



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 91484

(22) Заявено на 15.03.90

(24) Начало на действие на
патента от: 17.07.89

Приоритетни данни

(31) 88201539 (32) 15.07.88 (33) EP
88402789 04.11.88 EP(41) Публикувана заявка в
бюлетин № на

(45) Отпечатано на 25.07.94

(46) Публикувано в бюлетин № 5
на 24.05.94

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег.

(73) Патентоприетател(и):

Gist-Brocades N.V., Delft (NL); Plant
Genetis Systems N.V., Brussels (BE)

(72) Изобретател(и):

Wilhelmus Johannes Quax
Voorschoten
Rudolf Gijsbertus Marte Luiten
Leiden
Paul William Schuurhuizen
Delft (NL)
Nadir Mrabet
Koekelberg (BE)(74) Представител по индустриална
собственост:(86) № и дата на PCT заявка:
PCT/EP89/00839, 17.07.89(87) № и дата на PCT публикация:
WO90/00601, 25.01.90

(54) НОВИ ГЛЮКОЗОИЗОМЕРАЗНИ ЕНЗИМИ И УПОТРЕБАТА ИМ

(57) Новите ензими са приложими в индустриалните процеси, по-специално в конверсията на глюкозата във фруктоза, и при получаването на фруктозни сиропи като високофруктозни зърнени сиропи. Ензимите се получават чрез експресия на ген, кодиращ глюкозоизомеразния ензим, получен от *Actinoplanes missouriensis*.

13 претенции; 21 фигури

(54) НОВИ ГЛЮКОЗОИЗОМЕРАЗНИ ЕНЗИМИ И ТЯХНАТА УПОТРЕБА

Настоящото изобретение се отнася до нови глюकोзоизомеразни ензими, които са подходящи за прилагане в индустриални процеси, по-специално за конверсия на глюकोза във фруктоза. Изобретението се отнася също до използването на новите ензими за получаване на фруктозни сиропи, по-специално за високофруктозни зърнени сиропи.

Глюкозоизомеразата катализира обратната изомеризация на глюкоза до фруктоза, която е широко приложима като заместител на захарта вследствие на по-високата сладост в сравнение със захарозата и глюкозата. Известни са много микроорганизми, продуциращи глюкозоизомеразата, виж пример и обзора на статиите от Wen-Pin Chen in *Process Biochemistry*, 15, June/July (1980), 30-41 and August/September (1980) 36-41, в който са изброени много микроорганизми, способни да продуцират глюкозоизомеразата.

Някои микроорганизми са прилагани и индустриално. В обзора на статиите от Wen-Pin са описани условията на култивиране на микроорганизмите и методите на възстановяване и пречистване на получената глюкозоизомеразата.

Получаването на глюкозоизомеразата, който е един екстрацелуларен ензим, е сравнително евтино. Разработени са специални правила за възможната повторимост и продължително използване на ензима. Чрез имобилизация на ензима, обикновено във водонеразтворима форма, той може да се използва и в пакетен, и в продължителни процеси (например пакетни реактори). Един от най-големите недостатъци на имобилизацията на глюкозоизомеразата е същественото намаляване на специфичната активност, вследствие на присъствието на инертни материали. Ситуацията става още по-лоша съгласно описанието, когато глюкозоизомеразата е инактивирана чрез повишаване на температурата. Една необратима загуба на активността ще бъде резултат от температурно увреждане.

Въпреки опитите за получаване на ензимна стабилност се наблюдава съществена загуба на активност при нормални условия на приложение. Ето защо, има непрекъсната нужда от нови ензими като глюкозоизомеразата с

подобри свойства, например нейната подобрена термостабилност позволява да се използва това, че равновесието на изомеризацията е изместена към фруктозата при висока температура. Повечето глюкозоизомеразни ензими при рН 7,5, но фруктозата е нестабилна при него. Необходими са глюкозоизомеразни ензими, които могат да се прилагат под рН 7,5.

Ензими с подобрени свойства могат да се получат или намерят по няколко начина, например чрез класическия скринингметод, чрез химична модификация на съществуващи протеини или чрез използване на модерни генетични и протеининженерингови техники.

Скрининг на организми или микроорганизми, проявяващи описаната ензимна активност, може да се илюстрира, например, като изолиране и пречистване на ензима от микроорганизма или от културалната супернатанта от същия микроорганизъм, определящ неговите биохимични свойства, и проверяване дали тези биохимични свойства удовлетворяват изискванията за описание.

Ако идентифицираният ензим не може да се получи от природно продуциращият го организъм, рекомбинантната ДНК-техника може да бъде използвана за изолиране на гена, кодиращ ензима, за експресия на гена в друг организъм и за изолиране и пречистване на експресирания ензим и да се провери дали е подходящо за даденото описание.

Модификацията на съществуващите ензими може да се достигне *inter alia* чрез химична модификация. Вж. например I. Svendsen, *Carlsberg Res. Commun.* 44 (1976), 237-291. Тези методи също са неспецифични в това, че те модифицират всички достъпни остатъци с общ сайд от веригата или са в зависимост от присъствието на подходящи аминокиселини за модифициране и често те са неспособни да модифицират аминокиселини, които са трудно достъпни, ако ензимната молекула е разгърнатата.

Ензимна модификация чрез мутагенезис на включения ген е недопустима за посочените неспецифичности, поради което се счита за по-съвършена. Мутагенезисът може да бъде достигнат както чрез случайна мутация, така и чрез сайтнасочена мутация.

Случайната мутация с въздействие на цялостния микроорганизъм с химична мутация или с мутационна радиация може да ре-

зултира в модифициран ензим, но тогава е необходимо да се спазват строги селекционни правила за получаване на мутанти с търсените свойства. По-висока вероятност за изолиране на търсени мутанти чрез случайна мутагенеза може да се постигне чрез клониране на кодиращия ген, генетичната му модификация чрез метация *ин витро* или *ин vivo* и експресиране на кодиращия ензим чрез реклониране на мутирания ген в подходящ клетъчен гостоприемник. В този случай също е необходимо да се води строг селекционен протокол за подбор на търсените мутантни ензими. Тази специфична селекция не се отнася до селекция на ензими, подходящи за приложение при получаването на фруктоза.

Сайтнасочената мутация (SDM) е най-специфичният начин за получаване на модифицирани ензими, даващ възможност за специфично заместване на една или повече аминокиселини с всяка друга търсена аминокиселина.

В един от аспектите на изобретението се осигуряват нови мутанти на глюкозоизомераза, получени чрез експресия на гени, кодиращи този ензим, който е с аминокиселинна последователност, отличаваща се най-малко по една аминокиселина от кореспондиращия природен ензим, и проявяващи подобрени свойства.

Съгласно друг вариант на изобретението е създаден метод за получаване на такива нови мутантни глюкозоизомеразы, който се основава на модификации от интер- и интрамолекулярни взаимодействия от кореспондиращия природен (див) тип ензим.

Съгласно още един вариант е създаден метод за селектиране на мутантни ензими с подобрени свойства по време на индустриалното приложение.

ОПИСАНИЕ НА ФИГУРИТЕ

Фигура 1. Кинетиката на топлинната инактивация на свободна от метал глюкозоизомераза от EcoAmi (DSM) GL в 50 mM MOPS, pH 7,2 при 25°C. Не е добавен метал;

Фигура 2. Същото както на фиг.1, но се добавя 10 mM Mg²⁺;

Фигура 3. Същото както на фигура 1, но е добавено 10 mM Co²⁺;

Фигура 4. Диаграма на температурната зависимост при топлинна инактивация от

EcoAmi (DSM) GL в 50 mM MOPS, pH 7,2, при 25°C;

Фигура 5. pH зависимост на топлинната инактивация на свободен от метал EcoAmi (DSM) GL при 72°C без добавяне на метал.

5 CHES = 2-(циклохексиламино)етан сулфонова киселина;

Фигура 6. Силен йонен ефект върху кинетиката на температурната инактивация на свободен от метал EcoAmi (DSM) GL в 50 mM MOPS, pH 6,7, 72°C; не е добавян метал;

10 Фигура 7. Силен йонен ефект върху кинетиката на топлинната инактивация на свободен от метал EcoAmi (DSM) GL в 50 mM MOPS, pH 6,7, 72°C; не е добавян метал;

15 Фигура 8. SEC-HPIC на EcoAmi (DSM) GL след пролонгирана инкубация на EcoAmi (DSM) GL в 7M урея при 25°C;

Фигура 9A. SEC-HPIC на EcoAmi (DSM) GL, предварително третиран с цианат при 25°C при отсъствие на урея. Елюиращият буфер е 50 mM Трис (HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,02% NaN₃;

20 Фигура 9B. Натурален PACE от EcoAmi (DSM) GL е третиран с цианат при 25°C в отсъствие на урея.

Фигура 10A. SEC-HPIC от EcoAmi (DSM) GL, предварително третиран с цианат в присъствието на 5M урея при 25°C.

30 Фигура 10B. Натурален PACE от EcoAmi (DSM) GL, третиран с цианат в присъствието на 5M урея при 25°C.

Фигура 11. Гликация на EcoAmi (DSM) GL в 50 mM MOPS, pH 7,7, 60°C.

35 Отворени цикли: не се добавя глюкоза; затворени цикли: +250 mM глюкоза; триъгълници: инкубация с глюкоза (250 mM), последвана от екстензивна диализа за тестиране на реверзибилността.

40 Фигура 12. Кинетика на инактивацията на EcoAmi (DSM) GL-мутант K253Q.

Фигура 13. Кинетика на тетрамер-димерната дисоциация при 25°C в 5M урея на EcoAmi (DSM) GL мутант K 253 P.

45 Фигура 14. Кинетика на гликацион-индуцираната инактивация на EcoAmi (DSM) GL мутант K253 P при 60°C в 12,5 mM натриев фосфат, pH 7,7.

Фигура 15A. Структура на pMa/c5-8.

50 В pMa тип вектора нуклеотидът 3409 е изменен от A на G, докато в pMc тип-вектора нуклеотидът 2238 е променен от G на C, създавайки стопкодони в хлорамфеникол ацетил

трансферазния ген и в в-лактамазния ген респективно, достигайки посочената генна инактивация (P.Stanssens et al./1987) в: "Oligonucleotid-directed construction of mutations by the gapped duplex DNA method using the рMa/C plasmid vectors", Manual used at the EMBO laboratory course "Directed Mutagenesis and Protein Engeneering" held at the max Plauck Institut fur Biochemie Martinsreed, July 4-18, 1987.

Последователността, както е показана на фигурата, е на рMa -8.

Фигура 15B. Последователността на промотора ламбда P_R е представена в експресионния вектор рMa /с5P_R/ чрез заместване на нуклеотидите 3754 на 3769 от рMa /с5-8/.

Фигура 15C. Так-промоторна последователност, както е в експресионния вектор рMa /с5T/, замествайки нуклеотидите 3754 на 3769 от рMa /с5-8/.

Фигура 16. Цялата генна последователност и получената аминокиселинна последователност от дивия тип *Actinoplanes missouriensis* глюкозо изомераза.

Фигура 17. Физична карта на глюкозо-изомеразната /G1/ експресионна единица за рMa/с-1. Позициите на релевантните рестрикционни сайтове, P_R промотора и протеинкодиращата област са означени. Отбелязаните със звездичка рестрикционни сайтове са представени със сайтнаочена мутагенеза.

Фигура 18. Свойства на глюкозоизомеразния мутант при различни рН.

Aмi: Мутантна K253P глюкозоизомераза, продуцирана от мутантния плазмид рMa - I. K253R.

Означени са различни k_d измервания за Амi WT /[]/ и АмiK253R/o/.

Може да се види, че Амi K253R има подобрена k_d величина в тесен рН интервал.

Фигура 19. Цялата генна последователност и получената аминокиселинна последователност на дивия тип *Streptomyces murinus* глюкозоизомераза.

Фигура 20. Физична карта на глюкозо-изомеразната експресионна единица за рMa/с - G1smu1. Позициите на релевантните рестрикционни сайтове, Так-промотора и протеинкодиращата област са означени.

Фигура 21. Построяване на аминокиселинната последователност на глюкозоизомеразата от различни източници. Цялата последователност на *Actinoplanes missouriensis* глюкозоизо-

мераза е представена, докато за глюкозоизомеразите от други източници са дадени само аминокиселинните остатъци, отличаващи се от тези за *Act. missouriensis*. Аминокиселинната последователност на глюкозоизомеразата се отличава от публикуваната последователност /Saari, J. Bacteriol., 169 (1987) 612/ с един остатък - Пролин 177 в публикуваната последователност е намерено, че е Аргинин.

Последователността на *Str. thermovulgaris* е установена само до аминокиселина 346; недетерминирани остатъци са отбелязани чрез блокиране /./.

Тирето /-/ означава липсата на аминокиселинен остатък в тази позиция, сравнено с всяка друга последователност. Различните видове са отбелязани със следните символи:

Ami: *Actinoplanes missouriensis* DSM 4643

Amp: *Ampullariella* species ATCC 31351

Art: *Arthrobacter* species

Smu: *Streptomyces murinus* 40091

Svn: *Streptomyces violaceoniger* CBS 409.73

Svr: *Streptomyces violaceoruber* LMG 7183

Sth: *Streptomyces thermovulgaris* 40444

Описание на изобретението

Съгласно изобретението мутантните глюкозоизомеразни ензими могат да бъдат описани на базата на внимателно изследване структурата на дивия тип глюкозоизомеразата в комбинация с внимателно биохимично изследване на процесите, водещи до инактивация на оригиналните глюкозоизомеразата в условията на приложение, последвано от рационална модификация на дивия тип генна последователност. Екстензивно изследване на описаните мутанти в условията на индустриално приложение води до идентификация на мутанти с подобрени свойства.

Под "подобрени свойства" се разбира висока обратимост на изпълнение и/или подобрена стабилност, специално температурна, съответстваща на кореспондиращия див тип ензими. В допълнение, към термична термостабилност се разбира повишена стабилност при различни стойности на рН, както и в комбинация с увеличена термостабилност.

Изобретението се базира на откритието, че активността на тези ензими е оптимална, когато ензимът е в мултимерна (димерна, тримерна, тетрамерна и др.) форма и така наречената активност може да се намали дори

до загубване на взаимодействието между субединиците. Например е намерено, че ензимната активност на глюкозоизомеразата от *Actinoplanes missouriensis* е уникална за тетрамерната структура и съществено е намалена при дисоциация на нативната тетрамерна структура в димерна.

Поради това съгласно изобретението се предвиждат нови мутантни глюкозоизомеразни, в които взаимодействието между субединиците (мономери, димери и т.н.) е увеличено, резултирайки в подобрени свойства на ензимите, по-специално при приложението. Изобретението предвижда също методи за повишаване взаимодействието между глюкозоизомеразните субединици.

Съгласно предпочитан вариант на изобретението тетрамерната структура на глюкозоизомеразата е постигната чрез усилване на взаимодействието между димерите в тетрамери.

Подходящ метод за повишаване стабилността на тетрамерната структура например е въвеждането на йонизационни мостове. Електростатичните ефекти са добре познати като играещи фундаментална роля в ензимната структура и функции (вж. J.A. Matthew et al., *CRC Critical Reviews in Biochem.*, 18 (1985), 91-197). Например те изброяват рН зависимостта на ензимната катализа доколкото рН оптимумът за дадения протеин е определен от присъствието на йонизационни групи заобикалящи активния сайт. Електростатичните взаимодействия, включени в водородните връзки и йонните (солеви) мостове, са важни за стабилизирането на всички протеинови структури (вж. A.J. Russell and A.R. Fersht, *Nature* 36 (1987) 496-500). Съгласно предположението, че дисоциацията на глюкозоизомеразния тетрамер в димери най-вече е отговорна за ензимната денатурация, този процес може да се предотврати чрез въвеждане в интерфазите на допълнителни стабилизиращи взаимодействия, например като суплементарни солеви мостове.

Една възможност за представяне на нови солеви мостове в даден протеин е заместването на два съседни остатъка в противоположно заредени аминокиселини, например Asp и Arg, и след това да се провери чрез изчисления на енергията например, че се е осъществило йонно взаимодействие. Това въвеждане на нови солеви мостове изисква два мутаци-

онни пункта. Обратно може да се създаде солев мост чрез заместване на остатък в близост до една заредена изолирана аминокиселина, като по този начин се създава една йонизационна двойка чрез самостоятелна точка на мутация.

Друг подходящ метод за повишаване стабилността на тетрамерните структури е въвеждането на дисулфидни мостове. Дисулфидните връзки са обща характерна особеност на много екстрацелуларни протеини. Ролята им се състои главно в стабилизиране на протеините и този ефект е един от най-добре разбраните. То се обяснява с намаляване на ентропията в разгърнато състояние, но някои факти остават необяснени при такова просто описание, т.е. Creighton, *Bioessays*, 8 (1988), 57-63, посочва, че пертурбацията, предизвикана в природно състояние, също трябва да бъде взета под внимание.

Направени са много опити и са описани в литературата за конструиране на дисулфидни мостове с различен успех. Pantoliano et al., *Biochemistry* 26 (1987) 2077-2082 чрез въвеждане на два цистеинови остатъка в субтилизин чрез точкова мутация в гена се постига увеличаване на температурата на топене с 3°C. Y.E. Villafranca et al., *Biochem.* 26 (1987) 2182-2189 въведен цистеинов остатък чрез точкова мутация в дихидрофолат редуктаза, и използвайки присъствието на свободен цистеин в дивия тип ензим, формират дисулфидни мостове. Тези дисулфидни връзки обаче имат един неочакван ефект, доколкото мутантният ензим няма увеличена устойчивост на термична денатурация, но е повече на денатурация от гуанидинхлорид. В тези два случая мутантните ензими не са така стабилни както е очаквано.

Тези два известни начина са подходящи за правене както на двойна, така и на единична точкова мутация, както е посочено. За мултимерните протеини (ензими), създадени от мономерни единици, свързани чрез симетрични краища, може да съществува трета възможност: създаване на дисулфиден мост чрез единична точкова мутация без каквато и да е необходимост от свободен Cys. Този метод успешно е използван от Sauer et al., *Biochemistry* 25 (1986), 5992-5998, в ламбда репресор: получено е 10°C увеличаване на температурата на топене, 60% увеличение на устойчивостта срещу денатурация от урея и на повечето от

константите на свързване.

Като предварително изискване за последния метод са необходими симетрични краища между най-малко два мономера. Симетричните краища, които също са ротационни, имат свойството, че разстоянието между една точка и края по време на ротацията е отбелязано. Точката на мутация, въведена в близост до симетричния край на мултимерната структура, ще бъде репродуцирана в близост до тази точка. Този метод предоставя преимуществото от въвеждане на интермономерни дисулфидни мостове чрез единична точкова мутация.

Съгласно друго предпочитано изпълнение на изобретението се увеличава стабилността на тетрамерната структура на глюкозоизомеразата чрез стабилизиране на димерната структура. Това може да бъде представено като денатурация на ензима, който най-малко е частично обратима реакция на тетрамера в димери, последвана от дисоциация на димерите в два мономера всеки. Чрез стабилизиране на димерната структура, денатурацията на димера ще прогресира по-бавно и съответната реасоциация ще се повиши. Заместванията, които редуцират чувствителността на мономерните и/или димерните структури за химична модификация могат също да имат стабилизиращ ефект, докато те удължават необратимостта на разгъването на протеина.

В друго предпочитано изпълнение тетрамерната структура е стабилизирана индиректно чрез стабилизиране на димерната структура или дори на мономерната структура от глюкозоизомеразата чрез специална мутация. Чрез изменение на пакета от мономерна и/или димерна структури конформационната свобода на всяка от частите от тетрамерната структура е намалена, което причинява стабилизационен ефект върху тетрамерите.

Мутациите, стабилизиращи взаимодействията между ензимните субединици, ще бъдат способни да стабилизират взаимодействията между областите вътре в мономерния протеин.

