición 3 del anillo facilitaba el ataque electrofílico en posiciones *orto* o *para*. Entonces surgió la cuestión sobre la posición donde se daba el ataque con mayor facilidad. Aunque los resultados no daban una respuesta definitiva, las conclusiones de Hanson et al. (14) y Hermes et al. (15) en las que se concluía que la 3,6-dihidrofénilalanina era un sustrato moderadamente bueno para PAL apoyaban un ataque en *orto*. El valor más bajo de  $V_{max}$  se debía a una menor estabilidad del carbonio terciario. Un ataque en posición *para* conduciría a catión carbonio secundario aún menos estable que el intermedio anterior. Estos resultados apoyaron el ataque en posición *orto* (**Esquema 5**).

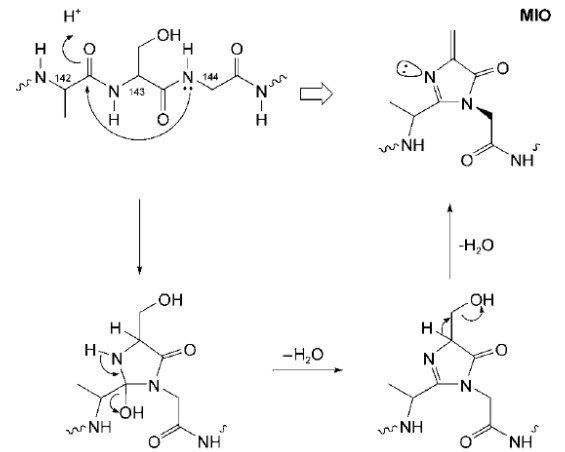


**Esquema 5.** Ataque electrofilo a la 3,6-dihidrofénilalanina que conduce a la formación de un ión carbonio terciario, facilitando la abstracción del H<sub>6</sub>.

### 6.1.3 Descubrimiento de MIO como cofactor

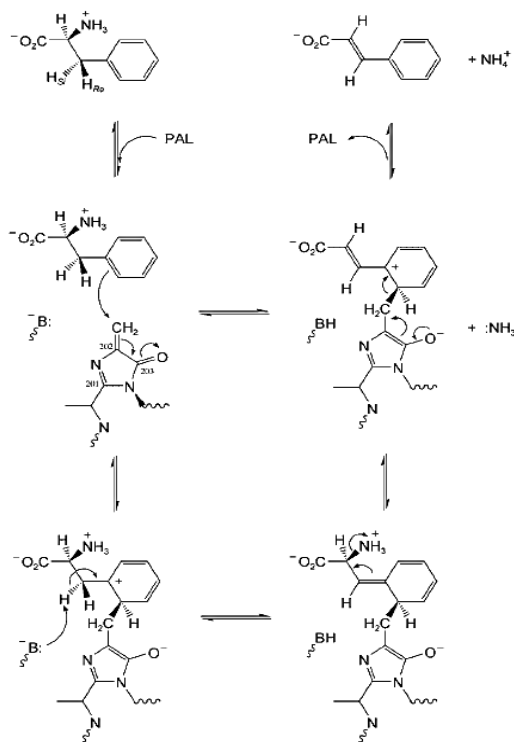
Sin embargo, al dilucidar la estructura cristalina de la enzima homóloga HAL, la deshidroalanina propuesta resultó ser en realidad el grupo 4-metiliden-imidazol-5-ona (MIO) (16), el cual se observó que se formaba autocatalíticamente por una ciclación seguida de la eliminación de dos moléculas de agua del tripéptido Ala142-Ser143-Gly144 como se muestra en el **Esquema 6**.

En una alineación secuencial entre HAL y PAL, los residuos Ala202-Ser203-Gly204 de PAL se asignaron para la formación de MIO de acuerdo con el residuo Ser203\* ya identificado anteriormente (9). Además, el estudio realizado por Ritter y Schulz mostrando la estructura cristalina de PcPAL, confirmó la presencia de este grupo prostético en el centro activo de la enzima. La mayor electrofilia del grupo MIO con respecto a la de la deshidroalanina hizo que la hipótesis sobre un ataque de tipo Friedel-Crafts en el anillo aromático fuese factible (17). El mecanismo de acción de PAL, iniciado por un ataque de Friedel-Crafts del grupo MIO al anillo aromático se muestra en el **Esquema 7**.

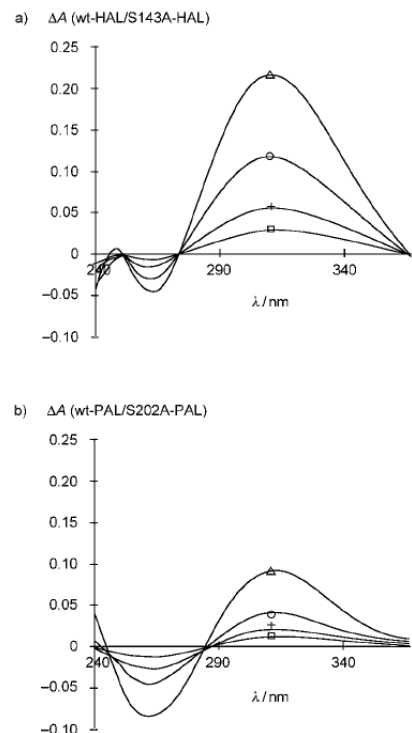


**Esquema 6.** Formación del grupo MIO en HAL por modificación post-translacional.

Anteriormente, hacia 1970 Klee informó de un hombro a unos 315 nm en el espectro UV de HAL, pero no pudo ofrecer ninguna explicación para su ocurrencia en ese momento (18, 19). Tras el descubrimiento de MIO propusieron al sistema de conjugación cruzada como posible responsable de la aparición del hombro en el espectro UV. Registraron los espectros de diferencia de UV de los mutantes HAL y PAL que no contienen el grupo MIO y las correspondientes enzimas de tipo salvaje. En ambos casos se observó un máximo de absorción distinto a 308 nm (20). (**Figura 1**)



**Esquema 7.** Mecanismo de acción de PAL suponiendo un ataque de tipo Friedel-Crafts de MIO al grupo fenilo de la L-fenilalanina.



