

Borsa di studio attivata ai sensi di quanto disposto dal D.M. n. 1061 del 10/08/2021

Titolo del progetto: Progettazione computazionale e caratterizzazione biochimica di varianti della glutammato decarbossilasi, un enzima PLP-dipendente, migliorate per la sintesi (verde) di molecole ad uso chimico-farmaceutico e per funzionalizzare gli alimenti.

La borsa sarà attivata sul seguente corso di dottorato accreditato per il XXXVII ciclo:

SCIENZE DELLA VITA

Responsabile scientifico: Prof. Daniela De Biase

Area per la quale si presenta la richiesta: GREEN

Numero di mensilità da svolgere in azienda: 12

Numero di mensilità da svolgere all'estero: 12 presso Zymvol Biomodeling (<https://zymvol.com/>) Barcelona, Spain (azienda si trova all'estero)

Azienda: Zymvol Biomodeling (<https://zymvol.com/>) Barcelona, Spain

Il Dipartimento è disponibile a cofinanziare per un importo pari a euro: 10000 euro

Dipartimento finanziatore: DIPARTIMENTO DI SCIENZE E BIOTECNOLOGIE MEDICO-CHIRURGICHE con delibera del 21 settembre 2021

Progetto di ricerca:

Responsabile Scientifico in Sapienza: La Prof.ssa Daniela De Biase studia da molti anni l'enzima glutammato decarbossilasi di *Escherichia coli*. L'enzima catalizza l'alfa-decarbossilazione dell'acido glutammico (un amminoacido non essenziale) per produrre GABA (acido gamma-amminobutirrico).

La ricerca della Prof.ssa De Biase su questo enzima, e il suo coinvolgimento nella risposta protettiva allo stress acido nei batteri, è riconosciuta a livello internazionale e attualmente la prof.ssa ricopre la carica di vicepresidente dell'Azione COST CA18113 (2019-2023) "Understanding and exploiting the impacts low pH on micro-organisms" [1]. Inoltre, il Prof. De Biase ha organizzato nel 2019 un Corso Avanzato dal titolo "Trends in Enzymology and Biocatalysis" con il contributo di un eccellente panel di docenti dal mondo accademico e delle aziende [2], tra cui Zymvol Biomodeling, l'azienda che partecipa a questo progetto, Nestlè, Merck, Astra Zeneca, Johnson Matthey e ActivX.

In collaborazione con colleghi dell'Università di Wageningen (Paesi Bassi), la Prof.ssa De Biase ha dimostrato che la glutammato decarbossilasi di *E. coli* può essere utilizzata come strumento di "chimica verde" [3] poiché la produzione di GABA può essere aumentata e l'enzima può essere efficacemente immobilizzato. Il GABA è una molecola importante in campo farmaceutico, ma utilizzata anche come integratore e per funzionalizzare gli alimenti (nutraceutico). Inoltre, dalla ciclizzazione del GABA deriva il 2-pirrolidone, precursore di importanti molecole come l'*N*-metil-pirrolidone (un ottimo solvente) e l'*N*-vinil-pirrolidone (precursore del PVP, polivinilpirrolidone). Utilizzando forme varianti dell'enzima ricombinante, il gruppo De Biase è anche riuscito ad ampliare l'intervallo di pH della reazione enzimatica, fortemente dipendente dal pH acido, a valori più vicini alla neutralità, dove la solubilità del substrato è maggiore [4]. Queste varianti, tuttavia, tendono a perdere il cofattore più facilmente rispetto all'enzima selvatico. Nel 2020, il laboratorio De Biase ha pubblicato uno studio sulla rivista *Communications Chemistry* che dimostra che l'enzima può eseguire la reazione di decarbossilazione su una miscela racemica dell'analogo gamma-fosfinico dell'acido glutammico (una sostanza il cui isomero L ha attività antibiotica), dimostrando così che la porzione fosfinica è un bioisostero del gruppo carbossilico negli enzimi PLP-dipendenti e anche NAD(P)⁺-dipendenti [5]. Questo studio si sta ora estendendo agli analoghi dell'acido glutammico con un gruppo solfinico o solfonico al posto

del gruppo carbossilico in posizione gamma. Pertanto, la gamma di molecole che possono essere generate a seguito della reazione di decarbossilazione può essere ampliata per generare con un approccio "bio-based" molecole di cui alcune non sono disponibili in commercio. Nel caso di entrambi i composti fosfinici [5] e solfonici/solfonici (manoscritto in preparazione), un limite è rappresentato dal fatto che la K_m per questi substrati è 40 volte superiore a quello del substrato fisiologico (acido glutammico), incidendo quindi negativamente sull'efficienza catalitica.