Очевидно е за всеки специалист в областта, че ако е необходимо получаване на глюкозоизомеразата с намалена стабилност, стабилизационните сили, както са описани, могат да бъдат отслабени чрез прилагане на аналогични процеси. Мутанти с тези свойства и проце-

си за получаване на такива мутантни форми също са част от изобретението.

В описанието са използвани едновременно троичен и единичен буквен код за означение на аминокиселините, изложен в следващата таблица 1.

Таблица 1

10	Аланин	Ala	A	Левцин	Leu	I
	Аргинин	Arg	R	Лизин	Lys	K
	Аспарагин	Asp	N	Метионин	Met	M
	Аспартат	Asp	D	Фенил-		
				ланин	Phe	F
15	Цистеин	Cys	C	Пролин	Pro	P
	Глутамат	Glu	E	Серин	Ser	S
	Глутамин	Gly	G	Триптофан	Trp	W
	Хистидин	H	H	Тирозин	Tyr	Y
20	Изолевцин	Ile	I	Валин	Val	V

Съгласно изобретението се осигурява и метод за повишаване на взаимодействието между глюкозоизомеразните субединици, което е основано на схващането за тридименсионалната структура (ЗД) на молекулите. Информацията за тридименсионалната структура на ензима (или ензимният комплекс) е от голямо значение за възможността да се предскажат мутациите, които могат да бъдат предизвикани.

Докладвани са структурни данни за глюкозоизомеразата от *Streptomyces rubiginosus* (Carell et al., J. Biol. Chem. 259 (1984) 3230-3236), *Streptomyces olivochromogenes* (Farber et al., Protein Eng. 1, (1987) 459-466 и *Arthrobacter Henrice* et al., Protein Eng. 1, (1987) 467-475.

Независимо от това обаче няма на разположение данни относно аминокиселинната последователност на тези ензими и ЗД-структурна хомология с *Actinoplanes missouriensis* - глюкозоизомеразата (вж. F.Rey et al., Proteins 4 (1988) 165-172). За да се демонстрира голямата приложимост на метода, включен в изобретението, гените за глюкозоизомеразата, изолирани от различни видове, са клонирани и съгласувани в последователност от аминокиселини. Аминокиселинната последователност за глюкозоизомеразите, както са изведени от гените на *Streptomyces violaceoruber*, *Streptomyces murinus*, *Arthrobacter spec.* и

Strept. thermovulgaris, са доказано хомоложни. Публикуваните аминокиселинни последователности за глюкозоизомеразите от *Ampullariella* (Saari, *ibid.*) и *Streptomyces violaceoniger* (Nucl. Acids Res. 16 (1988) 9337), изведени от нуклеотидната последователност на респективните гени, показват тясна хомология с глюкозоизомеразата от *Actinoplanes missouriensis*. В допълнение, WO 89/01520 разкрива, че аминокиселинната последователност на глюкозоизомеразата от *Str. rubiginosus* е хомоложна на глюкозоизомеразата от *Ampullariella* sp.

Въпреки че липсват данни за 3Д-структура на повечето глюкозоизомеразы, може да се заключи, че всички глюкозоизомеразы от *Actinomycetales* имат аналогична тетрамерна организация.

Съгласно един от аспектите на изобретението йонните мостове могат да се представят по следния начин. Глюкозоизомеразният тетрамер е скриниран с цел откриване на негативно заредени остатъци (Asp и Glu, йонизирани при рН стойност, както е използвано в описаните условия), чиито карбоксилатни части са на разстояние най-малко 8 Å от вероятните позитивно заредени атоми (дистални нитрогени на Lys и Arg). Намерени са четиринадесет остатъка, които да задоволяват тези критерии. Между тях са селектирани остатъци, като ги разделят помежду им и по-нататък се разполагат интериорно на протеина. Този маниер е въведен с цел да се елиминира възможността за формиране на солеви мостове по повърхността на протеина, тъй като се очаква да има по-малък ефект на цялостната стабилност (незащитените заредени остатъци могат в действителност да бъдат включени в водородните връзки на водните молекули и взаимодействат с изброените йони). Във връзка с това се създават нови солеви мостове, включващи остатъци, комбинирани между две стабилизационни съставки: първо, отстраняване на съществуващите изолирани остатъци и второ, създаване на йонен чифт протектор срещу въздействието на субстрата или разтворителя.

Измежду 14-те негативно заредени и изолирани остатъка в *Actinoplanes missouriensis*-ната глюкозоизомеразата, 3 са разположени между Asp 146, Glu 221 и Asp 264. Всички те са релативно, респективно, достъпни повърхности в тетрамера: 46,9 и 42 Å. В предпочитано

изпълнение на изобретението са създадени нови солеви мостове, включващи тези остатъци, като са използвани описаните методи. Подобни мутации могат да бъдат въведени в други глюкозоизомеразы, в това число и тези, получени съгласно посочените източници.

Като се използва посочената техника или други подобни, известни на специалистите в областта, могат да се създадат няколко точкови мутации с цел повишаване стабилността на тетрамерната глюкозоизомеразна структура (за данни относно структурата на *Actinoplanes missouriensis* глюкозоизомеразата, вж. F. Rey et al., *ibid.*). Между тях следните мутации са свързани със стабилността на една мономерна субединица:

- заместване на Gly остатък в друг остатък (α -спирала В), с цел намаляване на ентропията в разгърнато състояние

- възбуждане на гъвкава бримка (между α -спирала G и β -верига H) за редуциране на хидрофобността на незащитената повърхност

- въвеждане на Pro остатък към края на β -верига E (намаляване на ентропията в разгърнато състояние)

- мутация в Phe (α -спирала G), с цел формиране на ароматна група за влагане на външен елемент за стабилизация на протеиновата структура.

В следващо предпочитано изпълнение на изобретението заместването на аргинин с лизин е представено на глюкозоизомеразната молекула, за която се търси повишаване на стабилността. И двата остатъка са пригодени за 3Д-структура на протеина.

В протеините лизиновите остатъци, но не и аргининовите, са податливи на химична модификация. Например, епсилон аминокрупата в лизина е известно, че реагира с алдехидите и кетоните и генерира Шиф-база, привещаща и други модификационни продукти, които евентуално резултират в загуба на биологична активност (вж. P.Higgins, H.Bunn, J.Biol. Chem. 256 (1981) 5204-5208. В частност, в глюкозоизомеразното описание, където присъстват глюкоза и фруктоза във висока концентрация при повишена температура, такива химически модификации са важни фактори за ензимната инактивация. Там където лизиновите остатъци се появяват в пределите на интерфазите между областите и/или субединиците, химична модификация в такова мес-

тоположение служи да съдейства за дисоциацията на областите или субединиците, и/или да осуети правилната реасоциация на областите, и/или субединиците, които са последователно и необратимо хванати в дисоциираното състояние. Мутациите на лизинови остатъци в аргининови в такива места биха елиминирали химичните модификации, включващи епсилон аминокгрупите от лизина.

Чрез заместване на аргининови остатъци със специфични лизинови остатъци в глюкоизомеразата продължителността на химичната модификация и нейният ефект за ензимната активност и/или стабилност са редуцирани. Съответно, смяната на лизиновите остатъци с аргининови ще подобри стабилността на глюкоизомеразата по време на приложението.

Освен това в местата, които съгласуват лизиновата в аргининовата мутация, заместването на аргининови остатъци с лизинови резултира още и в увеличаване стабилността на протеините. Поради тази верижна гъвкавост за аргинина, която е по-малка от тази за лизина, вследствие на присъствието на гуанидинови групи мутацията на лизин в аргинин е благоприятна в ентропно отношение. В допълнение гуанидиновата група е способна да формира повече водородни връзки със съседни остатъци в протеина, които също водят до повишаване на стабилността.

В още едно предпочитано изпълнение на изобретението, което по-специално се отнася до повишаване термостабилността на глюкоизомеразата, най-малко един лизинов остатък, който се явява инициален, по-специално за локацията на типа, дефиниран по-нататък, е променен в аргинин. Заместването на аргинин в лизин би повишило електростатичното взаимодействие, в което заместеният аргининов остатък след това взема участие във взаимодействието между субединиците и/или областите. За да бъде заменен лизиновият остатък трябва да се подчини на следните изисквания по отношение на нагънатата природна протеинова конформация:

1. Трябва директно да бъде включен в електростатични взаимодействия, за предпочитане в пространството между субединиците и/или областите.

2. Мутациите би трябвало да се срещат в място, благоприятстващо въвеждането на ами-

нокиселинен остатък.

3. Остатъкът би трябвало да се среща в място, по-малко достъпно за разтворители, за предпочитане да е част от едно взаимодействие между субединици и/или области.

За предпочитане е, изследването за аминокиселинни остатъци в глюкоизомеразата, които удовлетворявайки критериите 1 и 2, да имат най-ниско достъпна област от повърхността (ASA) в протеина, да се провежда, като същевременно се изисква ASA да има степен, по-ниска от средното число, определено за дадените остатъци. В местата, които задоволяват тези предварителни изисквания, аргининът в сравнение с лизина осигурява повишен електростатичен ефект на взаимодействие, вследствие на физико-химичните свойства на неговите странично-верижни гуанидинови групи (вж. D.Wigley et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 149 (1987), 927-929).

Основно се изисква да се получи съществено количество ензимна активност от мутантните глюкоизомеразы, модифицирани съгласно изобретението. За да се получи такава ензимна активност, аминокиселинните остатъци, които трябва да се заместят, би трябвало да не са тези, които са идентифицирани като каталитични остатъци или като включени в кофакторни връзки.

Ясно е, че специфичното аминокиселинно заместване съгласно изобретението, може да модифицира стабилността на глюкоизомеразата чрез посоченото комбинирано въздействие като променяне силата на електростатично взаимодействие, изменение броя на водородните връзки със съседни остатъци и на конформационната ентропия на ензима или чрез повлияване на продължителността на химична модификация.

Мутантната глюкоизомераза съгласно изобретението може да бъде продуцирана по следния основен метод. Извършва се внимателен анализ на механизма или механизмите, включващи глюкоизомеразната инактивация при условията на провеждане на денатурация. Като се използват познанията, получени от този анализ, по-нататък могат да се идентифицират специфичните аргининови или лизинови остатъци като евентуални кандидати за замяна. Това е възможно чрез внимателно изпитване на ЗД-структура на ензима, определена чрез методи като кристалография

(H. Wyckoff (1985), Diffraction Methods for Biological Macromolecules, Meth. Enzymol. Vols, 114-115, Acad. Press) NMR анализ (K. Wuthrich (1986) in "NMR Proteins and Nucleic Acids" J. Wiley & sons) или обратно, от структурни предсказания, основани на анализ на първичната структура (вж. W. Taylor, Protein Engineering 2 (1988) 77) или от структурни източници, основани на свободни 3D-структури от хомоложни протеини (вж. T. Blundell et al., Nature 326 (1987) 347).

Накрая, заместването на аминокиселиния остатък, локализиран на предпочитано място (сайт), може да бъде постигнато чрез конвенционални методи, по-специално чрез сайт-насосочена мутагенеза на ДНК последователността, кодираща глюкозоизомеразата, използвайки примерно вектори и методи, както са описани от Zell and Fritz (EMBO J. 6 (1987) 1809).

Мутациите, които се дискутират, само илюстрират изобретението без да го ограничават. Изобретението се пояснява и със следващите неограничаващи го примери.

Докато в други отношения примерите са специфични, всички методи за получаване и манипулиране на рекомбинантна ДНК са проведени по стандартен начин, описан от Maniatis et al. 1982.

Плазмидите, векторите и бактериалните щамове, използвани или създадени в примерите, са депозираны в Deutsche Sammlung für Microorganismen, Göttingen при условията на Будапещенския договор или в Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS), Baarn, The Netherlands, са следните:

pMc5-8 DSM 4566
pMa5-8 DSM 4567
pECOR 251 DSM 4711
E.coli K527 CBS 471.88

Пример 1. Изолиране и клониране на глюкозоизомеразния ген от *Actinoplanes missouriensis* (DM 43046).

Продукция на Д-глюкозоизомеразата в *E.coli*.

Д-глюкозоизомеразата (GI) е синонимно използвана за Д-ксилозоизомеразата (Д-ксилоза) кетоизомеразата, EC 5.3.1.5., един ензим, който превръща Д-ксилозата в Д-ксилулоза. Д-глюкозоизомеразата от *Actinoplanes missouriensis*, получена от изменена чрез инженерна намеса в щамове *E.coli* е означена като EcoAmi (DSM) GI. За да бъде отличен

гена на *Act. missouriensis* кодиращ GI от аналогични гени на *E.coli* ху1А, първият ще бъде означаван като GI.

Общата ДНК от *Act. missouriensis* DSM 43046 бе разединявана на части с рестрикционната ендонуклеаза Sau 3А. Частите бяха фракционирани до захарозен градиент и фрагментите с дължина между 2 и 7 килобази (kb) бяха свързани в уникалния BglIII сайт на плазмидна pECOR251. Ксилозоизомеразният дефицитен щам *E.coli* AB 1886 - както е описано в Howard - Flanders (Genetics 53 (1966) 1119) и получен от щам *E.coli* AB 1157 (DSM 1563), бе трансформиран чрез свързващо смесване и култивиране върху минимална агарова среда (Miller (1972) в "Experiments in Molecular Genetics" Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.J.), допълнена със 100 mg/l ампицилин и 0,2% (W/V) ксилоза (MMX). Тридесет и седем клона бяха възстановени (означени като pAM11 - 137) и култивирани в LB-среда, съдържаща 100 mg/l ампицилин. Рекомбинантната плазмидна ДНК бе изолирана и анализирана чрез рестрикционен анализ. Бяха разпознати две групи от плазмидна, една (pAM17), съдържаща 2,8 кв инсерция, а другата - (pAM125), съдържаща 4,9 кв инсерция. Екстензивен рестрикционен анализ показва, че двата типа инсерция имат област от около 2,0 кв общо. Последователното детерминиране на тази област чрез химично разграждане (A. Махам and W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 560) разкрива една отворена структура с дължина 1182 нуклеотида, която бе идентифицирана като кодираща област от GI. Нуклеотидната последователност от GI заедно с получената аминокиселинна последователност е показана на фигура 15. Номерирането на аминокиселините се отнася до фиг.15.

Особено висока експресия на GI може да бъде достигната в *E.coli* чрез поставяне на гена под транскрипционен контрол, осъществяван от десен промотор (P_{λ}) от бактериофага ламбда както следва. Плазмидът pLK 94 (J. Botterman and M. Zabeau, ДНК 6 (1987) 583 първо се модифицира за елиминиране на Pst I сайта в β -лактамазния ген. Това бе осъществено чрез изолиране на 880 bp EcoRI (Pst I фрагмента от pLK70 - 70p / Botterman and Zabeau/, съдържащ N-крайна част от β -лактамазния ген, и 1700 двойки бази (bp) на

ECORI фрагмента на pLK94, съдържащ C-крайна част от β -лактамазния ген, така както репликационния вид. Последователното свързване на тези фрагменти довежда до pLK94p.

pAM17 бе слепена с PstI и сместа от два пречистени фрагмента с около 1800 bp дължина, единият от които съдържа гена GI, бе свързана с PstI сайта от pLK94p. Свързаната смес е използвана за трансформация на щам E.coli AB 1886. Устойчивите на ампицилин, GI⁺ трансформанти се получават чрез култивиране на MMX.

Плазмидната ДНК бе изолирана от няколко селектирани трансформанта и характеризирана чрез рестрикционен анализ. Плазмидът pLK94, приютил фрагмента PstI, съдържащ GI, бе определен като pLK 94GI. Ориентацията на GI е такава, че уникалният ВамНI сайт е локализиран на около 470 bp над GTG инициращ кодон.

pLK70 - 70p бе слепен с PstI, направен сляп с ДНК полимеразата I (кленов фрагмент) и последователно анализиран с XbaI.

pLK94GI бе линеаризиран с ВамНI и изследван с екзонуклеазата BaI 31. Пробите бяха взети през различно време - реакцията бе прекратена с динатриев етилендиаминтетраацетат (ЕДТА)-слепени с XbaI и анализирани чрез гел електрофореза за детерминиране на средно големите ВамНI - XbaI фрагменти. Фрагментите, достигащи големина от 1350 до 1450 bp бяха елюирани от гела. Фрагментите бяха свързани в pLK70 - 70 p. E.coli K514 / C.Cotson et al., Genetics 52 1965, 1043, бе трансформиран със свързваща смес и ампицилинрезистентните трансформанти бяха селектирани при 37°C. Плазмидната ДНК, изолирана от различни трансформанти, се охарактеризира чрез рестрикционен анализ. Двадесет и четири клона, съдържащи плаزمиди с интактни GI, се съхраняват и след това подлагат на тест за продуциране на EcoAmI (DSM) GI. Културите се отглеждат цяла нощ при 37°C, след което тоталният клетъчен екстракт се фракционира с полиакриламидна гел електрофореза (PAGE) върху 12,5% натриев додецилсулфат (SDS) (U. Laemli, Nature 227, 1970, 680). В сравнение с нетрансформирана контролна култура K514 един от клоновете показва високо ниво на синтеза на нов протеин с молекулно тегло 42 килодалтона (kd), идентифициран като EcoAmI (DSM) GI чрез оцветяване по Western, като се

използва поликлонален серум срещу пречистен GI от Act. missouriensis. Плазмидът, отнасящ се до високотропутивен EcoAmI (DSM) GI от E.coli K514, е определен като pLK70CI.

P_R - GI транскрипционната единица може да бъде изразена като EcoRI - XbaI фрагмент, чиято аминокиселинна последователност е дадена на фиг.16. След елюацията от агарозен гел този фрагмент се свързва и с pMa5-8 и с pMc5-8, които се усвояват с EcoRI и XbaI - рестрикционни ендонуклеази, носени съответно от pMa5-GI и pMc5-GI. Установено е, че тези вектори насочват равномерна и ефективна синтеза на EcoAmI (DSM) GI, докато нивото на експресия не се отличава съществено от тази на получения с pLK70CI.

Експресията на GI може да се увеличи по-нататък чрез промяна на GTG инициаторния кодон в ATG триплет. Това се осъществява чрез сайт-насочена мутагенеза както в пример 4, като се използва следният олигонуклеотиден праймер

5'-GGACAGACATGGTTACC - 3'

Дивият тип и мутантният GI ензими се продуцират от щам E.coli K514, култивирани на среда, композирана от 1% триптон, 1% NaCl, 0,5% дрождев екстракт и ампицилин (100 mg/l) за pMa тип вектор или хлорамфеникол (25 mg/l) за pMC тип вектор. Клетките се отглеждат цяла нощ при 37°C и след това се центрофугират. Ензимът EcoAmI (DSM) GI се пречиства както следва. Клетъчната утайка, получена след центрофугирането, се ресуспендира в минимален обем 0,05 M Трис (хидроксиметил) аминометан (Трис (HCl)), 0,1 mM CoCl₂, 10 mM MgCl₂, 0,2 KCl, 5% глицерол и 5 mM ЕДТА, рН 8,0 и лизозимът се добавя до крайна концентрация от 1,0 mg/ml. След престояване за 20 мин при температура 0°C, клетките се лизират с "Френска преса", центрофугират се (30 мин при 23000 g) и супернатантата се залива с еднакъв обем от 5%-ен стрептомицинсулфат. Инкубацията се провежда при 4°C в продължение на 3 часа и се последва от центрофугиране (30 мин при 23000 g). Резултантната супернатанта се нагрива до 70°C (освен за мутантите K253Q и K100P, които се нагриват само до 50°C) за 30 мин и отново центрофугират. Разтворимата горна фаза се довежда до 80% с амониев сулфат.