**Figura 1.** Diferencias en el espectro UV de a) wt-HAL y el mutante Ser143 y b) wt-PAL y el mutante Ser202.

#### 6.1.4 Aminación de arilacrilatos

Además, tras el descubrimiento de MIO como cofactor, se observó que el mecanismo de acción no era irreversible, como en un principio se creía, sino que se vio que al añadir altas concentraciones de amoníaco (5 M), la fenilalanina amonio-liasa también conseguía catalizar la reacción contraria a la desaminación, es decir, podía lograr la adición enantioselectiva de amoníaco en sustratos de tipo arilacrilato **(21)**. Asimismo, se incorporaron diferentes estructuras análogas a la fenilalanina y su arilacrilato, comprobándose que para éstos también existía actividad catalítica **(22)**.

### 6.2 Estrategias de ingeniería enzimática

Desarrollar biocatalizadores con propiedades que se ajusten a las condiciones de trabajo en los procesos industriales es una necesidad importante dentro de la biocatálisis. A pesar de presentar una serie de ventajas respecto a otros catalizadores, el uso de enzimas en procesos industriales no ha alcanzado su completa madurez. Así, las enzimas o células pueden ser inestables, presentar una baja especificidad de sustrato, baja actividad o no actuar con la enantioselectividad requerida. Una solución a esto es el desarrollo de nuevos biocatalizadores con las propiedades requeridas, es decir, hechas a la medida del proceso **(23)**.

Son numerosas las estrategias que se han ensayado para obtener nuevos y mejores catalizadores, aunque se pueden agrupar fundamentalmente en tres categorías:

1. Búsqueda de nuevas enzimas naturales a través de screening de organismos y metagenómica.
2. Obtención de biocatalizadores mediante mutagénesis y evolución dirigida.
3. Diseño de novo, enzimas a la carta **(24)**.

La mutagénesis racional y la evolución dirigida de enzimas son dos estrategias que permiten mejorar distintas propiedades de los biocatalizadores, tales como el aumento de la eficacia catalítica y/o estabilidad, la modificación de las condiciones óptimas de reacción, el mayor reconocimiento de sustratos o la búsqueda de nuevas actividades.

La primera de ellas se basa en la modificación justificada de residuos concretos de la estructura de la enzima. Se exige un amplio conocimiento del gen, de la estructura tridimensional de la enzima y de las relaciones entre la estructura y su función. En esta alternativa se consigue alterar la secuencia de aminoácidos y, por lo tanto, las propiedades catalíticas mediante un diseño racional seguido de una mutagénesis sitio-dirigida.

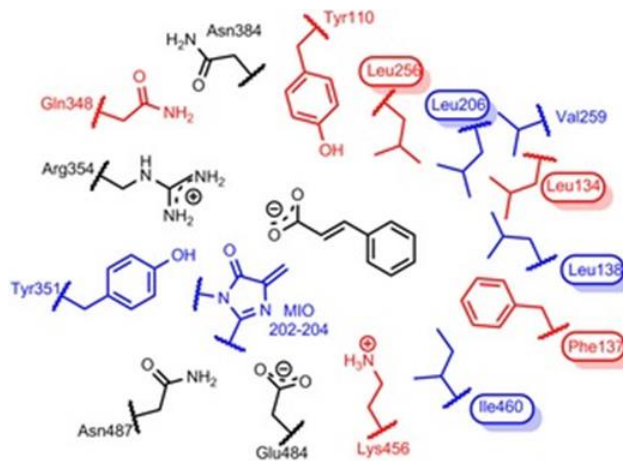
Por el contrario, la alternativa de “diseño irracional” se ha consolidado como una herramienta poderosa para la modificación de la actividad enzimática, ajustando según se desee las propiedades catalíticas. La evolución dirigida o “evolución in vitro” de enzimas tiene un parecido a la hipótesis evolutiva sugerida por Darwin. En el diseño irracional se realizan diversas mutaciones de forma aleatoria a un gen concreto. De esta forma, se genera una genoteca de mutantes. Esta genoteca contiene, por tanto, diferentes enzimas variantes de la enzima salvaje. Tras el primer proceso de mutagénesis se somete a una primera selección,

donde los mejores candidatos se escogerán para ser sometidos a un segundo proceso de mutagénesis. Se continuará hasta conseguir la enzima modificada con las condiciones óptimas de reacción deseadas (25).

➤ *Mutagénesis dirigida al sitio en PcPAL*

En el estudio detallado a continuación, se desarrolla una posible estrategia de mutagénesis para la fenilalanina amonio-lias de la especie *Petroselinum crispum* (26).

El enfoque escogido para los procesos de mutagénesis en la enzima salvaje (wt-PcPAL), se centró en la estructura de ésta, seleccionando distintos mutantes que conseguían reducir los problemas de impedimento estérico de los residuos L134, F137, L138, L206 E I460; encontrados en el sitio activo hidrofóbico de PcPAL (Figura 2). Éstos fueron intercambiados por aminoácidos de menor tamaño, como son la alanina o la valina, proporcionando un número limitado de mutantes de residuos simples o múltiples de PcPAL.



**Figura 2.** Esquema del bolsillo hidrofóbico de la enzima salvaje wt-PcPAL.

Para poder descartar el plegamiento inadecuado, el estado de oligomerización y el despliegue térmico de los mutantes aislados y purificados, fueron comparados con la enzima salvaje. El uso de métodos de cromatografía de exclusión por tamaño reveló que todas las variantes de PcPAL se plegaban adecuadamente y existían de forma nativa tetramérica similar a la enzima salvaje.

