

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

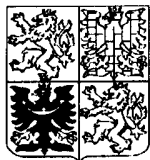
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1273-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **01. 11. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.11.95, 02.11.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/9522407,
95GB/9502588**

(33) Země priority: **GB, WO**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13. 01. 99**
(Věstník č. 1/99)

(86) PCT číslo: **PCT/GB96/02693**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/16553**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/53
C 12 N	9/02
C 12 P	7/22
C 12 P	7/02

(71) Přihlášovatel:

BG PLC, Reading, GB;

(72) Původce:

Wong Luet-Lok, Oxford, GB;

Flitsch Sabine Lahja, Edinburgh, GB;

Nickerson Darren Paul, Oxford, GB;

Hart Alwyn James, Loughborough, GB;

(74) Zástupce:

**Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,
11000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

Mutantní formy monooxygenázy cytochrom P450cam

(57) Anotace:

**Mutant monooxygenázy cytochrom P450cam,
kde je cysteinový zbytek v pozici 334 odstraněn.**

CZ 1273-98 A3

Oblast techniky

Vynález se týká mutantní formy monooxygenázy cytochrom P450.

Dosavadní stav techniky

Monooxygenáza katalyzuje selektivní oxidaci aktivovaných a neaktivovaných vazeb uhlík-vodík pomocí kyslíku, viz. de Montellano O. P. R. a editoři "Cytochrome P-450: Structure, Mechanism, and Biochemistry", Plenum Press, New York, 1986. Z tohoto důvodu je to také enzym s potenciálně velkým významem pro organickou syntézu. Využití zmíněného enzymu v této oblasti dosud bránily těžkosti v získávání dostatečného množství vlastní monooxygenázy a/nebo se získáváním asociovaných proteinových elektronových přenašečů. Navzdory tomu, že jsou dostupné aminokyselinové sekvence více než 150 různých monooxygenáz cytochrom P450, doposud jsou k dispozici strukturální údaje pouze u tří z nich, viz. Poulos T. L., Finzel B. C. a Howard A. J., J. Mol. Biol., 1987, 195, strana 687 až 700; Hasemann C. A., Ravichandran K. G., Peterson J. A. a Deisenhofer J., J. Mol. Biol., 1994, 236, strana 1169 až 1185; Ravichandran K. G., Boddupalli S. S., Hasemann C. A., Peterson J. A. a Deisenhofer J., Science, 1993, 261, strana 731 až 736. Některé z těchto enzymů byly úspěšně exprimovány v bakteriálních systémech, viz. Unger B. P., Gunsalus I. C. a Sligar S. G., J. Biol. Chem., 1986, 261, strana 1158 až 1163; Miles J. S., Munro A. W., Rospendowski B. N., Smith W. E., McKnight J. a Thomson A. J., Biochem. J., 1992,

288, strana 503 až 509; Richardson T. H., Hsu M. J., Kronbach T., Bames H. J., Chan G., Waterman M. R., Kemper B. a Johnson E. F., Arch. Biochem. Biophys., 1993, 300, strana 510 až 516; Boddupalli S. S., Oster T., Estabrook R. W. a Peterson J. A., J. Biol. Chem., 1992, 267, strana 10375 až 10380; Li H., Darish K. a Poulos T. L., J. Biol. Chem., 1991, 266, strana 11909 až 11914.

Jedna z monooxygenáz cytochrom P450, která je rozpustná a může být exprimována v dostatečném množství, je vysoce specifická P-450cam z *P. putida*, která katalyzuje polohově a stereo-selektivní hydroxylaci kafru na 5-exo-hydroxykafr, viz. Gunsalus I. C. a Wagner G. C., Methods Enzymol., 1978, 52, strana 166 až 188. Byla určena krystalová struktura P-450cam s vysokým rozlišením, viz. Poulos T. L. a další; J. Mol. Biol. 1987. Vzhledem k tomu, že se předpokládá velmi podobný mechanismus účinku tohoto bakteriálního enzymu stejně jako jeho savčího protějšku, byl tento bakteriální enzym použit jako základ, na kterém jsou založeny strukturální modely savčích enzymů.