Преципитатът, който съдържа повечето от ензимната активност, се събира чрез центрофугиране, след което се разтваря в 0,02 М Трис/HCl, 5 mM EDTA, 0,85 М амониев сулфат. Последващата хроматография включва Фенил-супероза. Сефакрил - 200 НР и накрая Моно - Q HR 10/10. И най-важното - добавянето на 5 mM EDTA за всички буфери за хроматография е необходимо, за да елиминира металните йони. Предимно за използване резултатният ензим се диализира 3 пъти срещу 200 обема от 10 mM триетаноламин, рН 7,2, съдържащ 10 mM EDTA /крайното рН е около 5,2/ и отново срещу 200 обема от 5 mM /2-N-морфолино/етаносулфонова киселина/ (IME), рН 6,0, с 3 буферни изменения. Металното съдържимо на крайния ензимен препарат се определя чрез атомна абсорбционна спектроскопия на Varian Spectr AA 30/40 и е установено, че ECoAmi (DSM) е свободен от метал; например, това може да се покаже като кобалтови йони, които обикновено се свързват с ензима с голям афинитет, се наброяват само в количество $\pm 1 \times 10^{-4}$ мол за мол от ECoAmi (DSM) GI мономер (когато EDTA е пропуснат в хроматографския буфер, последният се увеличава до 0,5 мол кобалт за мол ензимен мономер). Чистотата на ECoAmi (DSM) GI се оценява чрез SDS-PAGE и сребърна реакция и също така чрез високо течностна хроматография (HPLC) на Vydac колона.

Ензимната активност на глюкозоизомеразата се изпитва както е описано (1 единица ензимна активност продуцира 1,0 микромола от продукта - Д-ксилоза или Д-фруктоза за минута; поради което специфичната активност - ра - се изразява като единици за мг от GI ензимите).

Трифенилтетразолиумхлоридна (TTC) проба най-напред е описана за визуализация на Д-ксилозоизомеразите на дискова електрофореза (К. Yamataka, Bull. Yamaguchi Med. School 18, (1971) 1). Този метод се основава на реакцията на захари с тетразолиева сол за формиране на формазан при стайна температура, която реакция е специфична за кетоза на стайна температура, като алдозата реагира само при 100°C. Върху гелове, активната ксилозоизомераза може по този начин да се идентифицира като розово-червена ивица. С малки модификации този тест за активност бе адаптиран за използване във Фармация Фаст

Систем. По-специално, следвайки електрофорезата, нативният PAGE гел се пренася във Фаст Систем - оцветяваща камера и се инкубира за 15 мин при 50°C в 20 mM Трис/HCl, рН 7,2, с 50 mM ксилоза, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM CoCl₂. След промиване с деминерализирана вода 0,5 мин при 4°C гелът се потапя за 3 мин при 20°C в трифенил-тетразолиумхлорид, изготвен пряко в 1N NaOH. Реакцията се преустановява чрез инкубация на гела в 2N NaCl за 15 мин при 20°C, а финалното промиване става във вода (0,5 мин при 4°C).

GI активността може също да се изпита директно чрез директно измерване на увеличението на абсорбцията при 278 nm на ксилозата, продуцирана при 35°C чрез изомеризация на ксилоза чрез ксилозоизомеразата. Това изпитване се осъществява в 50 mM триетаноламино буфер, рН 7,5, съдържащ 10 mM MgSO₄, в присъствието на 0,1 М ксилоза. Крайната концентрация на глюкозоизомеразата в пробата е $\pm 0,01$ мг/мл и е точно детерминирана по-рано в пробата от ензим на смес чрез абсорбционна спектроскопия, като се използва екстинционен коефициент от 1,08 при 278 nm за разтвор от ензима от 1,0 мг/мл.

В Д-сорбитол дехидрогеназната двойна проба ензимното определяне на Д-ксилоза се осъществява при 35°C както е описано (Kerstens-Hilderson et al., Enzyme M. Techn. 9, 1987, 145), в 50 mM триетаноламин, рН 7,5, 10 mM MgSO₄ и 0,1 М ксилоза, в присъствието на $\pm 2 \times 10^{-4}$ М Д-сорбитол дехидрогеназа (L-идитол: NAD оксидоредуктаза, E.C 1.1.1.14), и 0,15 nM NADH, като освен това инкубационният буфер включва също 1 mM етиленбис/оксиетиленилнитрило/тетраацетат (EDTA). Крайната концентрация на глюкозоизомеразата в тази проба е $\pm 2,5 \times 10^{-3}$ мг/мл и е точно определена както е описано.

С глюкоза като субстрат GI активността може да бъде изпитана чрез измерване на Д-фруктозата, продуцирана по време на изомеразната реакция, като се използва цистеинкарбазолният метод (CCM), основаващ се на реакцията на кетозахарите с карбазол в киселини за получаване на пурпурен продукт (Dische and Boreufreund, 1951).

Пример 2. Кинетика на температурната инактивация на ECoAmi (DSM) GI

Експериментите относно кинетиката на температурната инактивация се осъществяват

върху свободна от метал глюкоизомераза с добавки, специфични за всеки отделен случай. Пречистеният ензим се еквilibрира в описания буфер и разтворът се изтегля в Хамилтонов газонепроницаем шприц с тefлонова игла, която предварително е държана в стъклена мантия, свързана с водна баня (Lauda, RM6) при посочената температура. Предишни експерименти са показали, че температурната еквilibрация на ензимния разтвор от 25 до 85°C е достигната за по-малко от една минута. В подходящо време количествата се въвеждат в епруветки на Епендорф и процесът на температурна денатурация се потиска чрез охлаждане на пробите до 0°C.

В противовес на това големи проби се инкубират като индивидуални количества в Reacti - Vlais (Pierce).

1. Температурна и метална зависимости.

Кинетиката на инактивация чрез загряване на EсоAmi (DSM) GI в 50 mM /3-/N-морфолино/-пропансулфонова киселина/ (MOPS), pH 7,2 при 25°C / $pK_a = 7,15$ при 25°C; $\alpha_H / ^\circ C = -0,001/$, като функция на температурата е илюстрирано на фиг.1 (без добавяне на метал), и на фиг.2 (+10 mM MgSO₄) и фиг.3 (+10 mM CoCl₂). Всички точки от данните забележително добре посват на теоретичната крива, кореспондираща на първичния процес, независимо от прилаганата температура и от присъствието или природата на металните йони. Данните също демонстрират стабилизационния ефект на магнезиевите и дори на кобалтовите йони.

Ензимната инактивация чрез топлина е необратима, и съответно, загряването индуцира протеинова агрегация. В присъствието на Mg²⁺ се установи, че загубата на ензимна активност много добре корелира с нарастването на преципитацията на протеина.

Фиг.4 сумира данните от фиг. 1,2 и 3 и показва, че в използваните температурни интервали участъкът на Арениус е линеарен, независимо дали има или няма метали.

Тези резултати показват, че термичната денатурация на EсоAmi (DSM) GI се поражда от единично събитие при всички изпитани условия. Не е известно дали същата лимитираща стъпка се преодолява в присъствие или в отсъствие на метали, но линеарността на участъкът на Арениус потвърждава схващането, че тази стъпка е уникална при специфичните ек-

спериментални условия.

2. pH и зависимост от йонната сила.

Афинитетът на GI стабилизиращите метали е в силна зависимост от pH, в частност влиянието се изразява в значително намаляване под pH 6. Поради това влиянието на pH върху термостабилността на EсоAmi (DSM) GI се изследва, като се използват свободни от метал ензими в отсъствие на допълнително добавяни метали.

В pH интервала от 4,7 до 8,3 инактивацията на EсоAmi (DSM) GI при 72°C винаги следва първичната кинетика. Фиг.5 показва, че константата на инактивация K_d остава практически неизменна между pH 5,5 и 6,7, но се увеличава на всяка страна от този pH интервал.

Фиг.6 демонстрира, че кинетиката на топлинна инактивация на ензима при отсъствие на добавен метал е увеличена като функция на йонната сила. Това и данните за pH зависимостта силно индикират, че полярните остатъци са включени в термичната стабилност на EсоAmi (DSM) GI.

Това условие е основано по-нататък на данните от фиг.7, където е показано, че умереното увеличение на pH (т.е. 6,7 до 7,6 при 72°C) забележително усилва дестабилизиращия ефект на натриевия хлорид.

3. Ефекти на уреята и цианата.

GI е тетрамер, направен от четири идентични субединици (F. Rey et. al., *ibid.*).

Влиянието на уреята и цианата се изследва в опит за идентифициране структурните изменения, които могат да се изброят за загубата на ензимна активност като резултат от нагряване, т.е. дисоциацията на субединиците и/или разгъването.

Състоянието на олигомеризация на ензима се анализира чрез високоточностна хроматография (SEC - HPLC) върху Супероза-12 при стайна температура, като се използва елюционен буфер, съдържащ 50 mM Трис/HCl, pH 8,0 при температура 25°C и 150 mM NaCl, следвайки пролонгирана инкубация на ензима в 7M урея при стайна температура.

Нативният GI е показан да елюира като тетрамер на SEC-HPLC.

Фиг.8 показва, че пролонгираната инкубация на урея е необходима да индуцира дисоциацията на нативния EсоAmi (DSM) GI тетрамер в димери.

Докато за цианата е известно, че е получен от урея в разтвор, спекулираше се с това, че химичната модификация на ензима с цианат би могла да бъде подходяща за наблюдаване на дисоциация на субединиците.

За изпитване на тази хипотеза ензимът се инкубира за 16 до 24 дни при стайна температура в 0,2 М борат, рН 8,5 и 150 мМ NaCl, съдържащ концентрация на цианат в интервала от 0 до 200 мМ и този в отсъствие или присъствие на прясно приготвен 5,0 М цианат, свободен от урея (прясно приготвеният разтвор на 10 М урея в Мили-Q вода се прекарва през колона от AC 501-X8 /Д/ смола /Bio-Rad/ съгласно препоръките на производителя. Това третиране елиминира йонните контаминанти между които цианат).

Направени са следните наблюдения:

1. Третирането с цианат (единствено) не променя елюционният профил на EсoAmi (DSM) GI върху SEC-HPLC (фиг. 9а). Нативният PAGE изяснява зависимостта на химическата модификация на ензима от дозата като очевидна от увеличението на негативния заряд (фиг. 9В, горната ивица), но без очевидна загуба на ензимна активност, както е показано чрез TTC-оцветяване на гела (фиг. 9В, долната ивица).

След 16 дни от инкубацията на EсoAmi (DSM) GI в 5,0 М цианат, свободен от урея, не се изясняват димерни формации чрез SEC-HPLC (фиг.10А). Някои димер-димерни дисоциации обаче са наблюдавани след нативна PAGE (фиг.10В, горната ивица, 0 мМ NaCNO), като се предполага, че при използваната концентрация на урея, 5 молно генерирал цианат, който е индуцирал малка химическа модификация, която същевременно индиректно води до тетрамерна дисоциация, отслабена, димерната асоциация може да доведе по-нататък под влияние на електричното поле, приложено по време на PAGE, до едно удължаване на дисоциацията.

3. Едновременното добавяне на цианат към EсoAmi (DSM) GI в 5,0, доведена с лекота от тетрамер до димерна дисоциация в концентрационно зависима форма. Това е демонстрирано едновременно със SEC-HPLC данни (фиг.10) и с нативна PAGE (фиг.10В, горна ивица). Задържането в PAGE на димера след инкубация при висока концентрация на цианат е с цел да резултира от едно увеличава-

що се разгъване на ензима при тези условия. Върху нативна PAGE димерите не показват GI активност след TTC-оцветяване (фиг.10В, долната ивица). Това предполага, че ензимната активност е загубена при GI-тетрамерната дисоциация в димери и/или вследствие на химичната модификация.

В заключение, присъствието на цианата и на уреята се препоръчва за изследване на EсoAmi (DSM) GI тетрамерната дисоциация в димери. Докато цианата самостоятелно е неефективен, химически модифицираните аминокиселини, включени в стабилизацията на тетрамерната структура на ензима, са недостъпни за разтворители в отсъствие на урея. Вероятно уреята дестабилизира димер/димерното взаимодействие като чрез това се излагат аминокиселините предварително вътре в димер/димерните интерфази. Тези остатъци, носещи едновременно алфа и/или епсилон аминокиселини, по този начин стават подходящи за карбонизация с цианат. Обратно, ковалентно прикачените от цианата за интересубединиците контактни остатъци стабилизират димерните форми на ензима. Поради това може да се преположи, че дисоциацията на EсoAmi (DSM) GI тетрамерите в димери е може би едно от главните събития при термоденатурацията. В потвърждение на тази хипотеза може да се наблюдава, че висока концентрация на протеин стабилизира ензима срещу термична денатурация (данни не са показани).

4. Гликация.

Показано е, че протеините са подложени на гликация, т.е. неензимна модификация на алфа и епсилон-аминогрупи чрез гликоза на няколко други захари. Предполагано беше, че при условията на приложение (висока концентрация на глюкоза, рН 7,5 и пролонгирано използване) гликацията на EсoAmi (DSM) GI трябва да се появи, в частност, ако EсoAmi (DSM) GI тетрамерната дисоциация в димери се осъществи при висока температура, предвижда се същите аминокиселинни остатъци, реагиращи с цианат в присъствието на урея, да бъдат гликирани с контаминанти от дисоциираните тетрамер-димери при вероятна загуба на каталитична активност.

Свободният от метал EсoAmi (DSM) GI се инкубира в отсъствието на Магнезиум при 60°C без или с Д-глюкоза (250 мМ) в 50 мМ MOP, рН 7,7 при 60°C. В подходящо време

количествата се изтеглят, охлажда се до 25°C и се тестват за остатъчна ензимна активност чрез директна ксилулозна абсорбция при 278 nm.

Фиг.11, ивица А, показва, че присъствието на глюкоза забележимо увеличава степента на термичната инактивация на ензима при 60°C. Този ефект е необратим при широка промяна на буфера срещу 50 mM ME, pH 6,0, при 4°C, и не може да възстанови каталитичната ефективност на EcoAmI (DSM) GI (триъгълниците на фиг.11, ивица А). Освен това, анализът на реакционните продукти с SEC-HPLC ясно показва, че както бе предположено, гликацията се съпровожда от тетрамер до димердисоциация, зависеща от времето (фиг.11, ивици С и В), факт, потвърждаващ схващането, че тетрамерните разединявания стават при висока температура. Дисоциираните димери са уловени от ковалентна модификация с глюкоза от реактивните аминогрупи, съжителстващи в интердимерни контакти.

Фиг.11, ивица Д, показва, че нагряването също предизвиква формиране на протеинови агрегати, които имат големината на хексадекамера на EcoAmI (DSM) GI (± 700 килодалтона, т.е. четири GI тетрамерни молекули). Тези агрегати особено се увеличават в присъствие на глюкоза. Не е известно как и дали агрегационните формации се появяват в зависимост от или само съгласувано с GI дисоциацията в димери.

Сходни резултати могат да се получат в различни буферни системи, 12,5 mM натриев фосфат, pH 7,7 при температура 60°C.

Присъствието на урея е необходимо цианатът да продуцира стабилни GI димери тогава, когато глюкозата проявява същите свойства при висока температура в отсъствие на урея. Ето защо може да се заключи, че и двата случая - урея и нагряване, причиняват дисоциация на EcoAmI (DSM) GI тетрамерите в димери, чрез което се изявяват аминокиселинните остатъци, локализиращи в интердимерното пространство между тях преди недостъпните аминогрупи стават подходящи да реагират с цианат или глюкоза, като по този начин улавят ензима в димерно състояние.

Пример 3. Идентификация на лизиновите остатъци в пространствата между субединиците на глюкозоизомерата от *Actinoplanes missouriensis*.

GI е тетрамер, състоящ се от четири

идентични субединици (А, В, С и D) (Rey et al., *ibid*), които могат да бъдат изявени като комбинация от два димера (AB и CD). Така може да се определят две категории от интерфазни пространства между субединиците - интерфази между мономерите вътре в димера (интрадимерна интерфаза) и интерфазата между два димера (интердимерна интерфаза).

Счита се, че остатъкът взема участие в контактите с интерфазното пространство между субединиците, ако неговата достъпна област от повърхността (ASA_s) (B. Lee and F. Richards, *J. Mol. Biol.* 55/1971/ 379), предназначена в изолираната субединица, се различава от тези, определени в олигомера. Таблица 2 сумира ASA_s за двадесетте субединици с лизинови остатъци в изолиран мономер и в GI тетрамера.

Таблица 2

К	ASA_T	ASA_T	A_b
10	65,4	65,4	0,0
42	52,6	52,6	0,0
76	77,1	77,1	0,0
100	142,4	142,4	0,0
100	150,0	0,8	149,2
118	17,9	6,8	11,1
132	147,4	147,4	0,0
149	8,0	0,1	7,9
239	167,0	167,0	0,0
240	19,2	18,1	1,1
253	111,5	1,5	110,0
294	51,5	28,7	22,8
309	93,2	93,2	0,0
319	30,0	30,0	0,0
323	83,0	83,0	0,0
339	78,0	50,3	27,7
344	178,1	125,8	52,3
375	132,0	119,2	12,8
381	114,2	67,7	46,5

Наблюдавано е, че единадесет от тези остатъци взимат участие в интерфазните пространства между субединиците. Само LYS-100 и LYS-253 загиват в екстензивна област (149 Å² и 110 Å², респективно) в интерфазните субединици и загиват напълно в тетрамера, т.е. и двата остатъка имат ниска способност за

разтваряне в тетрамера. Нито един остатък обаче не е причастен в каталитичната активност на EcoAmi (DSM) GI. По-нататък LYS-100 и LYS-253 са включени в електростатично взаимодействие в интерфазните субединици. LYS-100 в S-субединица (A-LYS-100) се стабилизира чрез водородно свързване на последното обръщане на малка близка позиция 373 в B-субединицата. LYS-253 в A-субединицата (A-LYS-252), от друга страна, е включена в йонен интердимерно взаимодействие с ASP-190 от C-субединицата. Като се използва модела за строителна техника (както са описани в P. Delhaise et al., J. Mol. Graph. 3, 1984, 116), се изследва, че обкръжението от LYS-100 не е с цел да подпомогне заместването на ARG, където мутацията на LYS-253 до ARG би била възможна, т.к. не се проявиха лоши физични контакти и йонните взаимодействия с ASP-190 остават благоприятни.

Друг лизинов остатък K294, е локализиран при димер-димерната интерфаза, но е само частично елиминиран в тетрамера (достъпна повърхностна област 22,8 Å²). Този остатък стриктно е запазен във всички глюкозоизомеразата на Actinomyces (вж. пример 10 и фиг. 21), при това K294 взаимодейства само с N247 и D257 - и двата включени в метална връзка. K294 по този начин ще въздейства на стабилността на глюкозоизомеразата по различни механизми.

Пример 4. Аминокиселинни замествания на специфични лизинови остатъци в глюкозоизомеразата от Actinoplanes missouriensis.

Съгласно изобретението заместването на LYS-253 с аргинин би стабилизирано електростатичното взаимодействие през димер-димерната интерфаза и поради това би увеличило стабилността на EcoAmi (DSM) GI срещу термично въздействие. Нещо повече, това заместване би предотвратило химичната модификация (чрез глюкозоцианат) в позиция 253.

За да се оцени важноста на електростатичното взаимодействие на A-LYS-253/C-ASP-190 йонни двойки в термична стабилност на EcoAmi (DSM) GI, LYS-253 се променя в глутамин, за да елиминира йонният характер на лизиновата част от веригата, като тази мутация съществува в други отношения умерено стабилно.