Posteriormente, la biblioteca PcPAL de un solo mutante generada fue probada con los diferentes sustratos a los que se quería dirigir la eliminación y la adición de amonio. Los resultados de la eliminación de amonio revelaron que las mutaciones de los residuos F137 y I460 por valina o alanina, incrementaban significativamente la actividad para casi todos los sustratos en comparación con la enzima salvaje (Tabla 1).

Grupo R	Variante PcPAL	C'
4-metoxi	wt*	3
4-metoxi	F137	37
4-metoxi	I460V	39
naftalen-2-il	wt*	6
naftalen-2-il	I460V	37
naftalen-2-il	F137V	39
estiril	wt*	<1
estiril	I460V	≈50
estiril	F137V	≈50
bifenil-4-il	wt*	<1
bifenil-4-il	I460V	8
bifenil-4-il	F137A	35
4'-fluorobifenil-4-il	wt*	<1
4'-fluorobifenil-4-il	F137V	37
4'-fluorobifenil-4-il	F137A	39

**Tabla 1.** Actividad de wt-PcPAL comparada con los mejores mutantes simples de PcPAL en la reacción de eliminación de amonio. \*wt: enzima salvaje, C': valores de conversión.

Grupo R	Variante PcPAL	C
4-metoxi	wt	<1
4-metoxi	F137V/I460V	32
naftalen-2-il	wt	<1
naftalen-2-il	F137V	55
estiril	wt	<1
estiril	F137V/I460V	22
bifenil-4-il	wt	<1
bifenil-4-il	F137A/I460V	27
4'-fluorobifenil-4-il	wt	<1
4'-fluorobifenil-4-il	F137A/I460V	8

**Tabla 2.** Actividad de wt-PcPAL comparada con los mejores mutantes de PcPAL en la reacción de adición de amonio.

En la reacción inversa de adición de amonio, los mutantes simples de PcPAL mostraron mejorías en la actividad solo con los ácidos 4-metoxifenil- y naftalen-2-il acrílicos. Mientras que, con sustratos más voluminosos la reacción no se vio favorecida.

Para potenciar esta reacción de adición de amonio en arilacrilatos se introdujeron mutaciones adicionales de residuos vecinos en los mutantes individuales. De esta manera, se obtuvo una biblioteca de mutantes dobles y triples que involucraban a I460, F137 y L138 y se probó en ambas reacciones mediadas por PAL.

Estos estudios demostraron claramente que múltiples mutaciones exhibían un fuerte efecto cooperativo no aditivo sobre la actividad de PcPAL en la reacción de adición de amoníaco. Los mutantes dobles de PcPAL que implicaban F137 e I460 lograban una actividad de adición de amonio adecuada en arilacrilatos voluminosos (**Tabla 2**).

El hecho de que las mutaciones individuales de L134, L206, L256 y L138, así como los mutantes dobles y triples de L138 con los residuos moduladores de actividad F137 e I460 no proporcionaron ningún aumento en la conversión de los sustratos probados en cualquier dirección de reacción resaltó la importancia del residuo I460, además del residuo bien estudiado F137, y sus mutaciones combinadas para la modulación de especificidad de sustrato de PcPAL, especialmente en la reacción de adición de amoníaco sintéticamente valiosa.

### **6.3 Técnicas de inmovilización enzimática**

A pesar de las ventajas presentadas por las enzimas, el uso de este tipo de catalizadores biológicos aún no ha sido generalizado en industria. Dos de sus grandes inconvenientes son su escasa estabilidad, debido a su naturaleza proteica y, por tanto, su posibilidad de desnaturalización y la pérdida parcial o totalmente su actividad, y su dificultad para separarse de los sustratos y los productos en el medio de reacción, por lo que reutilización se vería impedida. Además, otra de sus desventajas principales es su gran coste, viéndose esencial la búsqueda de técnicas de recuperación y reutilización de estas enzimas. Para lograr la superación de estas desventajas, la inmovilización de enzimas se ha postulado como una gran solución, ya que permite el aumento de la productividad del biocatalizador. (27)

Esta nueva estrategia consiste en reducir en mayor o menor medida la movilidad conformacional de los biocatalizadores, con la unión de éstos a unos soportes específicos, dando lugar a fórmulas insolubles que en la mayoría de casos ven aumentada su actividad catalítica y consiguen su reutilización.

Generalmente, se suelen diferenciar dos categorías de métodos de inmovilización: aquellos en los que se produce una retención física y aquellos en los que hay una unión química **(28)**. En los métodos de retención física no se produce formación de enlaces covalentes, mientras que sí la hay en los de unión química. La adsorción y el atrapamiento de enzimas en soportes porosos o confinamiento de enzimas en membranas semipermeables son los principales métodos de inmovilización por retención física, mientras que la unión covalente de la enzima al soporte y el entrecruzamiento son los métodos por unión química más destacados.

Desde el punto de vista industrial, la unión del biocatalizador a un soporte es el método más interesante de inmovilización de enzimas. Esta unión covalente se produce tras el ataque nucleofílico de determinados aminoácidos encontrados en la superficie de la enzima sobre grupos reactivos de un soporte previamente funcionalizado. En la selección del método de inmovilización se debe tener en cuenta las condiciones de la reacción, el tipo de reactor que se va a utilizar y el tipo de sustrato que va a ser procesado.