Byla také popsána nukleotidová a z ní odvozená aminokyselínová sekvence P-450cam, viz. Unger B. P. a další, J. Biol. Chem., 1986; Miles J. S. a další; Biochem. J., 1992; Richardson T. H. a další, Arch. Biochem. Biophys., 1993; Boddupalli S. S. a další, J. Biol. Chem., 1992; Li H. a další, J. Biol. Chem., 1991; Haniu M., Armes L. G., Yasunobu K. T., Shastry B. A. a Gunsalus I. C., Biol. Chem., 1982, 257, strana 12664 až 12671. Je známá také lokalizace aktivního místa enzymu a rovněž jsou známy vztahy mezi jeho strukturou a funkcí. Byly popsány mutantní formy P-450cam, s mutacemi v polohách 101 a 185 a v polohách 247 a 295, viz. Loida P. J. a Sligar S. G., Biochemistry, 1993, 32, strana 11530 až 11538; Loida P. J. a Sligar S. G., Protein Eng., 1993, 6, strana 207 až 212; Atkins W. M. a Sligar S. G., J. Am. Chem.

Soc., 1989, 111, strana 2715 až 2717; a v poloze 87, viz. Tuck S. F., Graham-Lorence S., Peterson J. A. a Ortiz de Montellano P. R., J. Biol. Chem., 1993, 268, strana 269 až 275. Byla rovněž popsána mutantní forma tohoto enzymu, kde byl tyrosin v poloze 96 (Y96) nahrazen fenylalaninem 96 (mutant Y96F) viz. Atkins W. M. a Sligar S. G., J. Am. Chem. Soc., 1989, 111, strana 2715 až 2717; Di Prime C., Hui Bin Hoa G., Douzou P. a Sligar S. G., J. Biol. Chem., 1990, 265, strana 5361 až 5363; Atkins W. M. a Sligar S. G., J. Biol. Chem., 1988, 263, strana 18842 až 18849; Atkins W. M. a Sligar S. G., Biochemistry, 1990, 29, strana 1271 až 1275. Ve všech uvedených případech jsou popisovány účinky mutací na oxidační reakce molekul, které byly již dříve známy jako substráty pro přirozeně se vyskytující formu enzymu (wild-type enzyme). Ze stavu techniky však není známo, jak mohou být mutantní formy enzymu využity jako biokatalyzátory pro oxidaci jiných, nových a nezvyklých substrátů.

Ve snaze vyvinout nové biokatalyzátory byl navržen projekt, jehož cílem bylo pozměnit P-450cam tak, aby byl tento enzym schopen účinněji provádět specifické oxidace organických molekul, nezávisle na tom, jsou-li nebo nejsou substráty pro přirozeně se vyskytující formu tohoto enzymu.

Trojrozměrná struktura P-450cam vykazuje aktivní místo, které je pomocí van der Waalsových sil v těsném kontaktu s hydrofobními skupinami kafru (viz. obrázek 1). Zvláště významné jsou interakce mezi kafrem a postranními řetězcí leucinu 244, valinu 247 a valinu 295. Tři aromatické zbytky (Y96, F87 a F98) jsou seskupeny tak, že lemuji kapsu pro vazbu substrátu a společně s vodíkovou vazbou mezi tyrosinem 96 a karbonylovým kyslíkem kafru udržují substrát ve správné orientaci tak, aby byla zajištěna správná polohová a stereospecifita reakce.