Сайт-насочената мутагенеза е представена съгласно метода на пропуснатите дуп-

лекси ДНК (gdDNA), като се използват pMa5-8 и pMc5-8 като плазмидни вектори (P. Stanssens et al., ibid.). Докато методиката за мутагенезата препоръчва използването на уникални рестрикционни сайтове нагоре и надолу от областта да се подлагат на мутагенеза, сега се въвеждат два допълнителни слепващи сайта в GI кодиращата последователност без противопоставяне на кодираната аминокиселинна последователност. Сайтът KpnI е създаден чрез изменение на нуклеотидните бази от G при позиция 177 в A, като се използва следният олигонуклеотиден праймер:

15 5'-CGAAGGGTACCAGG-3'

Сайтът XhoI е създаден чрез заместване на C за G при позиция 825, като се използва следният олигонуклеотиден праймер:

20 5'-GCCGTTCTCGAGGAGGTCG-3'

Конверсията на GTG в ATG кодон (вж. пример 1) и създаването на KpnI сайта се завършва в единичен мутагенезисен експеримент, в който релевантните ензимно фосфорилирани олигонуклеотиди се ренатурират в gdДНК, получена от едноверижния pMc5-GI и дългия BamHI-AatII фрагмент от pMa5-GI.

30 XhoI сайтът е въведен чрез отделен експеримент. Използваната gdДНК е конструирана от едноверижните pMc5-GI и дългия SacI-SmaI фрагменти на pMa5-GI. Трите мутации са комбинирани в единичен ген чрез съчетаване на подходящи фрагменти от дубълмутанта и XhoI мутанта. Резултантният утроден мутант е обозначен като pMa-I. Комплементарният pMc5-I е конструиран чрез инсерция на малкия EcoRI-XbaI фрагмент от pMa5-I, съдържащ P_r-GI хибридният ген, между EcoRI и XbaI сайтове на pMc5-8.

45 pMa5-I и pMc5-I са базични вектори, използвани за продуциране на двата вида глюкозоизомеразата - дивият и GI. Във всички сайт-насочени мутационни експерименти, описани по-нататък, са използвани gdДНК, създадени от едноверижната форма pMa5-I и подходящ фрагмент на pMc5-I.

50 1. Лизин - 253 → глутамин

За конструиране на gdДНК са използвани големият SacI-XhoI фрагмент на pMc5-I и олигонуклеотидният праймер

5'-CCTGGTCTGAACTGCGGGCCG-3'.

Мутантният ензим се експресираща добре; специфичната активност, като се използва ксилозата като субстрат, е 96% спрямо дивия тип *EcoAmi* (DSM) GI (таблица 3).

Температурната инактивация при 72°C в 50 mM MOPS, pH 7,4 при 72°C, в отсъствието на метал, свързана предимно с кинетиката, показва, че мутацията, провокира увеличаване на константата за денатурация от 1,4.10⁻² мин⁻¹ за дивия тип за K253Q (фиг.12, ивица А). В присъствието на 10 mM MgSO₄ при 85°C в 50 mM MOPS, pH 6,5 при 85°C (фиг.12, ивица В) преди всичко константата на разпадане има стойност от 1,2 мин⁻¹ за K253Q, около 350 пъти повече от дивия тип ензим ($K_d = 3,4 \cdot 10^{-3} / \text{мин}^{-1}$).

Анализът на олигомерната структура на K253Q ензима чрез хроматография показва интактен тетрамер. Пролонгираната инкубация в 5 молна, свободна от цианат, урея в 0,2 M борат, pH 8,5, 0,15 M NaCl обаче демонстрира, че K253Q мутантът охотно се дисоциира в димери както на фиг.13, ивица А и фиг.13, ивица В, сумиращи данните, показващи прогресиращата крива за димерна формация за дивия и мутантният тип ензими. Данните показват дисоциацията на тетрамерите в димери в мутантния ензим, но не и за дивия тип ензим.

Описаните експерименти демонстрират структурната основа на стабилността на *EcoAmi* (DSM) GI молекулата. Специфичното противопоставяне на остатъка K253 на глутамин показва температурната чувствителност, а така също и чувствителността към урейна мутация, и последователно идентифицира локуса на важните (есенциални) взаимодействия. Установена е пълна корелация между чувствителността на мутанта към температурна инактивация и размера на тетрамерната дисоциация в димери, получена с урея при стайна температура.

2. Лизин \longrightarrow аргинин

За конструиране на *gd*ДНК големият *SacI*-*XhoI* фрагмент на *pMc5-I* се съчетава със следния олигонуклеотиден праймер:

5'-CCTGGTCTGAAACCGCGGGCCG-3'.

Мутантът на *EcoAmi* (DSM) GI, K253R, се експресираща добре и показва ензимна активност 120% спрямо дивия тип при ксилоза за

субстрат (табл.3).

Термостабилността на този мутант се тества в 50 mM /N-2-хидроксиетилпиперазин-N'-2-етансулфонова киселина/ EPP, pH 7,5, 5 mM MgSO₄, в температурен интервал от 82 до 92°C. Таблица 4 показва времето за редуциране на ензимната активност до 50% за K253R и дивия тип ензими. Резултатите показват, че над този температурен интервал K253R е по-стабилен от дивия тип ензим.

За оценка на стабилността на мутанта K253R по отношение инактивацията на глюкоза при висока температура двата ензима се инкубират в присъствието на 250 mM Д-глюкоза при 60°C в 12,5 mM Na-фосфатен буфер, pH 7,7. Времето за инактивация, показано на фиг.14, е около 70 часа. Данните ясно демонстрират повишената протективност срещу инактивационната необратима химична модификация, постигната в K253 мутанта.

Като негативен контрол LYS-100 бе изменен в аргинин, като в този случай се очакваше, както е отбелязано, лошото акомодиране на остатъка да намалява стабилността, но без да въздейства на активността.

3. Лизин-100 \longrightarrow аргинин

За конструиране на *gd*ДНК са използвани големият *KpnI*-*AatII* фрагмент от *pMc5-I* и олигонуклеотидният праймер

5'-CCGCCGTCCCGGAACACCGG-3'.

Специфичната активност на K100R GI е 22 единици за мг, като се използва ксилоза за субстрат. Това е сравнимо с активността на дивия тип *EcoAmi* (DSM) GI (24,5 единици за мг). Температурната инактивация на този мутантен ензим преминава около 100 пъти по-бързо с $K_d = 0,3 \text{ мин}^{-1}$, в 50 mM EPPS, pH 7,5 при 84°C, 5 mM MgSO₄.

4. Лизин-294 \longrightarrow аргинин

За конструиране на *gd*ДНК са използвани големият *XhoI*-*SmaI* фрагмент от *pMc5-I* и олигонуклеотидният праймер

5'-GGGACGGCCGGTACTCGAAG-3'.

Мутантът на *EcoAmi* (DSM) GI, K294R, добре се експресираща и показва ензимна активност, която е 85% от тази на дивия тип с ксилоза за субстрат (табл.3).

Термостабилността на този мутант се тества в 50 mM /N-2-хидроксиетилпиперазин-N'-2-етаносулфонова киселина/ (EPPS), pH 7,5, 5 mM MgSO₄, в температурен интер-

вал от 82 до 92°C. Времето за редуциране на ензимната активност на 50% е изложена на табл.4. Резултатите посочват, че над този температурен интервал K294R има приблизително същата стабилност както дивия тип ензим.

Таблица 3

Каталитични параметри на дивия тип (WT) и мутантния EсоAmi (DSM) GI с всяка D-ксилоза (двойна проба) или D-глюкоза като субстрати

S_{pa} = специфична активност в микромолове от продукта (D-ксилоза или D-фруктоза) за минута/единица, за милиграм от ензима
 V_{max} е изразено в единици за мг от ензима
 K_m е константата на Михаелис, изразена в mM
 НД = не е определена

	Ксилоза			Глюкоза	
	S_{pa}	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m
WT-GI	24,5	24,2	4,8	34,8	290
K ₂₅₃ R	30,0	24,6	5,3	27,2	177
K ₂₅₃ O	23,0	15,1	4,4	29,2	210
K ₁₀₀ R	22,2	НД	НД	НД	НД
K ₂₉₄ R	20,5	13,8	4,5	25,8	187
G ₇₀ S; A ₇₃ S; G ₇₄ T	28,0	24,9	5,3	39,2	235

Таблица 4

Инактивация на дивия тип и конструираните мутанти глюкозоизомераза в 50 mM EPPS, pH 7,5 при 84°C, 5 mM MgSO₄

Температура 0°C	82	84	86	88	90	92
WT-GI	11,85	3,80	1,07	0,25	0,080	0,032
K ₂₅₃ R	17,65	4,17	1,11	0,32	0,094	0,037
K ₂₉₄ R	9,39	1,57	0,43	0,14	0,056	НД
G ₇₀ S; A ₇₃ S; G ₇₄ T	22,88	4,83	1,21	0,31	0,093	0,032

Пример 5. Стабилизация на глюкозоизомераза чрез мутация вътре в мономера I.

Въпреки че мутациите, които могат да подобрят стабилността на мономерната субединица, с оглед на пример 2 не са особено подходящи да предизвикат тетрамерна стабилност на глюкозоизомеразата, са осъществени някои мутации в тази насока. Три остатъка от спиралата В на 8-верижния β -ствол на глюкозоизомеразния мономер се подлагат на мутация с цел да се стабилизира тази α -спирала и индиректно да се стабилизира мономерът. Глицин 70 се изменя в Серин, Аланин 73 се изменя в Серин и Глицин 74 - в Треонин.

За конструиране на gdДНК големият KpI-AatN фрагмент от pMc5-I се комбинира със следния олигонуклеотиден праймер

5-GCCTTCTTGAAGGTCGGATGATGGAGTCGCGG-3

EcoAmi (DSM) G1-мутантът, G₇₀; A₇₃; G₇₄T добре се експресира и неговата специфична активност става 28 единици за мг (115% от дивия тип) с ксилоза като субстрат (табл.3).

Термостабилността на този мутант се тества в 50 mM /N-2-хидроксиетилпиперазин-N-2-етансулфонова киселина/ EPPS, рН 7,5, 5 mM MgSO₄, при температурен интервал от 82 до 92°C. Времето за редуциране на ензимната активност до 50% за G₇₀; A₇₃S; G₇₄T са изброени на таблица 4. Резултатите показват, че над тази температура и при използваните условия G₇₀; A₇₃S; C₇₄T са по-стабилни от дивия тип ензим и от мутанта K₂₅₃R.

Пример 6. Получаване и пречистване на дивия и мутантния тип глюкозоизомераза от *A. missouriensis* за тестване.

За получаване на глюкозоизомераза от *A. missouriensis* чрез използване на *E.coli* се използва експресионна единица от pMa вектор.

Трансформантите на глюкозоизомеразно дефицитен щам на *E.coli* (thl, thr, Leu, tonA, LacY, supE, хуLA, r_k m_k⁺), даващи убежище на глюкозоизомеразния ген от *A. missouriensis*, кодиращ дивия тип протеин или описания мутантен протеин, се култивират на среда, съдържаща дрождев екстракт (4 g/l), NaCl (10 g/l), Васто триптон (40 g/l), казамино киселини (4 g/l) и ампицилин (100 мг/l), за 16 часа при 37°C. След центрофугиране клетките се ресуспендират в минимален обем буфер, състоящ се от 20 mM Трис, 10 mM ЕДТА, 50 mM глюкоза,

рН 8,0. След това се добавя лизозим до крайна концентрация от 1,5 g/l. След инкубация при 37°C за 30 мин суспензията се загрява до 70°C за 30 мин. Суспензията се охлажда до стайна температура и се добавят MgCl₂ и DNaseI до крайна концентрация 20 mM и 1,5 мг/l, респективно, и се инкубира при 37°C още 30 минути. Клетъчните дебри се преципитират чрез центрофугиране и супернатантата се диализира срещу 50 mM Трис (рН 7,5) за една нощ.

Пример 7. Имобилизация на дивия и мутантния тип глюкозоизомеразни.

Ензимният разтвор може да се имобилизира върху йонно изменена смола. Преди всеки експеримент йонизираната смола се регенерира с 0,5 NaCl (> 10 обема), вода (до рН 8), 10% разтвор на NaCl (10 обема) и вода (20 обема). Смолите Lewatit MP₅₀₀A (Bayer) и Amberlite IPA 904 (Pohm & Haas) се избират за глюкозоизомеразна имобилизация. Адсорбцията на ензима върху тази йонно изменена смола протича с висока ефективност. Има линейна зависимост между адсорбираното количество ензим и активността на използваната колона.

10 g от анионната смола (Cl⁻ форма) се поставя в 50 мл буфер (50 mM Трис HCl рН 7,5). Пречистената глюкозоизомераза се добавя и се оставя за свързване за една нощ при 4°C при тотален обем от 100 мл с 50 mM Трис.HCl буфер (рН 7,5).

Пример 8. Тестуване за използване на дивия и мутантния тип глюкозоизомераза.

Началната активност и стабилността на имобилизираната глюкозоизомераза и нейните мутанти са определени чрез измерване на степента на изкачване при 45% конверсия като функция от времето съгласно P.Van Tilburg (Thesis. Engineering aspects Biocatalysts in Industrial Starch Conversion Technology, Delftse Universitaire Pers, 1983). От това K₀ и k_d могат да бъдат калкулирани. K₀ - псевдо-първична реактивна константа е мярка за ензимна активност. k_d - константа на първичното разлагане, е мярка за стабилността на ензима. Калкулацията на k₀ е описана само за желатин-имобилизирана глюкозоизомераза. Експерименталните условия са следните: температура 70°C; реактор - дълбочинен тип; субстрат - 3M глюкоза, 3 mM MgSO₄, 3 mM Na₂SO₃; конверсия - 45% фруктоза; рН 7,5 (измерена

при 35°C); Ca : ≤ 3 ppm. Резултатите за k_d са показани на табл.5.

Таблица 5

Константи на разлагане за дивия и мутантния тип глюкозоизомераза, имобилизирани върху различни смоли

	$K_0 / \times 10^6 \text{ sec}^{-1} / K_0 / \times 10^6 \text{ sec}^{-1} /$ Lewatit	$K_0 / \times 10^6 \text{ sec}^{-1} / K_0 / \times 10^6 \text{ sec}^{-1} /$ Amberlit
Див тип	2,7	2,4
$K_{253}R$	1,0	0,7
$K_{294}R$	2,8	2,9
$K_{253}Q$	п.о.	3,7
$/G_{70}S; A_{73}S; G_{74}T/$	2,0	2,1

И дивият и мутантният тип ензими са получени, имобилизирани и пречистени съгласно примери 6 и 7.

От таблица 5 се разбира, че и двата мутанта $K_{253}R$ и $C_{70}; A_{73}; C_{74}T$ имат аналогична увеличена стабилност при изпитване на 70°C. Тези резултати могат да се приведат с голяма степен на точност към резултатите, които ще бъдат получени, ако тестовете се провеждат при температура, обичайни за индустрията (R. Van Tilburg, *ibid.*).

Слабото представяне на мутант $K_{253}O$ е индикация за важността на базичните остатъци при позиция 253, както вече е установено в *in vitro* експеримента от пример 4. Глутаминовият мутант по всяка вероятност не формира никаква хидровръзка, поради което се дестабилизира димер-димерният контакт.

Аналогично, $K_{294}R$ мутантът има малко по-ниска стабилност от дивия тип ензим в съгласие с резултатите, получени в експериментите *in vitro*.

Резултатите показват, че увеличаване на димер-димерния интерфазен контакт в глюкозоизомеразата може да резултира в един ензим със супериорно поведение при индустриално приложение. Става ясно, че други остатъци, включени в интерфазните контакти, могат да се селектират от всеки специалист. Остатъците, които са чувствителни на химична модификация или не показват оптимално

хидрогенно свързване, могат да се заместят с други аминокиселини съгласно изобретението.

Мутациите, които са получени чрез стабилизиране на мономерните субединици, също показват позитивен ефект на тетрамерната стабилизация, както свидетелства k_d , наблюдавано за мутанта $G_{70}S; A_{73}S; G_{74}T$.

Ако се направи опит да се рационализира този резултат, това би се осъществило

- 10 чрез заместване на глициновите остатъци в една α -спирала, което може да резултира в увеличаване на ентропията на включеното състояние на протеина, поради което протеинът става по-резистентен на деспирализиране и денатурация (Proteins 1, /1986/ 43-46). За да стане това, чувствителността на глюкозоизомеразата към химична модификация (и поради това необратимо модифициран) на (частично) деспирализирания протеин би трябвало да е значително понижен, резултирайки в един термостабилен ензим. В противоположност на това, мутациите, внедрени в мутантите $G_{70}S; A_{73}S; G_{74}T$, са по-хидрофилни по природа и поради това облагодетелстван от незащитената повърхност на спирала В. Това може също да доведе до повишаване стабилността на мономера срещу обратимо деспирализиране. Както се твърдеше по-рано, това може да понижи чувствителността на тетрамерния протеин срещу необратима денатурация.

- 30 Тези мутации могат да се представят по сходен начин във всички α -спирали на глюкозоизомеразата. Спиралните области, както са определени от ЗД структурата на *A. missouriensis*-ната глюкозоизомераза (F. Pey et al., *ibid.*), са при позиции: α 1 35-47, α 2 64-80, α 3 108-128, α 4 150-173, α 5 195-206, α 6 227-239, α 7 264-276, α 8 300-328. Заместването на глициновите остатъци, представянето на хидрофобните остатъци и представянето на Пролиновите остатъци на аминокрая на една спирала може да се види.

- 45 Конструирани мутации $K_{253}R$ и $G_{70}S; A_{73}S; G_{74}T$ повишават термичната стабилност спрямо дивия тип глюкозоизомераза. Обаче мутантът $K_{253}R$ проявява по-голяма активност от мутанта $G_{70}S; A_{73}S; G_{74}T$ в теста за изпитване, в противовес на резултатите от *in vitro* експериментите, описани в пример 4. Това може да се види като рефлектиращо върху факта, че резултатите, получени при лабораторни условия, са само потвърждение за пред-

ставянето на ензима в условията на приложение. Вероятно високата глюкозна концентрация, използвана при условия на приложение и процеса на гликация, които зависят от глюкозната концентрация, са решаващи за този феномен.

Пример 9. Свойства на мутантната глюкозоизомераза при различни рН стойности.

Сравнителните тестове се провеждат с мутанта K₂₅₃R и WT *A. missouriensis*-на глюкозоизомераза при различни стойности на рН. Получените от K₂₅₃R и WT ензими се имобилизират върху Lewatit както в пример 7 и се подлагат на изомеризационен тест както в пример 8. Условията са като от R. Van Tilburg (ibid) с глюкозен сироп при различни варианти на рН. Фиг.18 показва k_d степените от двата ензима като функция на рН. Може да се види, че мутантът K₂₅₃R проявява увеличение на k_d при рН под 7,5 до рН 5,8. Измерванията се осъществяват най-малко два пъти. Мутантът K₂₅₃R показва не само супериорно поведение в индустриални условия при по-висока температура (по-висока степен на конверсия), но и при по-ниско рН (по-добра стабилност на продуцираната фруктоза).

Пример 10. Клониране и подреждане на последователността на глюкозоизомеразните гени от други бактериални щамове.

За да се получи информация за аминокиселинната последователност от различни бактерии, гените, кодиращи глюкозоизомераза, се изолират от хромозоми на респективни бактериални молекули клонирани в *E.coli*.

Следните бактерии, някои от които са известни като продуценти на индустриално приложими ензими, се селектират за тази цел:

- *Arthrobacter species*
- *Streptomyces violaceoruber* LMG 7183
- *Streptomyces thermovulgaris* DSM 40444
- *Streptomyces murinus* DSM 40091
- *Ampullariella species* ATCC 31351

Хромозомната ДНК за всички видове, които са отбелязани, са изолирани и пречистени както е описано от Horwood (ibid).

За *Arthrobacter*, *S.violaceoruber* и *Ampullariella*, частично усвоени с рестрикционни ендонуклеази Sau3AI и клонираните резултатни фрагменти в *E.coli*, са представени точно както е описано за *A.missouriensis* в пример 1. Хромозомната ДНК от *Str. murinus* и *S.ther-*

movulgaris е усвоена напълно с PstI, последвано от свързване в pECOR₂₅₁ както в пример 1.