### ***Inmovilización covalente de PcPAL en nanotubos de carbono***

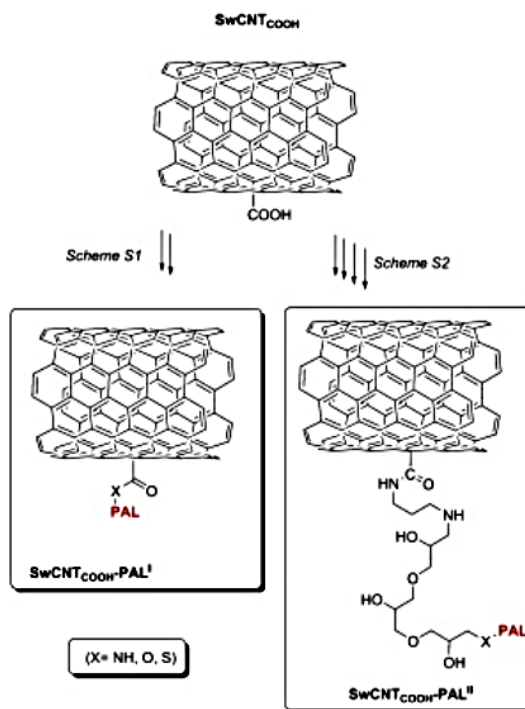
Los nanotubos de carbono (CNT) son ampliamente utilizados para la inmovilización de biomacromoléculas. Se trata de un soporte con una gran superficie disponible, debido a su diámetro nanométrico **(29)**. Además, posee una baja limitación de fusión y una fácil recuperación. Dependiendo del tipo de inmovilización de las enzimas en este tipo de soportes, covalente o no covalente, se observan unas aplicaciones u otras **(30)**.

Aunque la inmovilización no covalente conserva bien la estructura del nanomaterial y de la enzima, no se puede excluir una fuga gradual de la enzima. La inmovilización por adsorción física en los CNT puede efectuarse mediante interacciones hidrofóbicas **(31)**, interacciones electrostáticas **(32)**, o por enlace de hidrógeno **(33)** y puede ser modulada por agentes tensoactivos o por capas de polímeros adsorbidos.

La vinculación covalente directa de una enzima con los CNT da lugar a una inmovilización más estable, pero puede ocasionar una reducción de la actividad enzimática.

En un estudio realizado en 2015 **(34)**, se buscó la inmovilización covalente de PAL de *Petroselinum crispum* en nanotubos de carbono de pared simple carboxilados (SwCNTCOOH) **(Figura 3)** para la síntesis de biocatalizadores de PAL con propiedades mejoradas. Este estudio demostró por primera vez la utilidad de los SwCNT-PAL como un conveniente biocatalizador para biotransformaciones estereoselectivas tanto en modo de lote como en reactores de flujo continuo.

En un primer intento, se utilizó el clorhidrato de carbo-diimida de 1-etil-3-(3-dimetilamino propil)-(EDAC·HCl) para la activación de grupos carboxílicos en la superficie del SwCNTCOOH. Aunque el rendimiento de inmovilización fue bastante alto (el 89,5% de la PcPAL estaba ligada a SwCNTCOOH), el producto obtenido (SwCNTCOOH-PAL<sup>I</sup>) no era estable en las duras condiciones (6 M de NH<sub>3</sub>) requeridas para llevar a cabo la reacción de adición de amoníaco. De hecho, una investigación de la TEM observó que tras dos ciclos de reacción se producía la separación casi completa de PAL de la superficie del soporte.

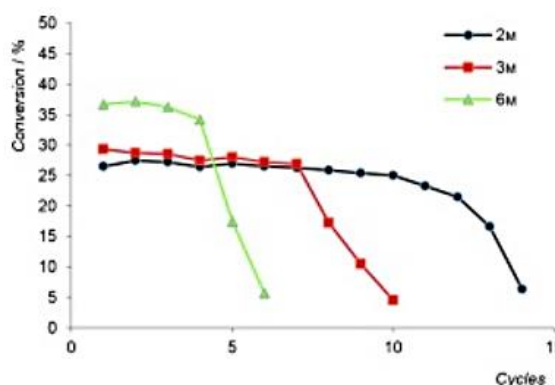


**Figura 3.** Inmovilización covalente de PcPAL en SwCNTCOOH.

Posteriormente, con el fin de crear un SwCNT-PAL más estable inmovilizado covalentemente con enlaces amídicos de los ácidos carboxílicos, se utilizó el glicerol diglicidil éter (GDE) para unir el PcPAL a la superficie del SwCNTCOOH funcionalizado con propano-1,3-diamino. Se consiguieron rendimientos elevados (95,5±1,5% de la PcPAL unida a SwCNTCOOH), una alta actividad catalítica (61±1,3%, determinada por I-Phe a 30 °C, durante 10 min en tampón Tris a pH 8,842), y enlaces covalentes estables (SwCNTCOOH-PAL<sup>II</sup>). Por tanto, se pudo concluir que ese tipo de soporte era estable y podía ser utilizado como una alternativa eficaz para la síntesis rentable de productos de PcPAL.

### SwCNT-PAL en lotes

A continuación, los SwCNT-PAL fueron probados como biocatalizadores a modo de lote a temperatura ambiente. Los SwCNTCOOH-PAL en las reacciones de eliminación de amonio mostraron altas conversiones (cerca de la conversión del 50% teóricamente posible) y pudieron ser reutilizados varias veces sin pérdida significativa de su actividad inicial. Sin embargo, bajo las condiciones duras que requería la reacción de adición de amonio (6M pH 10), los SwCNT-PAL fueron mucho menos reutilizados, es decir, tras pocos ciclos de reacción se producía la separación casi completa de PAL de la superficie del soporte.



**Figura 4.** Reciclabilidad de SwCNTCOOH-PAL<sup>II</sup> en la adición de amoníaco en lotes a diversas concentraciones de amoníaco (2, 3 y 6 M; pH 10,0; 25 °C; 17 h).

Tras la demostración en varios estudios de la posibilidad de realizar reacciones de adición de amoníaco a concentraciones más bajas de  $\text{NH}_3$  (35,36); decidieron reducir las concentraciones a 3 y 2 M. El SwCNTCOOH-PAL<sup>II</sup> mostró una estabilidad significativamente mayor a concentraciones de amoníaco más bajas. En concentraciones de 2 M de amoníaco se retuvo más del 80 % de la actividad inicial incluso después de 12 ciclos (Figura 4).