E' di particolare interesse che GadB è uno dei pochi enzimi PLP-dipendenti che ha una comprovata attività "paracatalitica", cioè svolge un'insolita reazione ossidativa collaterale che coinvolge l'ossigeno molecolare (O_2), nota come deamminazione ossidativa. Sebbene le prime osservazioni siano state riportate in letteratura 30 anni fa, solo negli ultimi anni questa reazione tra enzimi PLP-dipendenti (amminoacido decarbossilasi, amminoacido aldeide sintasi, sintesi di antibiotici lincosamidi, ecc.) ha ricevuto notevole interesse. Tuttavia, un recente articolo di revisione su questo argomento evidenzia che è lungi dall'essere chiaro come razionalizzare la reazione [6,7].

Azienda collaborante: Questo progetto si avvale della collaborazione con Zymvol Biomodeling (<https://zymvol.com/>), un'azienda biotecnologica nel settore della chimica verde, specializzata nella scoperta e nell'ingegnerizzazione di biocatalizzatori (enzimi) con un approccio computazionale avanzato. A questo scopo, il team di ricerca e sviluppo di ZYMVOL (formato da 9 ricercatori) progetta, sviluppa e applica software di modellazione molecolare. Di particolare interesse per questo progetto, ZYMVOL ha sviluppato un software proprietario (ZYMEVOLVER) per l'ingegneria enzimatica, che è stato applicato con successo per migliorare l'attività, la specificità, la selettività o la termostabilità dei biocatalizzatori. La visione dell'azienda è quella di catalizzare la sostituzione di processi chimici non sostenibili, che spesso utilizzano catalizzatori metallici costosi e contaminanti, con biocatalizzatori (enzimi) puliti e sostenibili. ZYMVOL ha clienti in 11 paesi diversi e da settori che includono quelli Farmaceutico, Chimico, Biotecnologico e Aromi&Fragranze. L'azienda partecipa anche a progetti finanziati con fondi pubblici (vedi sito web per un elenco dettagliato) ed è anche fortemente coinvolta nella formazione di giovani scienziati, ospitando studenti di master e dottorandi (es. progetto BioInspireSensing H2020-MSCA-ITN-2020). L'azienda dispone degli spazi, dei computer e delle risorse umane necessarie per ospitare lo studente candidato a svolgere il lavoro di modellizzazione previsto in questo progetto.

Breve descrizione del progetto di dottorato e collaborazione Università-Azienda: Zymvol aiuterà e formerà il dottorando nell'identificazione di forme varianti di glutammato decarbossilasi che possano esibire 1) migliorata capacità di legame di composti contenenti gruppi fosfinici / solfonici / solfonici legati al carbonio gamma, 2) capacità invariata di legare il PLP rispetto all'enzima selvatico e 3) una migliorata attività paracatalitica (cioè favorendo la reazione con O_2). Queste varianti, progettate in silico presso Zymvol, saranno prodotte in forma ricombinante e le loro proprietà biochimiche e l'attività enzimatica saranno studiate a fondo nel laboratorio della Prof.ssa De Biase. È importante ricordare qui che le strutture cristallografiche di varie forme di E. coli glutammato decarbossilasi e alcune sue varianti sono disponibili in PDB (Protein Data Bank) come risultato di uno sforzo congiunto passato tra il gruppo della Prof.ssa De Biase e biologi strutturali in Svizzera [8,9]

Il periodo di attività presso Zymvol sarà di 12 mesi e al momento si ritiene utile che venga svolto in un unico periodo, cioè dopo i primi 8-9 mesi in Sapienza. Questo aiuterà il dottorando a creare solide competenze che gli permetteranno di lavorare da remoto, una volta rientrato nel Dipartimento della Sapienza.