Колониите, съдържащи този глюкозоизомеразен ген, се проверяват чрез колонийна хибридизация, като се използва 712 в MluI рестрикционен фрагмент от *A.missouriensis* глюкозоизомеразен ген или 853 в рестрикционен фрагмент, локализиран вътре в *Str.violaceoruber* глюкозоизомеразен ген.

Рекомбинантните плаزمиди, съдържащи глюкозоизомеразни гени от различни бактерии, след това се охарактеризират чрез рестрикционно картиране както е описано за глюкозоизомеразния ген от *A.missouriensis*. Анализът на нуклеотидната последователност на протеинкодиращия регион е представен чрез химичен метод, създаден от Махат и Gilbert (ibid).

Клоновете, съдържащи гена на глюкозоизомеразата от *Str. thermovulgaris*, не е установена - установена е само кодиращата последователност до аминокиселина 346 (еквивалентна на позиция 351 от глюкозоизомеразния ген на *A. missouriensis*).

Аминокиселинната последователност от *Ampullariella sp.* глюкозоизомераза се различава от публикуваната последователност по това, че е установено, че пролин 177 от публикуваната последователност е аргинин.

Резултатите от този пример са сумирани на фиг.21 и аминокиселинните последователности, получени от установените нуклеотидни последователности, са построени така, че да покажат максимално общата хомология.

Пример 11. Експресия и мутагенезис на глюкозоизомераза от *Ampullariella*.

За експресия на глюкозоизомераза от *Ampullariella sp.* в *E.coli* са използвани експресионни единици, доказано подходящи за глюкозоизомераза от *A.missouriensis*. Фактически експресионният вектор на *A.missouriensis* се изменя, като се използват рестрикционни фрагменти от *Ampullariella sp.* глюкозоизомеразен ген, покриващ целия нуклеотид и проявяващ аминокиселинни различия в кодиращите региони на два гена - дуплексната молекула е формирана с участието на еднове-рижна ДНК от pMa-I и 4107 в фрагмент BstEII/NcoI от pMc-I, от 124 в BstEII/ApaLI фрагмента и 1059 в ApaLI/BssHII фрагмент, като последните два фрагмента са получени

от *Ampullariella* sp. глюкоизомеразен ген. Процесът протича както в пример 1, като се включва възстановената нуклеотидна последователност, детерминираща гена за проверка с цел нежелани включвания. Така е намерен

верният плазмид и е наречен рMc-GIamp1. Сравняването на аминокиселинните последователности показва, че *Ampullariella* глюкоизомеразата както и *A. missouriensis* глюкоизомеразата съдържа лизинов остатък при еднакви позиции 253. Поради това мутантната *Ampullariella* глюкоизомеразата, където лизин /K/ при позиция 253 се заменя с аргинин /R/, се генерира, като се използва дуплексната молекула, формирана от присъединяването на

едноверижната рMc-GIamp1 ДНК с BamHI/HindIII усвоена рMa-GIamp1 и фосфорилиран мутагенетичен олигонуклеотид

5-AGGTCCTGGTCCAACCGCGGGCCGTGCTGG-3' Процесът след присъединяване, т.е. селекция и анализ на получения мутант, е представен точно както в пример 1.

Пример 12. Експресия и сайт-насочена мутагенезис на глюкоизомеразата от *Str. murinus*.

Експресията на глюкоизомеразния ген от *Str. murinus* се постига чрез поставяне на гена надолу в Tac-промотора на плаزمида рMaT5. рMaT5 се получава от плазмида рMa5P₂, в който ламбда-промоторът е заместен от регулаторен Tac-промотор (H. de Boer Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60 /1983/, 21). Структурата на този експресионен вектор е показана на фиг.15a/c.

Рестрикционният фрагмент 1280 вр BstXI/MluI, съдържащ пълния *Streptomyces murinus* глюкоизомеразен ген, се третира с ДНК полимеразата I (Кленов фрагмент) за превръщане на свързаните фрагменти в слепи краища и последователно свързани в рLIC₁₉. След това генът се изрязва, като се използват рестрикционните ендонуклеази BamHI и HindIII, и се включва в BamHI/HindIII - усвоения рMc5T. Полученият плазмид е наречен рMc-GIsmu1. Нуклеотидът и получената аминокиселинна последователност на *Str. murinus* глюкоизомеразата и структурата на експресионната единица са показани на фиг.19 и 20, респективно.

При това *S. murinus* глюкоизомеразата има лизинов остатък в протеиновата последователност при позиция 253, еквивалентна на

K₂₅₃ в *A. missouriensis*. Мутацията, получена в резултат от заместване на лизин 253 /K/ с аргинин /R/ в *Strept. murinus* глюкоизомеразата, е представена с използването на дуплексна молекула, състояща се от едноверижна рMc-CI м 1 ДНК, BamHI/HindIII усвоен рMa5T и фосфорилиран мутагенетичен олигонуклеотид

5-GGTCCTGGTTCGTACCGGATGCCGGACTGG-3'

Процесът, следващ етапа на присъединяване, т.е. селекцията и анализа на получения в резултат мутант, е представен както е описано в пример 1.

Изобретението не трябва да се ограничава до предложените и пояснени мутации. Освен това в някои детайли изобретението е описано чрез илюстрации и примери с цел яснота и разбираемост, като би било нормално в практиката да се направят някои изменения и модификации, които да не излизат от обхвата на приложените претенции.

Патентни претенции

1. Мутантен глюкоизомеразен ензим, получен чрез експресия на ген, който го кодира, и притежаващ аминокиселинна последователност, различаваща се най-малко по една аминокиселина от дивия тип глюкоизомеразата, който мутантен глюкоизомеразен ензим се характеризира с това, че проявява подобрени свойства съгласно описанието.

2. Мутантен глюкоизомеразен ензим съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че за разлика от природно получената глюкоизомеразата или мутантната, проявяваща същата основна биологична активност, има най-малко един аминокиселинен остатък (заместен аминокиселинен остатък), който е аргинин вместо лизин както в природния продукт или мутантния, или е лизин вместо аргинин в природно добитата глюкоизомеразата или мутантната, в местонахождението на природно добитата глюкоизомеразата, който може буквално да съгласува заместването на аргининовия остатък на мястото на лизининовия или обратно - на лизининовия остатък с аргининов без съществено изменение на биологичните свойства, и който обладава природно получената глюкоизомеразата.

3. Мутантен глюкоизомеразен ензим съгласно претенции 1 или 2, който е мономе-

рен ензим, включващ най-малко две области, или олигомерен ензим, включващ най-малко две субединици, част от тях или всички, от които може незадължително да съдържат области, и където посочените области или, когато е подходящо, субединици, включват сайтове за ниска способност към разтваряне, като някои от тези сайтове включват аминокиселинни остатъци, които встъпват в електростатично взаимодействие с други аминокиселинни остатъци от други сайтове, характеризиращ се с това, че този сайт, който съдържа посочения заместен аминокиселинен остатък, съвпада с един от тези сайтове за ниска способност към разтваряне.

4. Мутантен глюкоизомеразен ензим съгласно която и да е от претенции от 1 до 3, който е получен от *Actinoplanes missouriensis*.

5. Мутантен глюкоизомеразен ензим съгласно която и да е от претенции от 1 до 4, в който аминокиселинната последователност на посочената глюкоизомераза показва най-малко 65% хомология с аминокиселинната последователност на глюкоизомеразата, получена от дивия щам *Actinoplanes missouriensis*.

6. Мутантен глюкоизомеразен ензим съгласно която и да е от претенции от 1 до 5, получен от *Actinoplanes missouriensis* в който Lys 253 е заместен с Arg 253 и/или Gly 70 от Ser 73 и/или Ala 73 от Ser и/или Gly 74 от Thr.

7. Мутантен глюкоизомеразен ензим съгласно претенция 6, в който най-малко Lys 253 е заместен от Arg 253.

8. Мутантен глюкоизомеразен ензим съгласно претенция 6, в който най-малко Gly 70, Ala 73 и Gly 74 са заместени със Ser, Ser и Thr, респективно.

9. Мутантен глюкоизомеразен ензим съгласно която и да е от претенции от 1 до 8, проявяващ повишена термостабилност при стандартните условия по описанието, в сравнение с кореспондиращия див тип ензим (природен ензим).

10. Мутантен глюкоизомеразен ензим съгласно която и да е от претенции от 1 до 9, проявяващ повишена стабилност при различни рН стойности в сравнение с кореспондиращия див (природен) ензим.

11. Имобилизирана глюкоизомераза, включваща мутантен глюкоизомеразен ензим съгласно която и да е от претенции от 1 до 10.

12. Използване на мутантна глюкоизомераза съгласно която и да е от претенции от 1 до 11 за получаване на фруктозен сироп.

13. Метод за получаване на мутантен глюкоизомеразен ензим, получен от начална глюкоизомераза, имаща същият вид биологична активност със съпровождащ модулаторен ефект на стабилност, сравнено с началната глюкоизомераза, съгласно който началната глюкоизомераза е избрана между тези, които първоначално обладават лизинов остатък или един аргининов остатък, локализиран при сайта, който може да съгласува заместването на аргининовия остатък с лизинов или обратно, без съществено изменение на биологичната активност на началната глюкоизомераза, и който метод включва заместване на аргининов остатък за посочения инициален лизинов остатък или обратно на лизинов остатък за посочения инициален аргининов остатък.

Приложение: 21 фигури

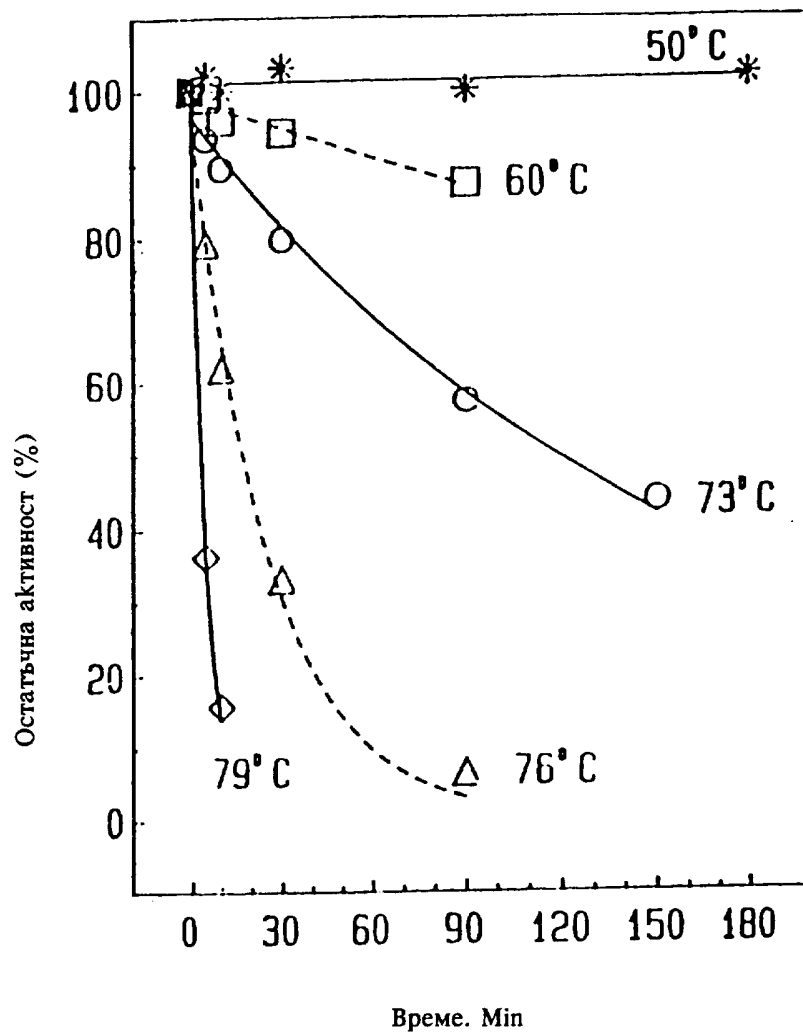
Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Ст. Стефанова

Редактор: Н. Божинова

Пор. 37273

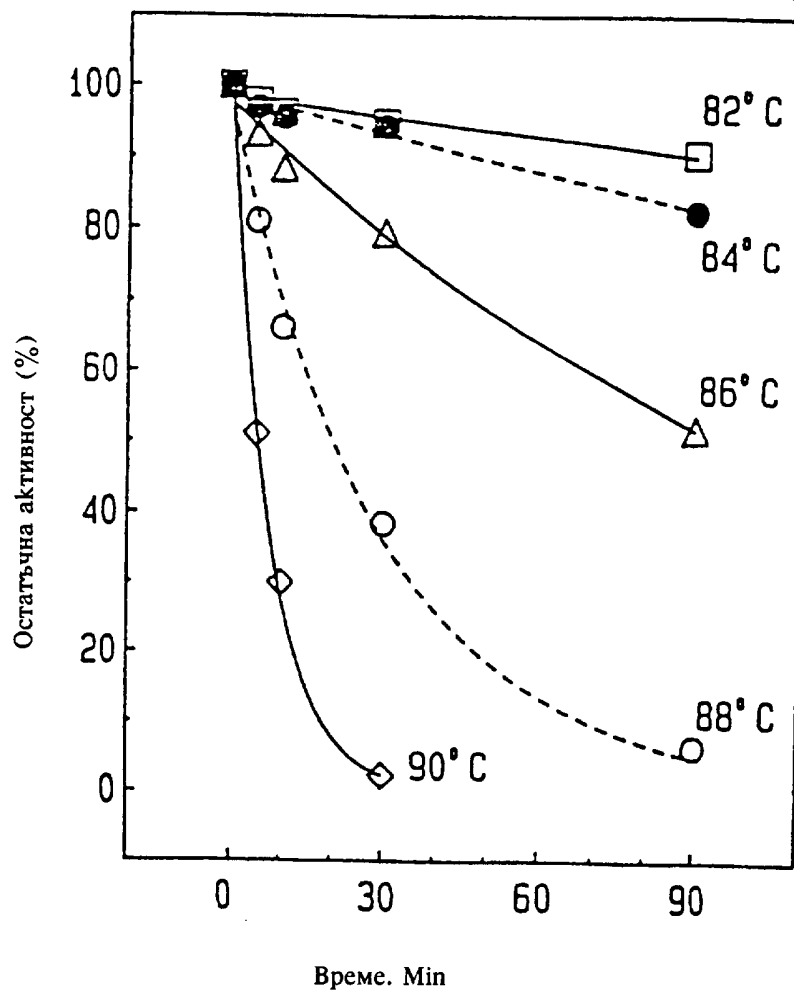
Тираж: 40 ЮМ



Фиг. 1

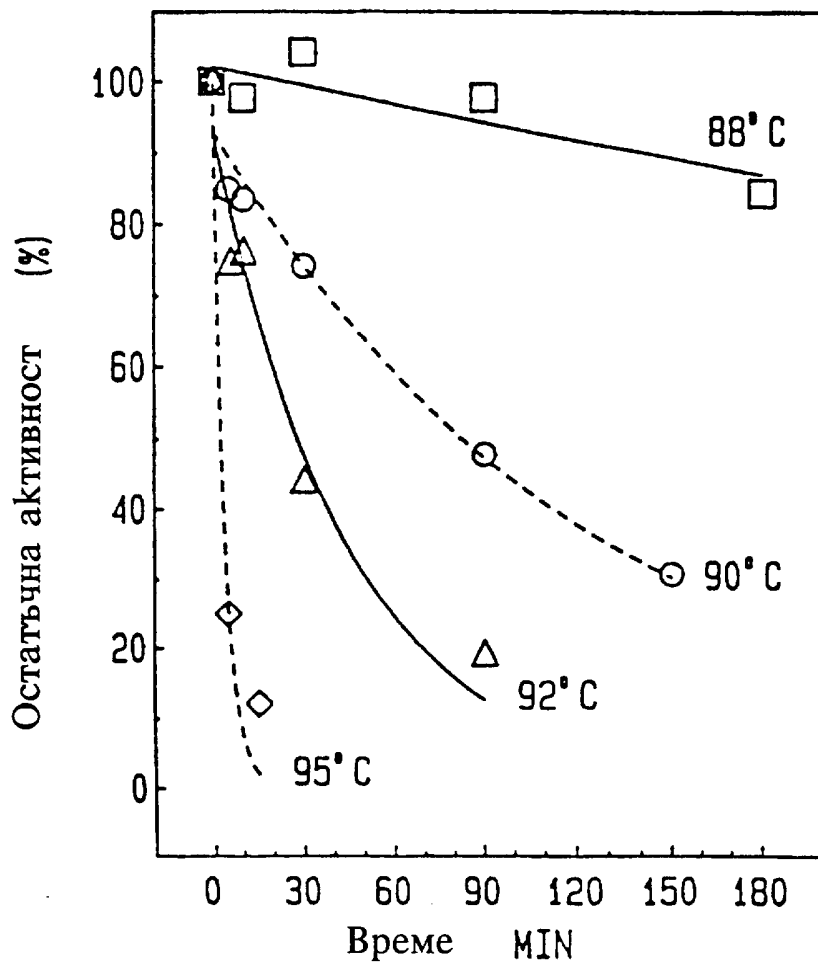
Кинетика на температурната инактивация
на EcoAmi (DSM) GI в

50mM MOPS, pH 7.2 at 25°C, + 10mM Mg²⁺



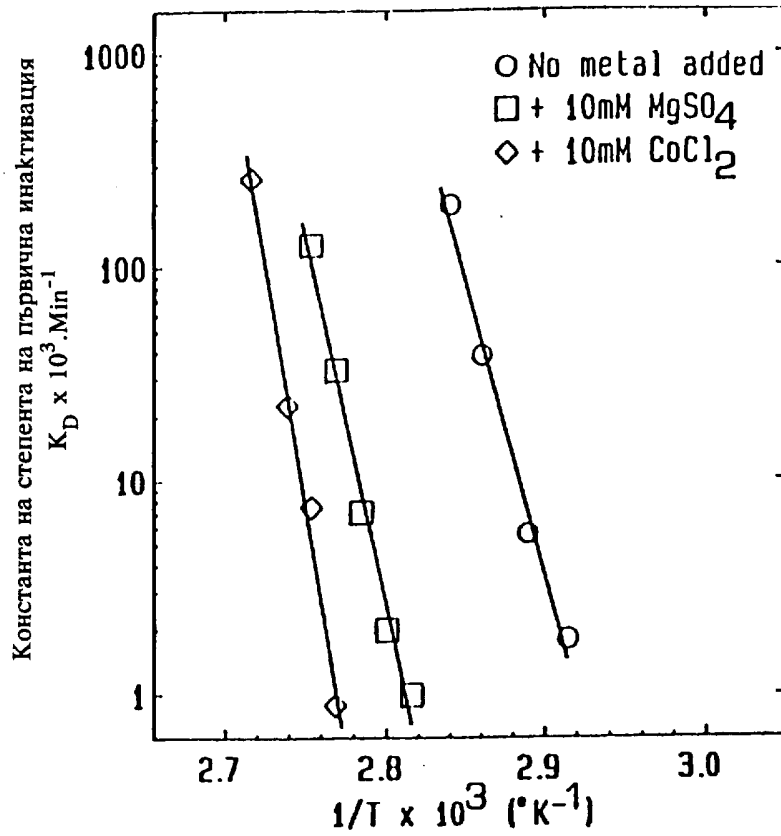
Фиг. 2

Кинетика на температурната
инактивация на EcoAmi (DSM) GI in
50mM MOPS, pH 7.2 at 25°C, + 10mM Co²⁺