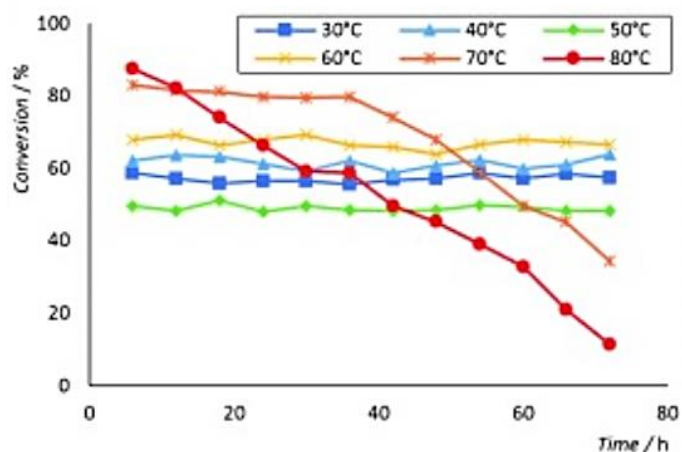
### SwCNT-PAL en flujo continuo

La adición de amoníaco en flujo continuo se estudió en un sistema microreactor (SynBioCart) que incluía una columna de politetrafluoroetileno (PTFE) de lecho empacado biocompatible relleno de SwCNTCOOH-PAL<sup>II</sup>. La unidad del biorreactor se colocó en el compartimiento de la columna termostática de un sistema de HPLC con control total de presión y temperatura. El primer objetivo fue comparar la tasa de reacción específica de la adición de amoníaco con el biocatalizador SwCNTCOOH-PAL<sup>II</sup> a 30 °C en los modos de flujo continuo y por lotes. Los estudios iniciales sobre la adición de amoníaco en el modo de flujo continuo sin contrapresión indicaron una rápida desactivación aparente de la enzima (probablemente debido a la formación de burbujas), que podría ser restaurada lavando el reactor con agua destilada. Esto se consiguió evitar utilizando la contrapresión en experimentos posteriores. Se utilizó una presión de 15 bar y no se observó ninguna desactivación aparente de la PAL.

Tras hallar la contrapresión necesitada para evitar la desactivación de la enzima en el modo de flujo continuo, pudieron comparar las tasas de reacción en ambos modos. Se concluyó que la tasa de reacción específica con el SwCNTCOOH-PAL<sup>II</sup> en el reactor de flujo continuo ( $r_{\text{flujo}} = 2,39 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) fue significativamente mayor que la de la reacción por lotes ( $r_{\text{lotes}} = 1,34 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ).

Como las conversiones dependen principalmente de la actividad del biocatalizador, se espera un valor máximo de las conversiones en la llamada "temperatura óptima". Por lo tanto, el siguiente paso fue buscar la temperatura óptima (Figura 5).

Se observó que la actividad de la PAL inmovilizada aumentaba si se incrementaba la temperatura del sistema de flujo continuo de 30 a 40 °C. Inesperadamente, la conversión fue significativamente más baja a 50 °C que a 40 o 30 °C. Esta aparente disminución de la actividad de la PAL a 50 °C no pudo atribuirse a la inactivación térmica irreversible porque el nivel de actividad a 50 °C permaneció estable durante 72 h. A 60 °C la conversión también permaneció estable durante 72 h y fue mayor que la observada en 30, 40 y 50 °C. Sin embargo, a 70 y 80 °C, aunque la actividad inicial del biocatalizador aumentó con la temperatura, la enzima se desactivó rápida e irreversiblemente con el tiempo.



**Figura 5.** Efecto de la temperatura entre 30-80 °C sobre la estabilidad a largo plazo de la adición de amoníaco catalizada por el SwCNTCOOH-PAL<sup>II</sup> en un microreactor de flujo continuo (2 M, pH 10, bajo una contrapresión de 15 bar).



Por tanto, se pudo concluir lo siguiente:

- Los estudios de reciclaje revelaron que el SwCNTCOOH-PAL<sup>II</sup> retuvo más del 80 % de su actividad original después de 7 ciclos en el proceso de eliminación de amoníaco y 12 ciclos en el de adición de amoníaco (2 M).
- El reactor de flujo continuo consiguió una tasa de reacción específica significativamente mayor a 30°C que en la reacción por lotes.
- Los estudios con un microreactor de flujo continuo de lecho compacto saturado con SwCNTCOOH-PAL<sup>II</sup> en el rango de temperaturas de 30-80 °C mostraron una aparente disminución de la actividad de la PAL a 50 °C, que podría explicarse mediante un cambio conformacional de PAL. La actividad de PAL inalterada para la adición de amoníaco (2 M) podría mantenerse durante al menos 72 a 60 °C en un microreactor de lecho compacto de flujo continuo.

La principal ventaja de este nuevo tipo de inmovilización no es la mejora de la termoestabilidad de la enzima nativa, sino la fácil recuperación del biocatalizador a partir de las reacciones en lote y la utilidad para biotransformaciones en el modo de flujo continuo.

#### **6.4 Aplicaciones de PAL en la Industria Farmacéutica**

Las enzimas mejoradas conseguidas mediante ingeniería genética e inmovilizadas en soportes se están comenzando a utilizar en la síntesis de nuevos fármacos. Algunos de los productos de estos biocatalizadores ya puestos en uso son: *L-m*-(trifluorometil)fenilalanina (**37**), *D-m*-(trifluorometil)fenilalanina (**38**), *D-p*-metilfenilalanina (**39**), *L-p*-metoxifenilalanina (**40**), *L-m*-metoxifenilalanina (**41**) y 3-(1-naftil)alanina (**42**). A continuación, expondré algunas de sus aplicaciones clínicas, así como el uso de la propia enzima PAL en la enfermedad fenilcetonúrica.