Lipscomb a spolupracovníci (viz. Lipscomb J. D., Harrison J. E., Dus K. M. a Gunsalus I. C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, 83, strana 771 až 778) v roce 1978 prokázali, že přirozeně se vyskytující forma enzymu P-450cam vykazuje tendenci k dimerizaci, ale dále uvádějí, že nelze rozlišit katalytickou aktivitu monomerního a dimerního enzymu ve vztahu k oxidaci kafru. Vzhledem k tomu, že dimerizace může být zvrácena za použití činidel redukujících thiolové skupiny, došli autoři k závěru, že dimery jsou tvořeny pomocí intermolekulárních cysteinových disulfidových můstků (S-S). Autoři však nebyli schopni určit, zda se dimerizace účastní jeden nebo více cysteinů v jedné molekule P-450cam. Rovněž nebyli schopni identifikovat cysteinový zbytek (či zbytky), které se na této reakci podílely, protože v té době ještě nebyla známa ani aminokyselinová sekvence, ani krystalová struktura P-450cam.

K objasnění pravděpodobných vlivů bodových mutací tří aromatických aminokyselinových zbytků (Y96, F87 a F98) v kapse aktivního místa enzymu bylo použito molekulového modelování. Náhradou jakéhokoliv z těchto aromatických zbytků za menší, hydrofobní, nearomatický postranní řetězec dojde ke vzniku „aromatické kapsy“, která by mohla vázat hydrofobnější substráty. Pro výpočet energie interakce mezi aromatickou sondou a možnými mutanty monooxygenázy cytochrom P-450, kde byly uvedené zbytky zaměněny za alanin (F87A, Y96A a F98A) byl použit program GRID, viz. Goodford P. J., *J. Med. Chem.*, 1985, 28, strana 849 až 857. Výsledky byly dále zpracovány graficky za použití programového balíku Quanta (Quanta 4.0, Molecular Simulations Inc., 16 New England Executive Park, Burlington, MA 01803-5297) pro molekulové modelování.

Zdá se, že mutant F98A jeví nejsilnější vazebnou interakci v aktivním místě dostupném pro aromatickou sondu, za-

tímco pro Y96A je tato interakce mírně slabší a pro poslední zmíněný mutant, F87A, je významně nejnižší. Pro první pokusy bylo rozhodnuto, že se zamění tyrosin 96 za alanin, protože tento je umístěn blíže ke středu vazebné kapsy, zatímco fenylalanin 98 je umístěn blíže k jednomu z okrajů. Také odstranění tyrosinu 96 zřejmě snižuje specifitu enzymu ke kofaktoru, což je způsobeno ztrátou možnosti vzniku vodíkových vazeb se substrátem.

Podstata vynálezu

Vynález popisuje mutantní formu monooxygenázy cytochrom P-450cam, kde je v poloze 334 odstraněn cysteinový zbytek.

Ve výhodném uspořádání vynálezu je odstranění provedeno pomocí substituce cysteinového zbytku libovolnou jinou aminokyselinou (mimo cysteinu).

V jiném provedení vynálezu může být cysteinový zbytek 344 odstraněn delecí tohoto aminokyselinového zbytku z enzymu.

V jiném provedení vynálezu může být také tyrosinový zbytek v pozici 96 v mutantní formě nahrazen jakýmkoli aminokyselinovým zbytkem mimo tyrosinu.

Ve výhodném uspořádání může být pro substituci vhodná aminokyselina vybrána z následujících: alanin, arginin, asparagin, kyselina asparagová, cystein, kyselina glutamová, glutamin, glycin, histidin, isoleucin, leucin, lysin, methionin, prolin, serin, threonin, tryptofan, tyrosin a valin, s tím, že pro případ výměny cysteinu v pozici 334, nemůže být nahrazující aminokyselinou cystein a v případě tyrosinu v poloze 96 nemůže být nahrazující aminokyselinou tyrosin.

V dalším výhodném provedení vynálezu je aminokyselinový zbytek v jedné nebo ve více z následujících pozic: 87, 98,

101, 185, 193, 244, 247, 295, 297, 395 a 396 zaměněn jiným aminokyselinovým zbytkem.