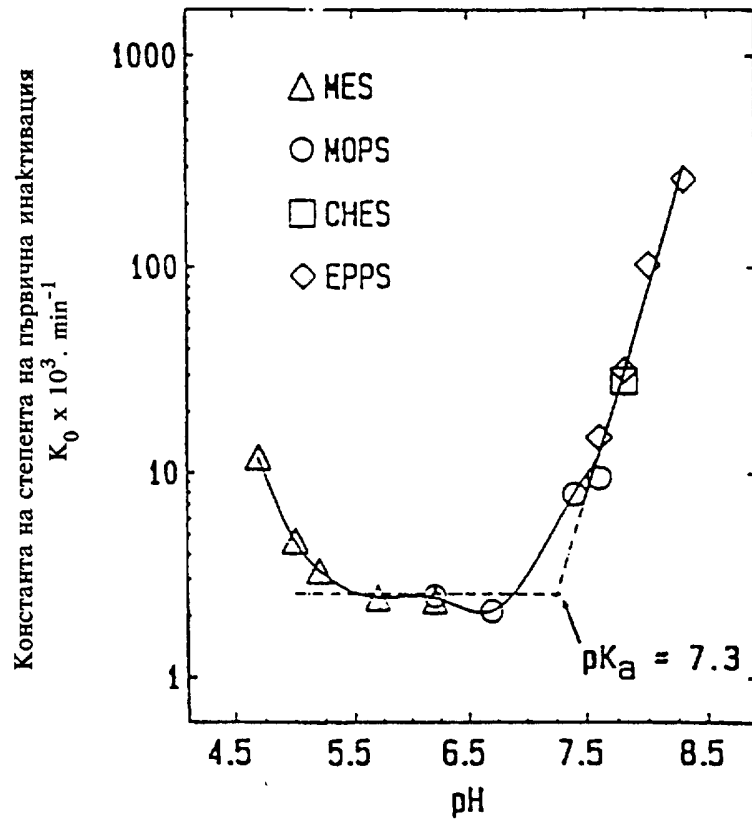


Фиг. 3

Диаграма на температурната зависимост за
GI in 50 mM MOPS, pH 7.2 at 25°C

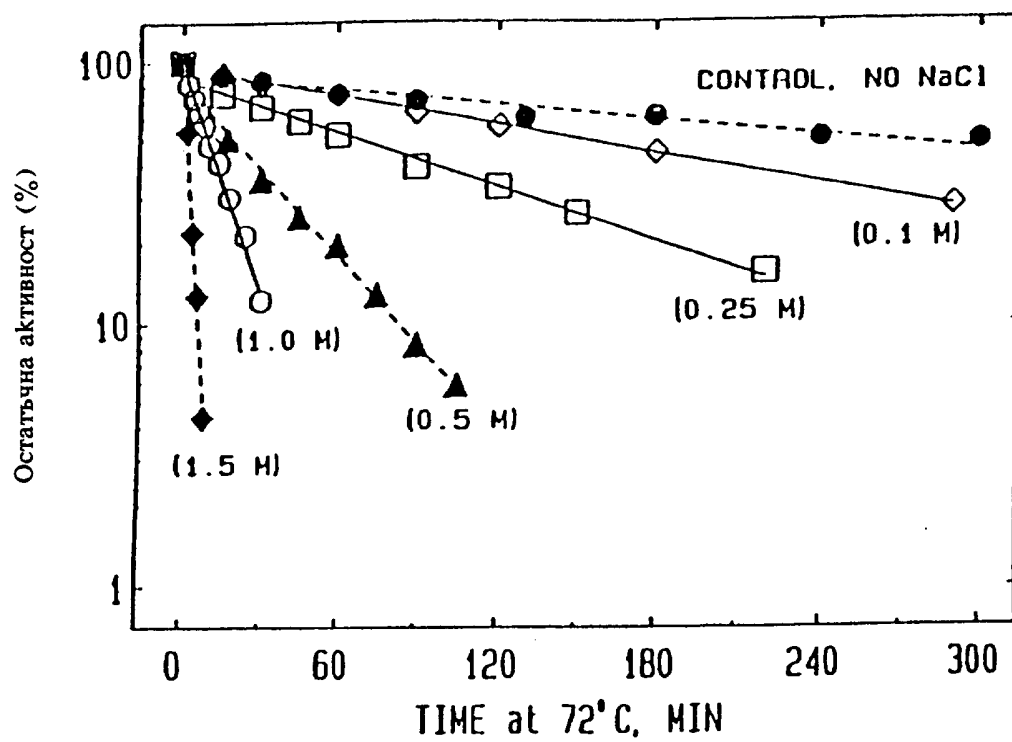


pH зависимост на температурната инактивация на EsoAmi (DSM) глюкоизомераза при 72⁰C, в отсъствие на метал



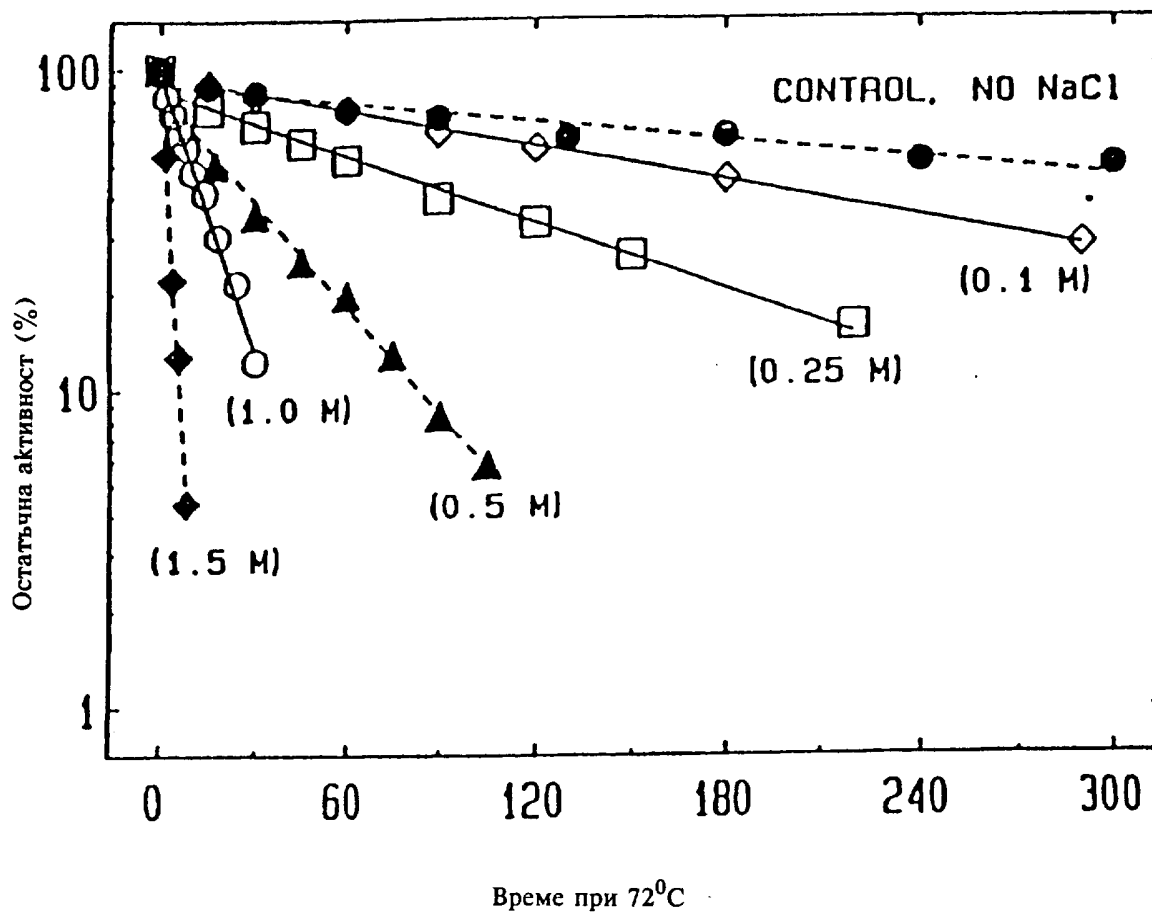
Фиг. 5

Въздействие на йонната сила върху кинетиката на температурната инактивация на
ЕсоАМi (DSM) в 50 mM MOPS, pH 6.7, 72⁰С в отсъствие на добавен метал

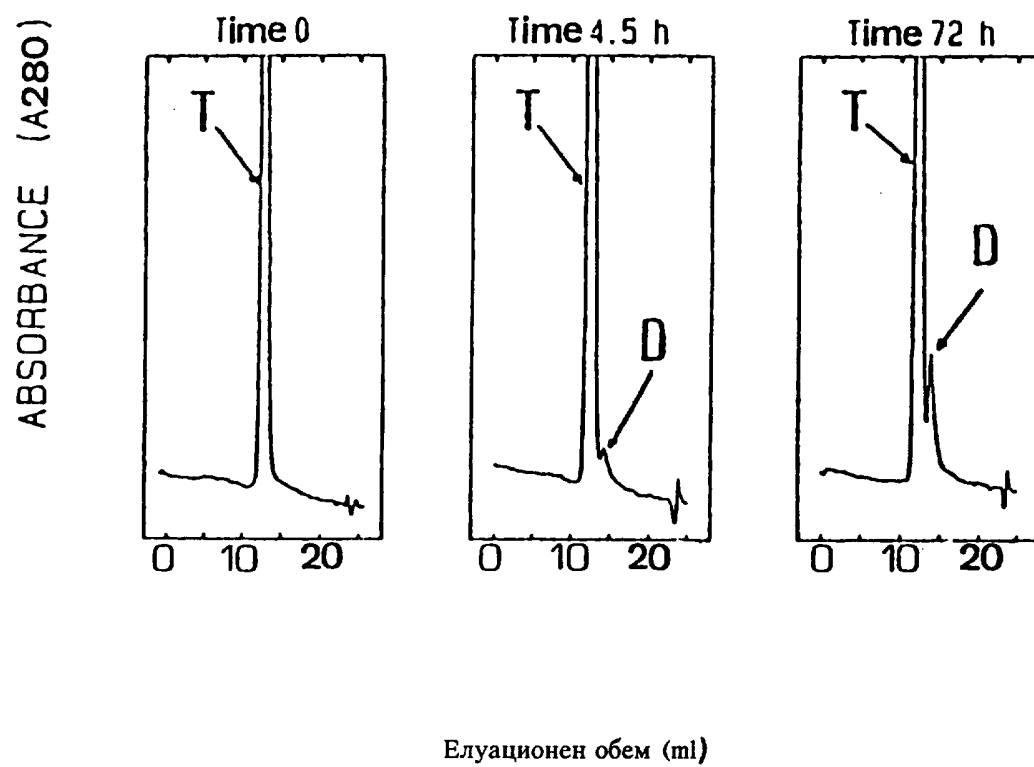


Фиг. 6

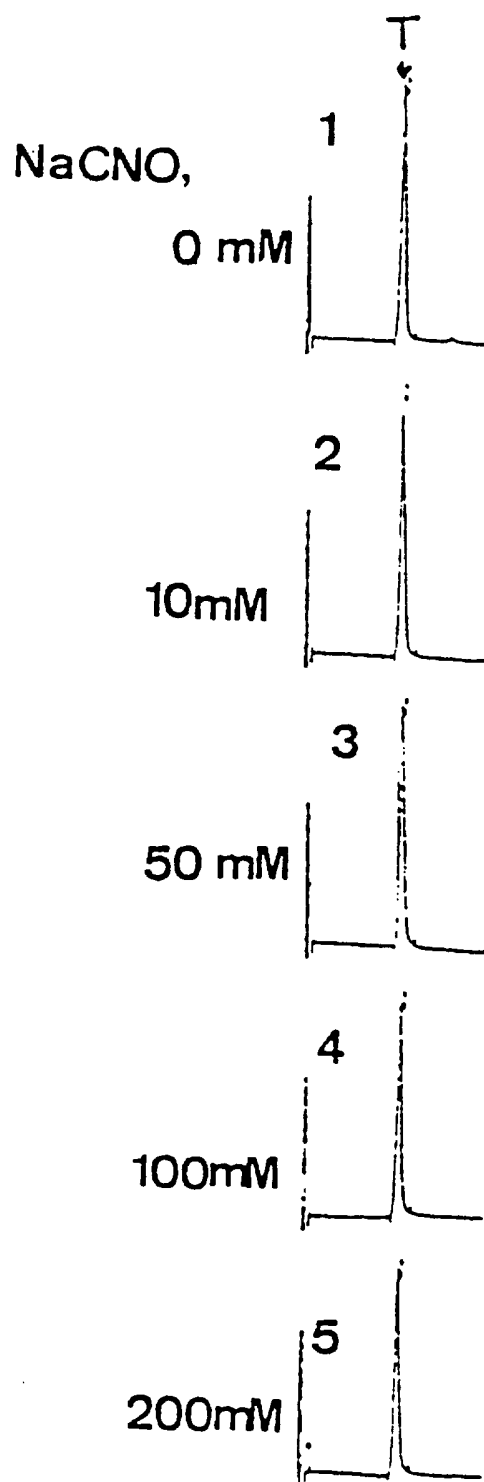
Въздействие на йонния ефект върху кинетиката на температурната инактивация
EcoAmi (DSM) GI in 50 mM, pH, 72⁰C, в отсъствие на метал