Impatto a lungo termine del progetto: data la grande conservazione negli enzimi dipendenti dal PLP di residui amminoacidici chiave, coinvolti nel processo catalitico e nel legame di specifici gruppi funzionali, si ritiene che questo progetto abbia enormi implicazioni sulla chimica verde che utilizza decarbossilasi PLP-dipendenti che partecipano alla sintesi di molecole di notevole interesse per l'industria chimica e dei polimeri, e per quella farmaceutica. Pertanto, l'impatto a livello di "chimica verde" è estremamente elevato e un miglioramento della reattività dell'ossigeno molecolare negli enzimi PLP-dipendenti, proposto in questo progetto, getterà le basi per ottimizzare l'evoluzione artificiale anche in altri enzimi PLP-dipendenti, verso nuovi biocatalizzatori in grado di svolgere reazioni altrimenti impegnative.

Bibliografia:

- [1] <https://www.cost.eu/actions/CA18113/>; <https://euromicroph.eu/about/>
- [2] <https://teb2019.azuleon.org/speakers.php>
- [3] Green Chemistry (2009), IF: 10.026; <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2009/gc/b913741f>*
- [4] J Biol Chem (2009), IF 5.15; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2797229/>*
- [5] Communications Chemistry (2020); IF 5.80; <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00368-z>*
- [6] FEBS Journal (2020); doi:10.1111/febs.15277
- [7] Natural Product Reports (2018); <https://doi.org/10.1039/C8NP00049B>
- [8] EMBO J (2003); IF 11.6; <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg403>*
- [9] EMBO J (2009); IF 11.6; <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601107>*

*pubblicazioni del gruppo De Biase rilevanti per il progetto

Titolo del progetto (inglese): Computer-aided design and biochemical characterization of variants of glutamic acid decarboxylase, a PLP-dependent enzyme, improved for the synthesis (green) of molecules with chemical-pharmaceutical use and to functionalize food.

Progetto di ricerca (inglese):

Scientific Responsible in Sapienza: Prof. Daniela De Biase has been studying the enzyme glutamate decarboxylase of *Escherichia coli* since many years. The enzyme catalyses the alfa-decarboxylation of glutamic acid (a non-essential amino acid) to yield GABA (gamma-aminobutyric acid).

Prof. De Biase research on this enzyme, and its involvement in the protective response to strong acid stress in bacteria, is internationally recognized and she currently holds the vice-chair position of the COST Action CA18113 (2019-2023) "Understanding and exploiting the impacts low pH on micro-organisms" [1]. Moreover, Prof. De Biase organized in 2019 an Advanced Course entitled "Trends in Enzymology and Biocatalysis" with the contribution of an excellent panel of teachers from academia and companies [2], including Zymvol Biomodeling, the company participating in this project, Nestlè, Merck, Astra Zeneca, Johnson Matthey and ActivX.

In collaboration with colleagues at Wageningen University (The Netherlands) Prof. De Biase demonstrated that *E. coli* glutamate decarboxylase can be used as a "green chemistry" [3] tool since the production of GABA can be scaled up and the enzyme can be effectively immobilised. GABA is an important molecule in the pharmaceutical field, but also used as supplement and to functionalize foods (nutraceutical). In addition, 2-pyrrolidone, the precursor of important molecules such as N-methyl-pyrrolidone (an excellent solvent) and N-vinyl-pyrrolidone (precursor of PVP), derives from the cyclization of GABA. Using variant forms of the recombinant enzyme, De Biase group has also succeeded in expanding the pH range of the enzymatic reaction, strongly dependent on acidic pH, to values closer to neutrality, where the solubility of the substrate is higher [4]. These variants, however, tend to lose the cofactor more easily than the wild type enzyme.

In 2020, De Biase lab published a study in Communications Chemistry demonstrating that the enzyme can perform the decarboxylation reaction on a racemic mixture of the gamma-phosphinic analogue of glutamic acid (a substance whose L isomer has an antibiotic activity), thus demonstrating that the phosphinyl moiety is a bioisostere of the carboxyl group in PLP-dependent and also NAD(P)⁺-dependent enzymes [5]. This study is now extending to glutamic acid analogues with a sulfinic or sulfonic group in place of the carboxyl group in the α -position. Therefore, the range of molecules that can be generated as a result of the decarboxylation reaction can be expanded to generate in a bio-based molecules of which some are not commercially available. In the case of both, phosphinic [5] and sulfinic/sulfonic compounds (manuscript in preparation), a limit is represented by the fact that the K_m for these substrates is 40 times higher than that of the physiological substrate (glutamic acid), thus negatively impacting on the catalytic efficiency.