##### *L-m*-(trifluorometil)fenilalanina

Este aminoácido no canónico sintetizado por *PcPAL* se está utilizando como inhibidor de la proteína KIFC1, miembro de la familia de la kinesina-14. Las funciones principales de ésta kinesina son: facilitar el entrecruzamiento y el deslizamiento de los microtúbulos, enfocar los polos del huso mitótico y transportar vesículas. El KIFC1 también juega un papel vital en la agrupación de centrosomas en las células cancerosas. La amplificación del centrosoma es un sello distintivo de los cánceres y contribuye a la inestabilidad genómica. El KIFC1 puede rescatar células cancerosas mediante la agrupación de centrosomas para limitar los efectos negativos de la mitosis multipolar, lo que favorece su supervivencia. Se ha testificado que la expresión del KIFC1 está aumentada en varios cánceres humanos, como el cáncer de ovario, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama y el carcinoma hepatocelular.

Por el contrario, esta proteína no es esencial para el ensamblaje del huso bipolar en las células somáticas normales, por tanto, su inhibición no causaría un gran daño celular a las células somáticas.

### *D-m-(trifluorometil)fenilalanina*

Este sintón se ha postulado como precursor del inhibidor más potente hasta la fecha de SETD7. El SETD7 es una histona H3K4 de la lisina metiltransferasa que participa en la regulación de los genes humanos. La sobreexpresión de SETD7 se ha relacionado con la aparición de enfermedades como el cáncer. Por lo tanto, el SETD7 se considera un buen objetivo para el desarrollo de nuevos medicamentos epigenéticos.

### *D-p-metilfenilalanina*

La *D-p*-metilfenilalanina ha demostrado tener una acción inhibitoria sobre la enzima Pin1. Esta enzima se une a un subconjunto de proteínas desempeñando una función de control posterior a la fosforilación en la regulación de la función de las proteínas. Un aumento en las concentraciones de Pin1 está asociado a la aparición de ciertos cánceres, mientras que una disminución de esta enzima está implicada en la enfermedad de Alzheimer.

### *L-p-metoxifenilalanina*

La *L-p*-metoxifenilalanina se está comenzando a utilizar como un producto intermedio clave en la síntesis de tamsulosina. Este fármaco tiene como mecanismo de acción la inhibición selectiva del receptor  $\alpha_1$  con mayor selectividad para el receptor  $\alpha_{1a}$ , el cual se encuentra principalmente a nivel de la próstata. La tamsulosina y, por tanto, la *L-p*-metoxifenilalanina se utilizan para tratar la hiperplasia benigna de próstata.

### *L-m-metoxifenilalanina*

Este aminoácido está siendo probado como intermediario de inhibidores de proteasa de VIH. Estos inhibidores tienen la función de bloquear la proteasa del VIH. Al bloquearla, los inhibidores evitan que el nuevo VIH (inmaduro) se transforme en un virus maduro capaz de infectar a otros linfocitos CD4.

### *3-(1-naftil)alanina*

El tetrapéptido derivado de la dermorfina [Dmt<sup>1</sup>]DALDA (H-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>), es un agonista opiáceo muy potente de  $\mu$ . La extraordinaria potencia de [Dmt<sup>1</sup>]DALDA como analgésico espinal se debe a su triple acción como agonista opiáceo  $\mu$ , como inhibidor de la recaptación de norepinefrina y como liberador de péptidos opiáceos endógenos.

En un esfuerzo por obtener análogos de [Dmt<sup>1</sup>]DALDA con una potencia agonista de opioides se ha utilizado el aminoácido 3-(1-naftil)alanina como sustituto del residuo de Phe de [Dmt<sup>1</sup>]DALDA, viéndose mejorada la afinidad de unión al receptor  $\mu$  y también los receptores  $\kappa$ .

## Fenilcetonuria

La fenilcetonuria (PKU) es una enfermedad metabólica genética en la que la disminución o pérdida de la actividad de la fenilalanina-hidroxilasa (PAH) da lugar a niveles elevados y neurotóxicos de fenilalanina. Debido a muchos obstáculos, la terapia de reemplazo de enzimas PAH no es actualmente una opción.

El tratamiento de la fenilcetonuria con fenilalanina amonio-liasas, se propuso por primera vez en el decenio de 1970. Sin embargo, era necesario superar ciertos problemas relativos a la inmunogenicidad, la producción de enzimas y el modo de administración.

En un estudio realizado en 2017 (43), se evaluaron tres posibles enzimas PAL para examinar su potencial terapéutico. Además se comprobó que la adición de polietilenglicol (PEG, MW = 20.000), atenuó la inmunogenicidad en un modelo animal de PKU. Las tres enzimas candidatas mostraron eficacia en un modelo de ratón de PKU (BTBR Pahenu2) al ser inyectados por vía subcutánea. Sin embargo, sólo los ratones tratados con la PAL pegilada *Anabaena variabilis* (Av) PAL demostraron niveles bajos sostenidos de Phe con la inyección semanal y fue la única PAL evaluada que mantuvo una actividad enzimática completa tras la pegilación.

Además se mejoró la enzima con dos mutaciones en los residuos de Cys503 y Cys565 (Cys503Ser/Cys565Ser), rAvPAL-PEG, basándose en su perfil farmacodinámico positivo. Se demostró que la pegilación era crítica para la eficacia de rAvPAL-PEG, ya que bajo pegilación, la enzima mutante tenía un efecto farmacodinámico mayor. La L-Phe y el *trans*-cinamato se identificaron como excipientes estabilizadores de la actividad.

Actualmente el mutante rAvPAL-PEG se encuentra en la fase 3 de los ensayos clínicos, donde se está evaluando la eficacia en pacientes con fenilcetonuria.

## 7. CONCLUSIONES

Con la información recopilada podemos concluir que la fenilalanina amonio-liasas presenta un gran interés debido a sus múltiples ventajas y está comenzando a ser utilizada en síntesis de aminoácidos no canónicos útiles en clínica. Además, el avance en métodos de ingeniería enzimática e inmovilización de enzimas ha hecho posible que haya una mayor rentabilidad en el uso de enzimas en industria. Hemos observado en varios estudios (26, 34) que estos métodos innovadores aumentan la eficacia, mejoran la actividad catalítica y facilitan la recuperación del biocatalizador.