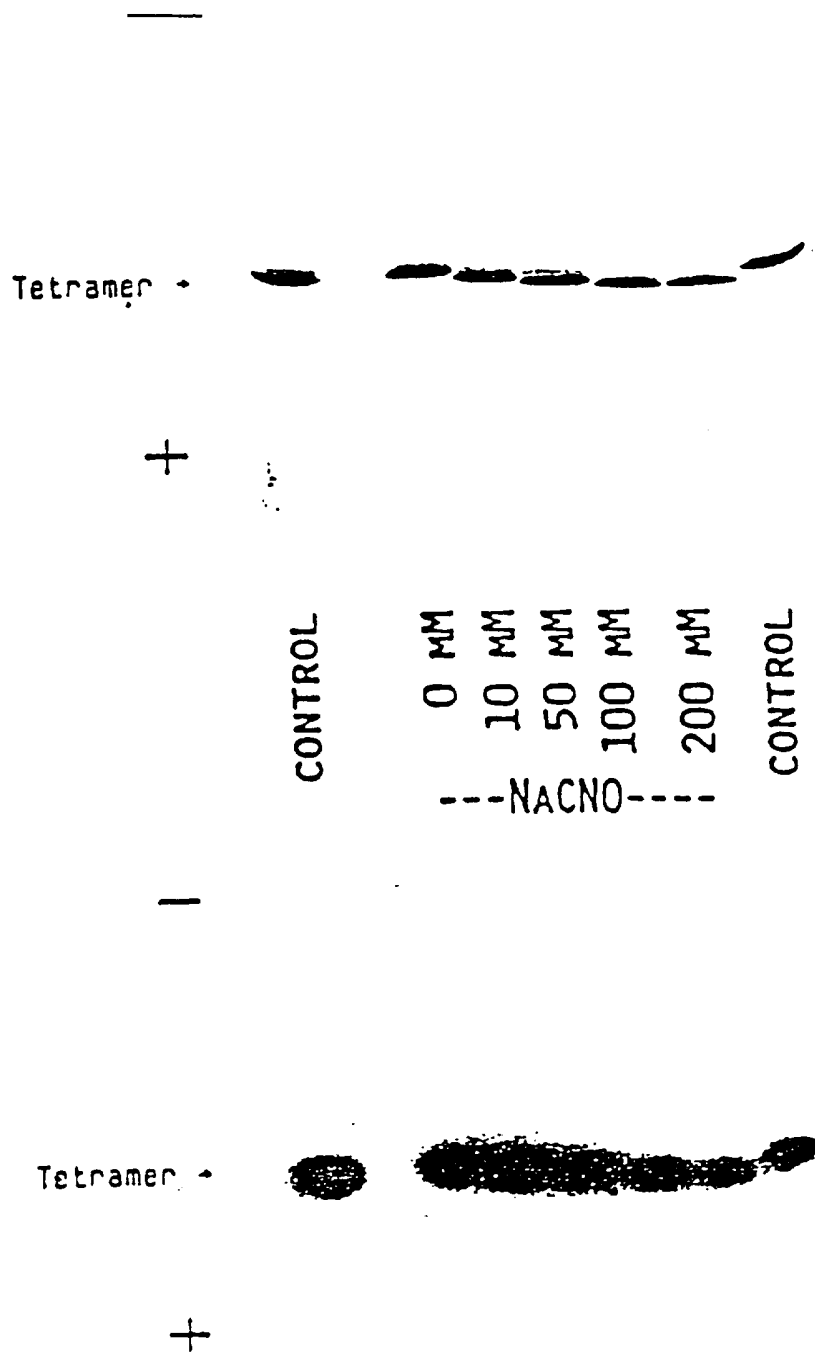
Фиг. 7



Фиг. 8

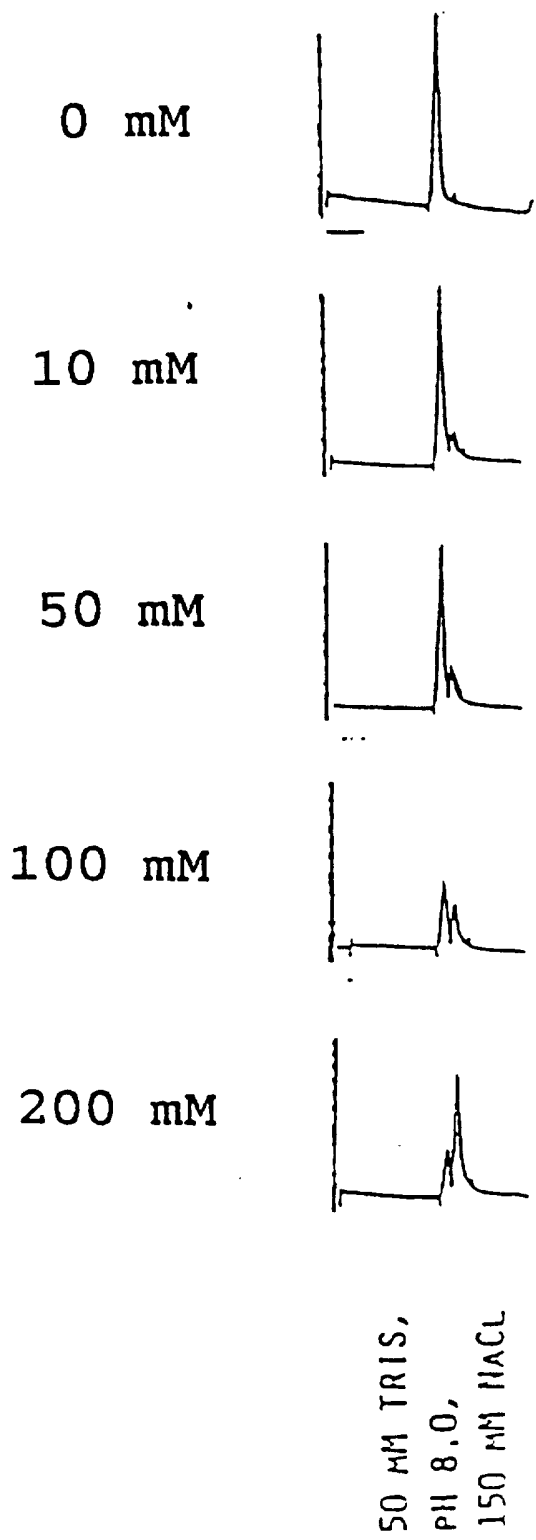


Фиг. 9А

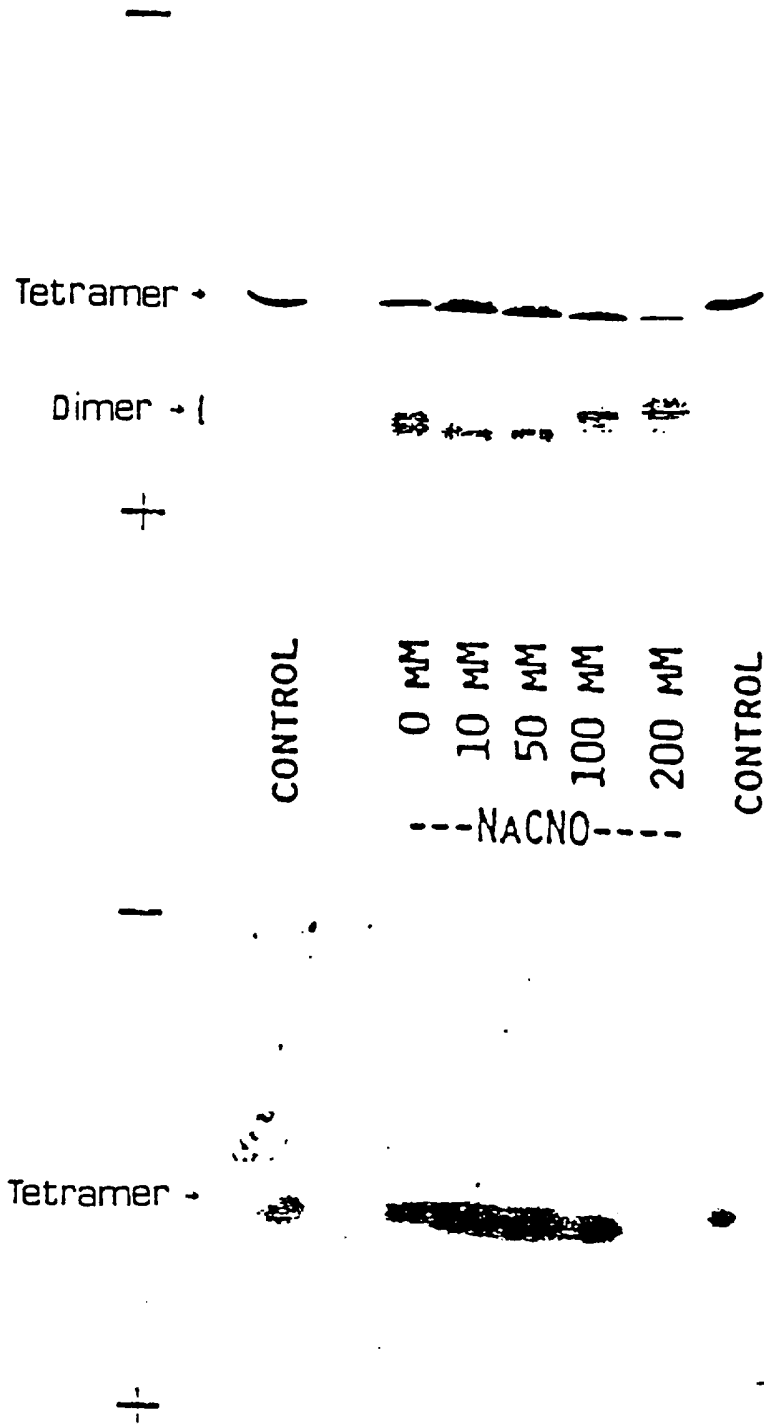


Фиг. 9В

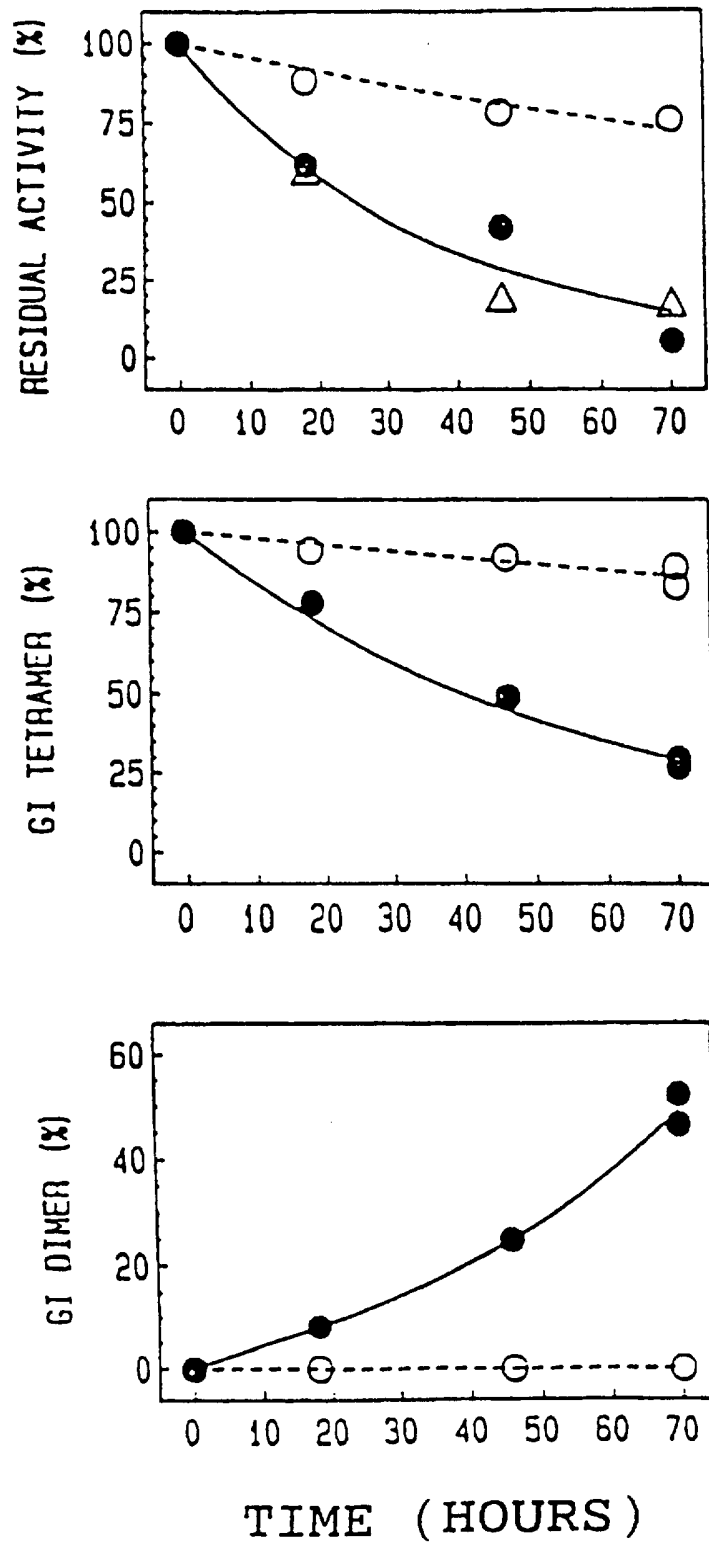
NaCNO



Фиг. 10А



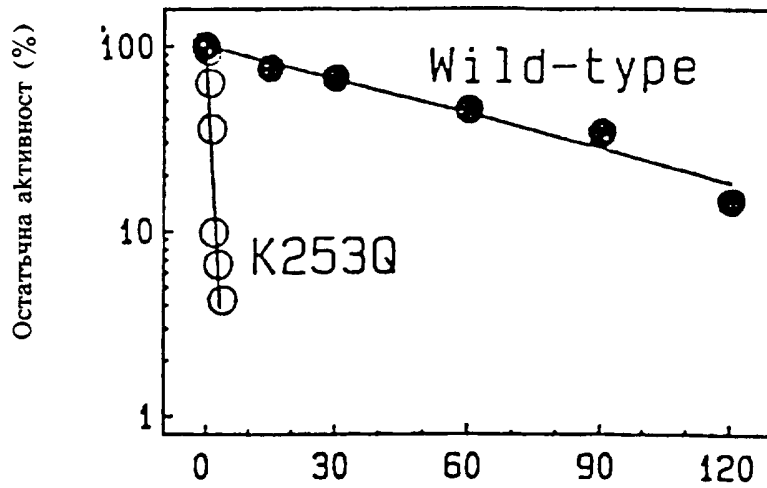
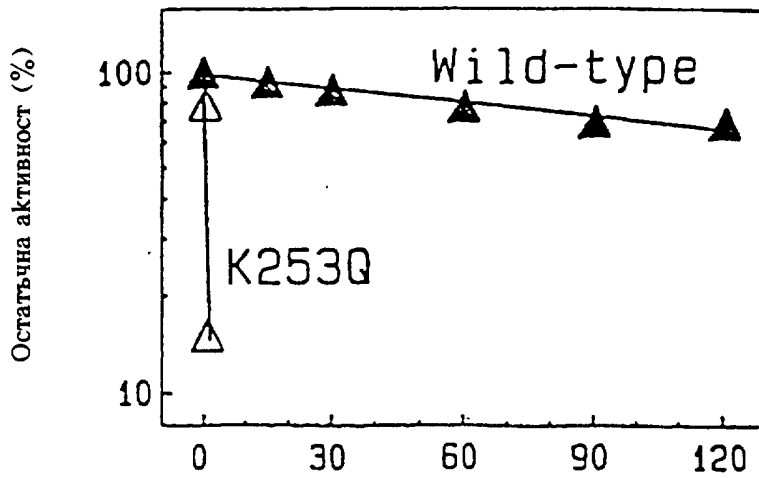
Фиг. 10В



Фиг. 11

Кинетика на температурна инактивация на
мутант К 2530A

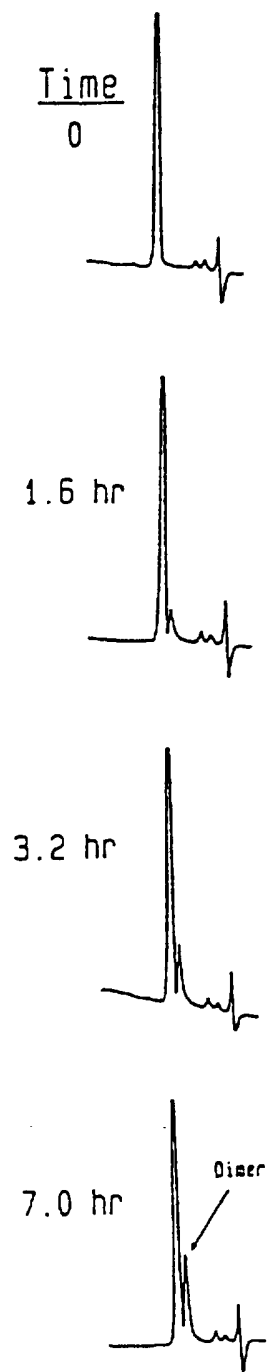
72°C, 50mM MOPS, pH 7.4, NO METAL ADDED

B85°C, 50mM MOPS, pH 6.5, 10mM MgSO₄

Време, min

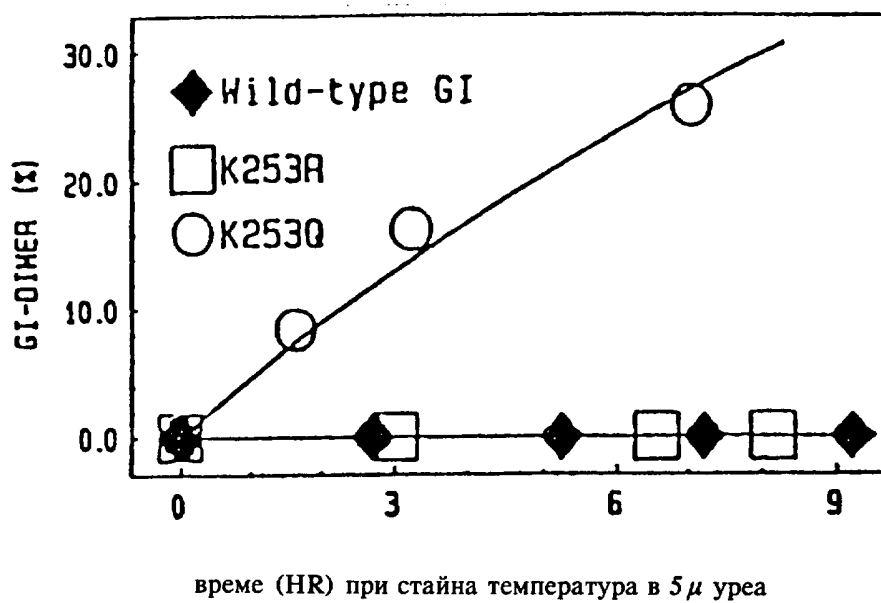
Фиг. 12

60322

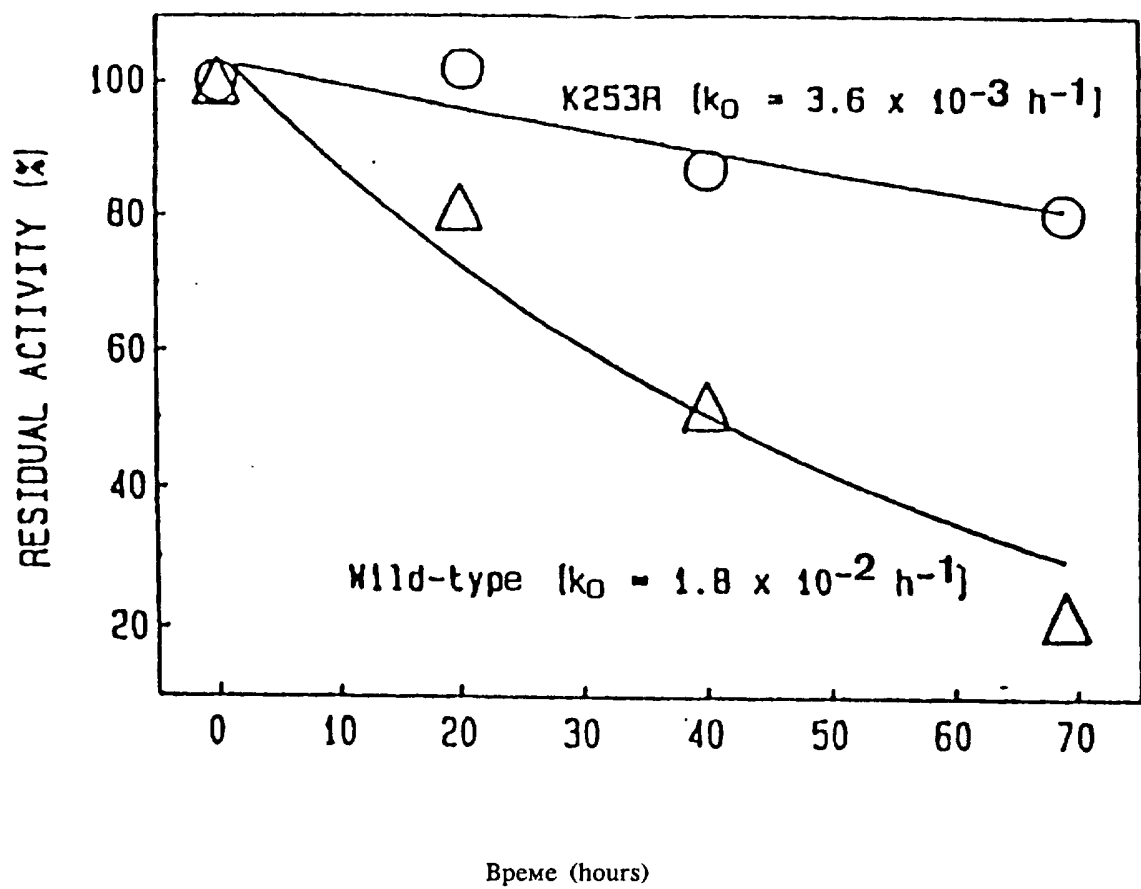


SEC-HPLC on Superose-12

Фиг 13А



Фиг. 13В



Фиг. 14

10 20 30 40 50 60
 AATTACCTCGAAAGCAAGCTGATAAACCGATACAATTAAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTT
 70 80 90 100 110 120
 TTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTGCAATTCCAAGCTAATTCACTC
 130 140 150 160 170 180
 GAAAGCAAGCTGATAAACCGATACAATTAAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTTTTTTTTGGAG
 190 200 210 220 230 240
 ATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTGCAATTCCAAGCTCTGCCTOGOGGTTTGGTG
 250 260 270 280 290 300
 ATGACGGTGAAAACTCTGACACATGCAGCTCCGGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAG
 310 320 330 340 350 360
 CGGATGCAGATCAACGGCCCTGTAGGGGCGATTAAAGCGGGGGTGTGGTGGTTACGC
 370 380 390 400 410 420
 GCAGGTGACCGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTT
 430 440 450 460 470 480
 CTTTCTCGCAAGTTGCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATGGGGGCTCCCTTTAG
 490 500 510 520 530 540
 GGTTCGGATTAGTGTCTTTACGGCACTCGAACCACAAAAAAGTTGATTAGGGTGTGGTT
 550 560 570 580 590 600
 CAOFTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTGCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCAAGT
 610 620 630 640 650 660
 TCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCCTATCTGGTCTATT
 670 680 690 700 710 720
 CTTTIGATTATAAGGGATTTTGGCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTT
 730 740 750 760 770 780
 AACAAAAATTTAACGGAATTTTACAAAATATTAAAGTTTACAATTGATCTGCGCTCG
 790 800 810 820 830 840
 GTGTTGCGCTGCGGOGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACA
 850 860 870 880 890 900
 GAATCAGGGGATAACGCGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGOCAGCAAAGGCCAGGAAC
 910 920 930 940 950 960
 CGTAAAAAGGCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAC
 970 980 990 1000 1010 1020
 AAAAATGACGCTCAAGTCAAGGTGGGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCG
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 TTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCGCTTACCGGATAC

Фиг. 15А

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 CTGTCCGGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGGCGTTTCTCATAGCTCAAGCTGTAGGTAT
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 CTCAGTTGGGTGTAGGTGGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCAAGAAACCCCGTTTCAG
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 CCGACCGCTGGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTTGAGTCCAAACCCGGTAAGACAAGAC
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 TTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCCAGGTATGTAGGCGGT
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 GCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGT
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 ATCTGGGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGTATCCGC
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 AAACAACCCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAGCAGCAGATTACGGGCAGA
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCCTTTGATCTTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAC
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 GAAAACTCAGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTTCACCTAGATC
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 CTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCT
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 GACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGOGATCTGTCTATTTGGTCA
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 TCCATAGTTGCCTGACTCCCGTGGTGTAGATAACTACGATAACGGAGGGCTTACCATCT
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 GGCCCCAGTGTGCAATGATAACCGGAGACCCACCGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 ATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGGCGAGCCAGAAAGTGGTCTGCAACTTTATCCCGCTCC
 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 ATCCAGTCTATTAATTTGTTGCGGGGAGCTAGAGTAAGTAGTTCCAGTTAATAGTTTG
 1990 2000 2010 2020 2030 2040
 CGCAACGTTGTTGCCAATGCTGCAGGCATCGTGGTGTCAACGCTCGTGGTTTGGIATGGCT
 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 TCATTCAGCTCCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAA
 2110 2120 2130 2140 2150 2160
 AAAGCGGTAGCTCCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGTCAGAAGTAAGTTGGCGCAGTGTTA

Фиг. 15А (продължение 1)

2170 2180 2190 2200 2210 2220
 TCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGTCATGOCATCOGTAAGATGC

2230 2240 2250 2260 2270 2280
 TTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGOGGOGACCG

2290 2300 2310 2320 2330 2340
 AGTTGCTCTTGGCCGGGCTCAACAOGGATAATACOGGOCACATAGCAGAACTTTAAAA

2350 2360 2370 2380 2390 2400
 GTGCTCATCATGGAAAAOGTTCTTGGGGGOGAAAACCTCTCAAGGATCTTACOGCTGTTG

2410 2420 2430 2440 2450 2460
 AGATCCAGTTGATGTAAOCCACTGTTGCAOCCCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTTC

2470 2480 2490 2500 2510 2520
 ACCAGOGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCOGCAAAAAGGGGAATAAGG

2530 2540 2550 2560 2570 2580
 GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTCTTTTCAATATTATTGAAGCAGACAG

2590 2600 2610 2620 2630 2640
 TTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTTGTCATGTAACATCAGAGATTTTIGAGA