Notably, GadB is one of the few PLP-dependent enzymes that has a proven "paracatalytic" activity, that is, it performs

an unusual collateral oxidative reaction involving molecular oxygen (O₂), known as oxidative deamination. Although the first observations were reported in the literature 30 years ago, only in recent years this reaction amongst PLP-dependent enzymes (amino acid decarboxylase, amino acid aldehyde synthase, synthesis of antibiotics lincosamides, etc.) has received considerable interest. However a recent review article on this topic highlights that it is far from being clear how to rationalize the reaction [6,7].

Collaborating Company: This project benefits from the collaboration with Zymvol Biomodeling (<https://zymvol.com/>), a biotech company in the Green Chemistry sector, specialized in computer-driven biocatalyst discovery and engineering. To this aim, ZYMVOL R&D team (formed by 9 researchers) designs, develops and applies molecular modeling software. Of particular interest to this project, ZYMVOL has developed a proprietary software (ZYMEVOLVER) for enzyme engineering, which has been successfully applied to enhance activity, specificity, selectivity or thermostability of biocatalysts. The company's vision is to catalyze the replacement of unsustainable chemical processes, which often use expensive and contaminating metal catalysts by clean and sustainable biocatalysts (enzymes). ZYMVOL has clients from 11 different countries and from the Pharma, Chemistry, Biotech and Flavours&Fragrances sectors. The company also participates in public-funded projects (see website for a detailed list) and is also highly involved in training young scientists, by hosting MSc students and training PhD ones (e.g. BioInspireSensing H2020-MSCA-ITN-2020 project). The company counts with the necessary spaces, computer and human resources to host the candidate student to carry out the computational work involved in this project.

Brief description of the PhD project and University-Company collaboration: Zymvol will help and train the PhD candidate in the identification of variant forms of Glutamate decarboxylase that may exhibit 1) improved binding capacity of compounds containing phosphinic / sulfinic / sulfonic groups bound to gamma carbon, 2) unchanged ability to bind PLP as compared to the wild type enzyme and 3) an improved paracatalytic activity (i.e. favoring the reaction with O₂). These variants, designed on the basis of the in silico design performed in Zymvol, will be produced in recombinant form and their biochemical properties and enzymatic activity will be thoroughly investigated in the laboratory of Prof. De Biase. It is important to recall here that the crystallographic structures of various forms of E. coli glutamate decarboxylase and some of its variants are available in PDB (Protein Data Bank) as a result of a past joint effort between the group of Prof. De Biase and structural biologists in Switzerland [8,9]

The period of activity at Zymvol will be 12 months and at present it is considered useful that it is carried out in a single period, i.e. after the first 8-9 months in Sapienza. This will help the doctoral student to create solid skills that will allow him/her to work remotely once he/she returns to the Department in Sapienza.

Long-term impact of this project: Given the great conservation in PLP-dependent enzymes of key amino acid residues involved in the catalytic process and in binding some specific functional groups, this project is believed to have immense implications on the green chemistry utilizing PLP-dependent decarboxylases that participate in the synthesis of molecules of considerable interest for the chemical and polymer industries, and for the pharmaceutical ones. Therefore, the impact at the level of "green chemistry" is extremely high and an improvement in the reactivity of molecular oxygen in PLP-dependent enzymes, proposed in this project, will lay the foundations for optimizing artificial evolution also in other PLP-dependent enzymes, towards new biocatalysts capable of carrying out otherwise challenging reactions.

Bibliografia:

- [1] <https://www.cost.eu/actions/CA18113/>; <https://euromicroph.eu/about/>
- [2] <https://teb2019.azuleon.org/speakers.php>
- [3] Green Chemistry (2009), IF: 10.026; <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2009/gc/b913741f>*
- [4] J Biol Chem (2009), IF 5.15; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2797229/>*
- [5] Communications Chemistry (2020); IF 5.80; <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00368-z>*
- [6] FEBS Journal (2020); doi:10.1111/febs.15277

[7] Natural Product Reports (2018); <https://doi.org/10.1039/C8NP00049B>

[8] EMBO J (2003); IF 11.6; <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg403>*

[9] EMBO J (2009); IF 11.6; <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601107>*

* published work from De Biase group relevant for this project.