Es una síntesis que se realiza en condiciones moderadas de reacción, no requiere la utilización de enzimas adicionales, no necesita reciclar el cofactor y presenta un rendimiento teórico del 100%. Por tanto, observando las ventajas presentadas por estas enzimas, resulta muy interesante la búsqueda de nuevas estrategias de síntesis de diferentes sintones con utilidad clínica, siendo productos intermedios o finales, como alternativa ecológica a la síntesis química.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- 1) M. E. Rodríguez Alegría y E. Castillo Rosales. Enzimas aplicadas en procesos industriales. Revista Digital Universitaria [Internet]. 1 de noviembre de 2014, Vol. 15, No.11 [Consultada 1 de abril 2020]. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art96/index.html>
- 2) S. L. Lovelock, R. C. Lloyd y N. J. Turner. Phenylalanine Ammonia Lyase Catalyzed Synthesis of Amino Acids by an MIO-Cofactor Independent Pathway. Angew. Chem. Int. Ed. 2014; 53: 4652-4656.

- 3) F. Parmeggiani, S. L. Lovelock, N. J. Weise, S. T. Ahmed y N. J. Turner. Synthesis of D- and L- Phenylalanine Derivates by Phenylalanine Ammonia Lyases: A Multienzymatic Cascade Process. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015; 54: 1-5.
- 4) S.Y. Jun , S. A. Sattler, G. S. Cortez, W. Vermerris, S. E. Sattler y C. Kang. Biochemical and Structural Analysis of Substrate Specificity of a Phenylalanine Ammonia-Lyase. *Plant Physiol.* 2018; 176 (2): 1452-1468.
- 5) K. R. Hanson y E. A. Havir. L-phenylalanine Ammonia-Lyase. IV. Evidence That the Prosthetic Group Contains a Dehydroalanyl Residue and Mechanism of Action *Arch. Biochem. Biophys.* 1970; 141 (1): 1-17.
- 6) T. A. Smith, F. H. Cordelle y R. H. Abeles. Studies on the Mechanism of Action and the Structure of the Electrophilic Center of Histidine Ammonia Lyase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1967; 120: 724 – 725.
- 7) J. D. Hermes, P. M. Weiss y W. W. Cleland. Use of nitrogen-15 and Deuterium Isotope Effects to Determine the Chemical Mechanism of Phenylalanine Ammonia-Lyase *Biochemistry.* 1985; 24 (12): 2959-2967.
- 8) M. Langer, G. Reck, J. Reed y J. Rétey. Identification of Serine-143 as the Most Likely Precursor of Dehydroalanine in the Active Site of Histidine Ammonia-lyase. A study of the Overexpressed Enzyme by Site-Directed Mutagenesis *Biochemistry.* 1994; 33 (21): 6462 – 6467.
- 9) B. Schuster y J. Rétey. Serine-202 Is the Putative Precursor of the Active Site Dehydroalanine of Phenylalanine Ammonia Lyase. Site-directed Mutagenesis Studies on the Enzyme From Parsley (*Petroselinum Crispum* L.). *FEBS Lett.* 1994; 349 (2): 252 – 254.
- 10) B. Schuster y J. Rétey. The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: the role of prosthetic dehydroalanine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(18): 8433–8437.
- 11) M. Langer, A. Pauling y J. Rétey. The Role of Dehydroalanine in Catalysis by Histidine Ammonia Lyase. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. Angew. Chem. Int. Ed.* 1995; 34: 1464 – 1465.
- 12) C. B. Klee, K. L. Kirk y L. A. Cohen. 4-Nitro-L-histidine as a Substrate for Histidine Ammonia-Lyase: The Role of Beta-Hydrogen Acidity in the Rate-Limiting Step. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1979; 87 (1): 343-348.
- 13) J. Klepp, A. Fallert-Müller, K. Grimm, W. E. Hull y J. Rétey. Mechanism of action of urocanase. *Eur. J. Biochem.* 1990, 192, 669-676.
- 14) K. R. Hanson, E. A. Havir y C. Ressler. Phenylalanine Ammonia-Lyase: Enzymic conversion of 3-(1,4-cyclohexadienyl)-L-alanine to trans-3-(1,4-cyclohexadienyl) acrylic acid. *Biochemistry.* 1979; 18 (8): 1431-1438.
- 15) J. D. Hermes, P. M. Weiss y W.W. Cleland. Use of nitrogen-15 and Deuterium Isotope Effects to Determine the Chemical Mechanism of Phenylalanine Ammonia-Lyase *Biochemistry.* 1985; 24 (12): 2959-2967.
- 16) T. F. Schwede, J. Rétey y G. E. Schulz. Crystal Structure of Histidine Ammonia-Lyase Revealing a Novel Polypeptide Modification as the Catalytic Electrophile. *Biochemistry.* 1999; 38 (17): 5355 – 5361.
- 17) J. Rétey. Discovery and Role of Methylidene Imidazolone, a Highly Electrophilic Prosthetic Group *Biochim. Biophys. Acta.* 2003; 1647(1-2): 179 – 184.
- 18) C. B. Klee. Reversible Polymerization of Histidine Ammonia Lyase. The Role of Sulfhydryl Groups in the Activity and Polymeric State of the Enzyme. *J. Biol. Chem.* 1970; 245 (12): 3143 – 3152.
- 19) C. B. Klee. Stereospecific Irreversible Inhibition of Histidine Ammonia-Lyase by L-cysteine *Biochemistry.* 1974; 13 (22): 4501 – 4507.
- 20) D. Röther, D. Merkel y J. Rétey. Spectroscopic Evidence for a 4-Methylidene Imidazol-5-one in Histidine and Phenylalanine Ammonia-Lyases We Thank Prof. G. E. Schulz and Dipl.-Chem. M. Baedeker (University of Freiburg) for Providing Us With the New PAL Expression System and Dr. M. Stieger (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) for Vector pREP4-GroESL Carrying the HSP-60 System. D.R. And D.M. Thank the Land of Baden-Württemberg for a Scholarship for Graduate Students. The Work Was Supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft and the Fonds Der Chemischen Industrie. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2000; 39(14):2462-2464.
- 21) S. Yamada, K. Nabe, N. Izuo, K. Nakamichi e I. Chibata. Production of L-Phenylalanine From trans-Cinnamic Acid With *Rhodotorula Glutinis* Containing L-Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981; 42(5): 773-8.
- 22) A. Gloge, J. Zoń, A. Kövári, L. Poppe y J. Rétey. Phenylalanine Ammonia-Lyase: The Use of Its Broad Substrate Specificity for Mechanistic Investigations and Biocatalysis--Synthesis of L-aryllanines. *Chem. Eur. J.* 2000; 6 (18): 3386 – 3390.