2650 2660 2670 2680 2690 2700
 CACAAOGTGGCTTTGTTGAATAAATOGAACTTTTGTCTGAGTTGACTCOCCGGGGGGGATG

2710 2720 2730 2740 2750 2760
 GGTGCAATTTGCTTTTCAAAAAAAGCCCGCTCATTAGGGGGGCTAAAAAAGCCCGCT

2770 2780 2790 2800 2810 2820
 CATTAGGGGGGCTCGAATTTCTGOCATTCATCCGCTTATTATCACTTATTTCAGGGGTAGC

2830 2840 2850 2860 2870 2880
 AACCAGGGGTTTAAGGGCACCAATAACTGCTTAAAAAATTAAGCCCGGCGCTGOCCT

2890 2900 2910 2920 2930 2940
 CATCCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGOCGACATGGAAGOCATCACAGACGG

2950 2960 2970 2980 2990 3000
 CATGATGAAOCTGAATGOCAGOGGCATCAGCAOCTTGTGOCCTTGGGTATAATATTTGC

3010 3020 3030 3040 3050 3060
 CCATAGTGAAAAOOGGGGGGGAAGAAGTTGTCCATATTGOCACOGTTTAAATCAAACCTGG

3070 3080 3090 3100 3110 3120
 TGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGAOGAAAAACATATTCTCAATAAACCCCTTTAGGGA

3130 3140 3150 3160 3170 3180
 AATAGGOCAGGTTTTCAOOGTAAACOGOCACATCTTGGGAATATATGTGTAGAACTGOC

3190 3200 3210 3220 3230 3240
 GGAAATCGTGTGGTATTCACTCCAGAGOGATGAAAACGTTTCAGTTTGTCTCATGGAAAA

Фиг. 15А (продължение 2)

3250 3260 3270 3280 3290 3300
 CGGTGTAACAAGGGTGAACACTATGCCATATCAACCAGCTCACCGTCTTTTCATTGCCATAC

 3310 3320 3330 3340 3350 3360
 GAAATTOGGATGAGCATTTCATCAGGOGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCOGGATAAAACT

 3370 3380 3390 3400 3410 3420
 TGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCOGTAATATCCAGCTAAAACGGTCTGGT

 3430 3440 3450 3460 3470 3480
 TATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCOCTCAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGG

 3490 3500 3510 3520 3530 3540
 ATATATCAAACGGTGGTATATCCAGTGAATTTTTTCTCCATTTTACGCTTCCCTAGCTCCTG

 3550 3560 3570 3580 3590 3600
 AAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCOGGTAGTGATCTTATTTTCATTATGGTGAAAGT

 3610 3620 3630 3640 3650 3660
 TGGAAOCTCTTAAOGTGCOGATCAACGTCTCATTTTTGGCCAAAAGTTGGCOCCAGGGCTTCC

 3670 3680 3690 3700 3710 3720
 CCGTATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTACAGGTA

 3730 3740 3750 3760 3770 3780
 TTTATTGGAAGACGAAAGGGCATOGGCGGGGAATTCOOGGGGATCOGTGCACTGCA

 3790 3800
 GCCAAGCTTGGTCTAGAGGTGCA

Фиг. 15А (продължение 3)

10 20 30 40 50 60
GAATTCGGCAAGGGATAAATATCTAACACCGTGCGTGTGACTATTTTACCTCTGGCGGT
70 80 90 100 110 120
GATAATGGTTGTCATGTAATAAGGAGGTGTGATGGAACAAGCATAACCCCTGAAAGATAGC
TTGGGATCC

Фиг. 15B

10 20 30 40 50 60
GAATTCGAGCTGAGCTTACTCCCATCCCGTGTGACAATTAATCATGGCTGTATA
70 80 90 100
ATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGGATCC

Фиг. 15C

30 60
 GTGTCTGTCCAGGCCACACGGGAAGACAGTTCTCTCTGGACCGTTGGATGG
 M S V Q A T R E D K F S F G L W T V G W

90 120
 CAGGCTCGTGAACGGTTCGGTGAAGCCACGGTACGGCACTCGAACCGGTTCAGGCGGTG
 Q A R D A F G D A T R T A L D P V E A V

150 180
 CACAAGCTCGTGAATCGGGCCCTACGGCATCAAGTTCCACGAAGAAGCCTGGTGCC
 H K L A E I G A Y G I T F H D D D L V P

210 240
 TTGGCTCGGAAGCCAGAACCGGATCATCGGGGCTTCAAGAAGGCGCTCGAC
 F G S D A Q T R D G I I A G F K K A L D

270 300
 GAGACCGGCGCTGATCGTCCCGATGGTGAACCAACCTCTTCAACCCACCGGTGTTCAG
 E T G L I V P M V T T N L F T H P V F K

330 360
 GAACGGCGGCTTCAACAGCAACGAACGGTTCGGTGGGGCTACGGGATCGGCAAGGTGCTG
 D G G F T S N D R S V R R Y A I R K V L

390 420
 CGCCAGATGGAACCTCGGGCGGAGCTGGGGCGAAGAAGCTCGTCTCTGGGGGGCGCC
 R Q M D L G A E L G A K T L V L W G G R

450 480
 GAGGGCGCGAGTACGACTCGGCCAAGGAGTTCAGCGCGCGCCCTCGAACCGCTACCGCGAG
 E G A E Y D S A K D V S A A L D R Y R E

510 540
 GCGCTCAACCTGCTCGGCGAGTACTCGGAGGAACCGGTTACGGCGCTCGGCTTCGGCATC
 A L N L L A Q Y S E D R G Y G L R F A I

570 600
 GAGCGAAGCGGAACGAGCCCGGGGACATCTGCTCCCGAACCGCGGCGCAAGCCATC
 E P K P N E P R G D I L L P T A G H A I

630 660
 GCGTTCGTGACAGGAGCTGGAGCGTCCCGAGCTCTTCGGCATCAACCGGAGAACCGGCAC
 A F V Q E L E R P E L F G I N P E T G H

690 720
 GAGCAGATGTGAACTCAACTTCAACCCAGGGCATCGCCAGGGCGCTGTGGCACAAGAAG
 E Q M S N L N F T Q G I A Q A L W H K K

750 780
 CTGTTCACATCGAACCTGAACGGTTCAGCAACCGGCGAAGTTGACACAGGACCTGGTCTTC
 L F H I D L N G Q H G P K F D Q D L V F

810 840
 GGCCACGGTGAACCTGCTCAACGGGTTCCTGGTGGTGAACCTCCTGGAGAAACGGGCCCCGAC
 G H G D L L N A F S L V D L L E N G P D

870 900
 GGGCCCCGGGGTACGACCGAACCCCGTCACTTGGACTACAAGCCGTCGCGTACCGAGGAC
 G A P A Y D G P R H F D Y K P S R T E D

930 960
 TAOGACGGGGTCTGGGAGTGGGCAAGGCCAACATCCGGATGTACCTGCTGCTCAAGGAG
 Y D G V W E S A K A N I R M Y L L L K E

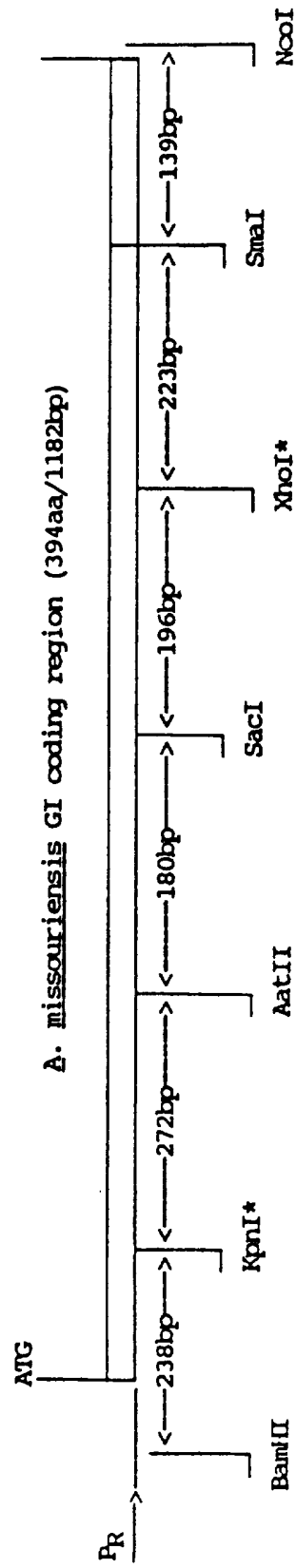
990 1020
 CGGGCAAGGGGTTCGGGCGGCAACCCCGAGGTCCAGGAGGGGCTGGCCGCAAGGTC
 R A K A F R A D P E V Q E A L A A S K V

1050 1080
 GGGAGCTGAAGACCCCGAACCCCGGAGGGGAGGGATAAGCCGAGCTGCTGGCCGAC
 A E L K T P T L N P G E G Y A E L L A D

1110 1140
 CGCAGGGGTTCGAGGACTACGACGGGCAACCCCGTGGGGCCCAAGGGCTTGGCTTGGT
 R S A F E D Y D A D A V G A K G F G F V

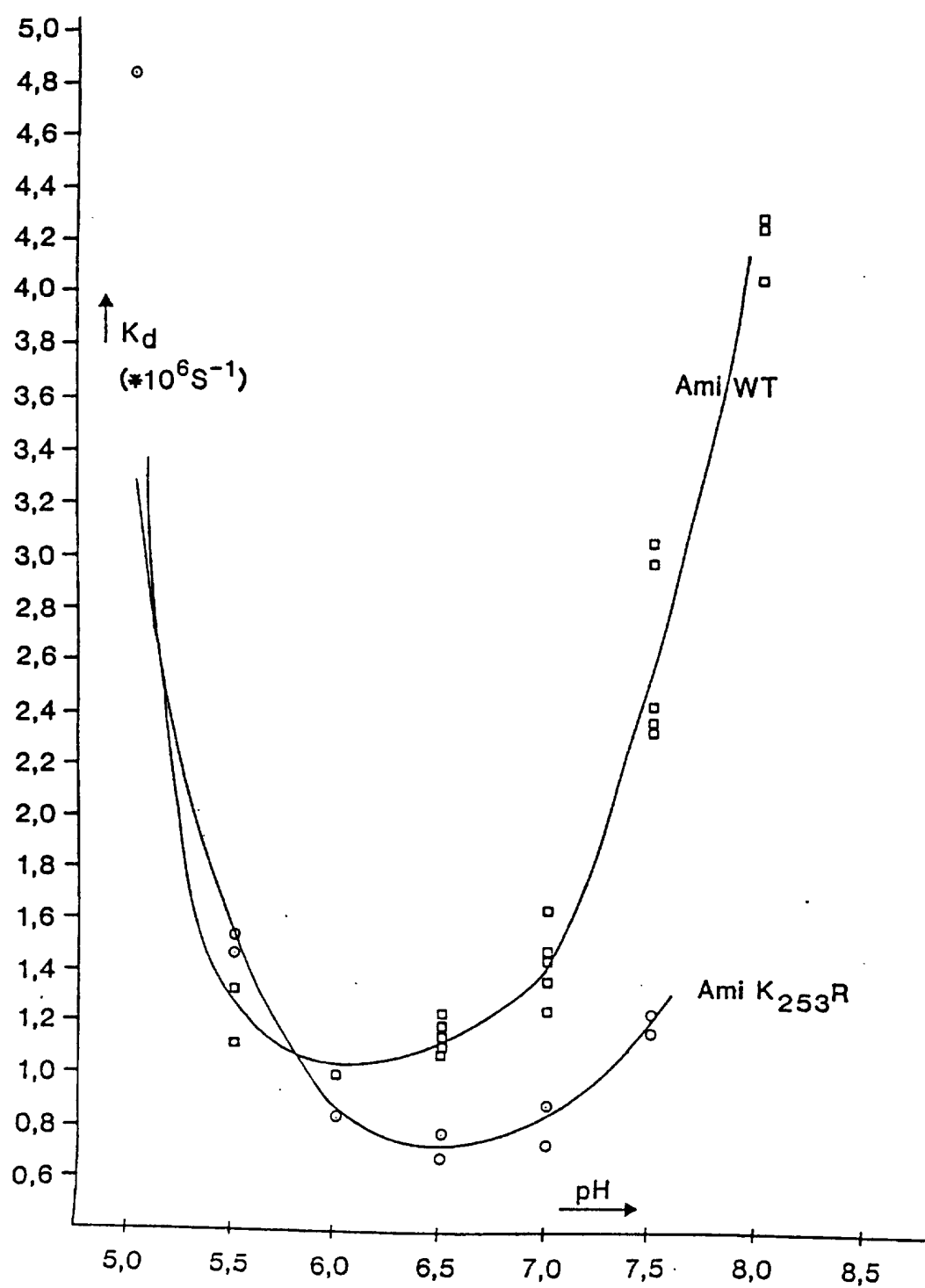
1170
 AAGCTGAACCCAGCTGGGATGGAGCAACCTGCTGGAGCCCC
 K L N Q L A I E H L L G A R

Фиг. 16 (продължение)



Фиг. 17

pH profile under application conditions



Фиг. 18

30 60
 ATGAGCTTCCAGCCCACCCCGAGGACAGGTTCAOCTTCGGTCTGTGGAOOGTCCGCTGG
 M S F Q P T P E D R F T F G L W T V G W

90 120
 CAGCGAAGGGAOOGTTGGGCAOCCOOGCCCCOOGCTCGAOCOGGTCGAGAOGGTC
 Q G R D P F G D A T R P A L D P V E T V

150 180
 CAGOGCTGGCOGAGCTGGGGOCTAOGGAGTGAOCTTCCAGCAOGAOGAOCTGATCOOC
 Q R L A E L G A Y G V T F H D D D L I P

210 240
 TTCGGTCTCCGACAOOGAGOGGAGTGGCACATCAAGOGCTTCOOGCCAGGOOCTGGAC
 F G S S D T E R E S H I K R F R Q A L D

270 300
 GCCAOOGGCAITGAOGGTGCOCCATGGCCACCAOCCAOCTCTTCAOCCOOGCTCTTCAAG
 A T G M T V P M A T T N L F T H P V F K

330 360
 GACGGGGCTTCAOOGCOCAOGAOOGGCAOCTAGCOGGTACOGGCTGGCAAGAOGATC
 D G G F T A N D R D V R R Y A L R K T I

390 420
 GGCAACATCGAOCCTGGGGCOGAOACTGGGTGCCAAGAOGTATGTGCOCTGGGGOGGCOGT
 G N I D L A A E L G A K T Y V A W G G R

450 480
 GAGGGGCOGAGTCCGGTGGGGCOCAAGGAOGTGGGCAOCCOCTCGAOCGCATGAAGGAG
 E G A E S G G A K D V R D A L D R M K E

510 540
 GCGTTCGAOCTOCTGGGCAOCTAGCTCAOCCOCCAGGGCTAOGAOCCTCOGCTTCOGCATC
 A F D L L G E Y V T A Q G Y D L R F A I

570 600
 GAGOOCAAGCOCAOAGAGCOOOGGGGOCACATCTGCTGCOCCAOOGTCCGCOCAOOGCOCTG
 E P K P N E P R G D I L L P T V G H A L

630 660
 GOCTTCATOGAGOGCTGGAGOGCOOGGAGCTGTACGGGTCAOCCOOGGAGGTCCGGOCAC
 A F I E R L E R P E L Y G V N P E V G H

690 720
 GAGCAGATGGCOGGCOCTGAACTTCCOCCAGGCATCGOGCAGGCOOCTGTGGGGGGGCAAG
 E Q M A G L N F P H G I A Q A L W A G K

750 780
 CTCTTCCACATOGAOCCTCAOCCGOCAGTCCGGCATCAAGTACGACCAGGAOCTTCGGGTC
 L F H I D L N G Q S G I K Y D Q D L R F

Фиг. 19

810 840
 GGCGCGGGGACCTGGGGGGGCTCTGGCTGGTGGACCTCCCTGGAGACCGCGCGGTAC
 G A G D L R A A F W L V D L L E T A G Y

870 900
 GAGGGCGCGGGCACTTGGACTTCAAGCGCGCGGGACCGAGGACTTGGACGGCGTGTGG
 E G P R H F D F K P P R T E D F D G V W

930 960
 GCGTGGCGCGGGGCTGCATGGCAACTACCTGATCCTCAAGGAOOGTGGCGCGCGCTTC
 A S A A G C M R N Y L I L K D R A A A F

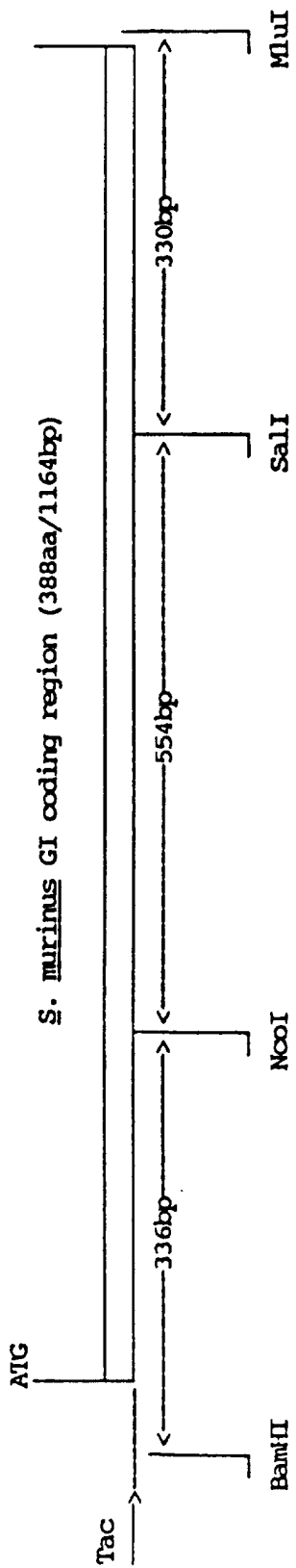
990 1020
 CGTGGCGAOCGGAGGTGCAGGAGGGCGCTGGTGGCGCGCGTCTGGACCCAGCTGGCGCCAG
 R A D P E V Q E A L R A A R L D Q L A Q

1050 1080
 CGAOCGGCGCGAOCGGCTTGAAGCGCGCTGGCGCGAOCGGCGCGGGGTTCGAGGACTTC
 P T A A D G L D A L L A D R A A F E D F

1110 1140
 GACGTGGATGGCGCGCGCGCGGGTATGGGTGGAGCACCTGGACCCAGCTGGCGATG
 D V D A A A A R G M A F E H L D Q L A M

GACCACTGCTGGCGCGCGGGC
 D H L L G A R G

Фиг.19 (продължение)



Фиг. 20

	160	170	180	190	200
Ami	V S A A L D R Y R E A L N L L A Q Y S E D R G Y G L R F A I E P K P N E P R G D I L L P T A G H A I				
Amp	G				
Art	L A	M G V D T A G I K K N I L		F	V G L
Smi	R D	M K F D G E V T A Q Q D			V L
Svn	R D	M K F D G E V T A Q Q D			V L
Svr	R D	M K F D G E V T E Q Q D K			V L
Sth	R	M K F D G E V T S Q D I			V L
	210	220	230	240	250
Ami	A F V Q E L E R P E L F G I N P E T G H E Q M S N L N F T Q G I A Q A L W H K K L F H I D L N G Q H				
Amp					
Art	I E Q H G D I V L		H	A E	R
Smi	I E R Y V V		PH	AG	S
Svn	I E R Y V V		PH	AG	S
Svr	I E R Y V V		PH	AG	S
Sth	I E R Y V V		PH	AG	S
	260	270	280	290	300
Ami	G P K F D Q D L V F G H G D L L N A F S L V D L L E N G - P D G A P A Y D G P R H F D Y K P S R T E D				
Amp					
Art	I Y	R A	T S F T	F N G K T	D G
Smi	I Y	R A	R A W	T A - - - -	F P
Svn	I Y	R A	R A W	S A - - - -	F P
Svr	I Y	R A	R A W	R A - - - -	F P
Sth	I Y	R A	R A W	S S - - - -	F P

Фиг. 21 (продължение 1)