- 23) V. Gotor y M. J. Hernáiz. Biocatálisis aplicada. Las enzimas como herramientas útiles en síntesis orgánica. *An. Quím.* 2017; 113 (1): 27-35.
- 24) T. Davids, M. Schmidt, D. Böttcher y U. T. Bornscheuer. Strategies for the Discovery and Engineering of Enzymes for Biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2013; 17(2): 215-20.
- 25) J. L. Porter, R. A. Rusli y D. L. Ollis. *Chem. Bio. Chem.* 2016; 17(3): 197-203.
- 26) A. Filip, E. Z. A. Nagy, S. D. Tork, G. Bánóczy, M. I. Toşa, F. D. Irimie, L. Poppe, C. Paizs y L. C. Bencze. Tailored Mutants of Phenylalanine Ammonia-Lyase from *Petroselinum crispum* for the Synthesis of Bulky l- and d-Arylalanines. *ChemCatChem.* 2018; 10(12): 2627–2633.
- 27) U. Hanefeld, L. Gardossi y E. Magner. Understanding Enzyme Immobilisation. *Chem. Soc. Rev.* 2009; 38: 453–468.
- 28) M. Arroyo. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars. Pharmaceutica.* 1998; 39 (2) : 23-39.
- 29) I. V. Pavlidis, T. Vorhaben, T. Tsoufis, P. Rudolf, U. T. Bornscheuer, D. Gournis y H. Stamatis. Development of Effective Nanobiocatalytic Systems Through the Immobilization of Hydrolases on Functionalized Carbon-Based Nanomaterials. *Bioresour. Technol.* 2012; 115: 164–171.
- 30) Y. Gao y I. Kyratzis. Covalent Immobilization of Proteins on Carbon Nanotubes Using the Cross-Linker 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide-Critical Assessment. *Bioconjugate Chem.* 2008; 19: 1945–1950.
- 31) F. Balavoine, P. Schultz, C. Richard, V. Mallouh, T. W. Ebbesen y C. Mioskowski. Helical crystallization of proteins on carbon nanotubes: a first step towards the development of new biosensors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999; 38: 1912–1915.
- 32) J. M. Gómez, M. D. Romero y T. M. Fernandez. Immobilization of  $\beta$ -Glucosidase on carbon nanotubes *Catal. Lett.* 2005; 101: 275–278.
- 33) C. M. Yu, M. J. Yen y L. C. Chen. A Bioanode Based on MWCNT/protein-assisted Co-Immobilization of Glucose Oxidase and 2,5-dihydroxybenzaldehyde for Glucose Fuel Cells. *Biosens. Bioelectron.* 2010, 25, 2515–2521.
- 34) J. H. Bartha-Vári, M. I. Toşa, F. D. Irimie, D. Weiser, Z. Boros, B. G. Vértessy, C. Paizs y L. Poppe. Immobilization of Phenylalanine Ammonia-Lyase on Single-Walled Carbon Nanotubes for Stereoselective Biotransformations in Batch and Continuous-Flow Modes. *ChemCatChem.* 2015; 7(7): 1122–1128.
- 35) O. O. Babich, V. S. Pokrovsky, N. Y. Anisimova, N. N. Sokolov y A. Y. Prosekov. Recombinant L-Phenylalanine Ammonia Lyase From *Rhodospiridium Toruloides* as a Potential Anticancer Agent. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2013; 60: 316–322.
- 36) B. K. Hamilton, H. Y. Hsiao, W. E. Swann, D. M. Anderson y J. J. Delent. Manufacture of L-amino acids with bioreactors. *Trends Biotechnol.* 1985; 3: 64–68.
- 37) B. Yang et al. Discovery of potent KIFC1 inhibitors using a method of integrated high-throughput synthesis and screening. *J. Med. Chem.* 2014; 57: 9958-9970.
- 38) D. C. Lenstra et al. Structure-activity relationship studies on (R)-PFI-2 analogs as inhibitors of histone lysine methyltransferase SETD7. *ChemMedChem.* 2018; 13: 1405–1413.
- 39) L. Dong et al. Structure-based design of novel human Pin1 inhibitors (II). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010; 20: 2210–2214.
- 40) V. R. Arava et al. Asymmetric synthesis of unnatural amino acids and Tamsulosin chiral intermediate. *Synth. Commun.* 2013; 43: 2892–2897.
- 41) T. Mimoto et al. Structure–activity and structure–metabolism relationships of HIV protease inhibitors containing the 3-hydroxy-2-methylbenzoylallophenylnorstatine structure. *Bioorg. Med. Chem.* 2004; 12: 281–293.
- 42) L. Bai, Z. Li, J. Chen, N. N. Chung, B. C. Wilkes, T. Li y P. W. Schillerb. [Dmt1]DALDA analogues with enhanced  $\mu$  opioid agonist potency and with a mixed  $\mu/\kappa$  opioid activity profile. *Bioorg Med Chem.* 2014 Apr 1; 22(7): 2333–2338.
- 43) S. M. Bell et al. Formulation and PEGylation optimization of the therapeutic PEGylated phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria. *PLoS One.* 2017; 12(3): e0173269.