Pomocí modelovacího programu Quanta byla zkoumána struktura P-450cam vytvořená z publikovaných krystalografických atomových souřadnic. Bylo zjištěno, že existuje pět cysteinů v blízkosti povrchu P-450cam (cysteiny 58, 85, 136, 148, 334), které se mohou účastnit vytváření intermolekulárních disulfidických vazeb, které pak vedou k tvorbě proteinových dimerů. Byla provedena místně specifická mutagenese tak, aby byl substituován každý z těchto výše zmíněných cysteinů za alanin. Vzniklo tak pět mutantních forem enzymu s „povrchovou“ mutací Cys-Ala („povrchové mutanty“).

Byl zkoumán rozsah proteinové dimerizace vyskytující se u přirozeného typu P-450cam a u pěti „povrchových mutantů“ Cys-Ala. Přítomnost dimeru byla stanovena jak pomocí anexové „fast“ kapalinové chromatografie na sloupci Resource-Q (Pharmacia), tak gelovou filtrací na molekulovém sítu sloupce Superose 12 (Pharmacia), a to u přirozeně se vyskytujícího typu P-450cam a u mutantních forem C58A, C85A, C136A a C148A. U mutantní formy C334A (viz. obrázek 2) nebyl zjištěn žádný dimer ani při vysoké koncentraci (v rozsahu 0,1 mM). Došli jsme tudíž k závěru, že přirozeně se vyskytující P-450cam dimerizuje intermolekulárními S-S disulfidovými vazbami mezi povrchovými cysteiny 334 na dvou molekulách proteinu.

Mutace v pozici C334A má jasně viditelný účinek na odstranění nežádoucí dimerizace proteinu, v roztoku byly vždy přítomny jen monomerní molekuly enzymu. Dále byl zaznamenán zcela neočekávaný další výhodný rys této mutace. Tak jako všechny proteiny, přirozeně se vyskytující P-450cam vykazuje po určité době stání agregaci molekul. Důvod, proč dochází k agregaci proteinů není jasný, ale agregáty P-450cam jsou nerozpustné a katalyticky neaktivní. U přirozeně se vyskytu-

jícího P-450cam, jakož i u mutantních forem C58A, C85A, C136A a C148A, dochází během skladování při teplotě 4°C a dokonce i při skladování v 50% glycerolu při teplotě -20°C k dimerizaci a dále také agregaci molekul. Agregace se také vyskytuje během katalytické funkce enzymu, zvláště při vyšších koncentracích P-450cam, které jsou nutné pro ekonomicky realizovatelné průmyslové aplikace, jako jsou například syntézy organických molekul. U mutantní formy C334A nebyla prokázána tvorba agregátů, dokonce ani při použití milimolárních koncentrací po dobu tří dnů a při pokojové teplotě. Lze tedy odvodit, že mutace v pozici C334A má výhodný vliv na práci s těmito proteiny, na jejich skladování a prodloužení doby jejich katalytického účinku.

Věříme, že mutace v pozici 96 je klíčová pro schopnost mutované formy enzymu katalyzovat oxidaci relativně širokého okruhu organických substrátů. Další aminokyseliny sousedící s aktivním místem enzymu mohou být rovněž mutovány tak, aby změnilly tvar a specifitu aktivního místa. Těmito aminokyselinami jsou zbytky v pozicích: 87, 98, 101, 185, 193, 244, 247, 295, 297, 395 a 396. Předpokládá se, že aminokyseliny v jedné nebo více z těchto pozic mohou být nahrazeny buď malou hydrofobní aminokyselinou, čímž lze zvětšit aktivní místo enzymu, či velkou hydrofobní aminokyselinou, což vede ke zmenšení velikosti aktivního místa. Dále může jít o náhradu aminokyselinou s aromatickým kruhem, který může interagovat s odpovídajícím aromatickým kruhem substrátu.

Podmínky oxidačních reakcí jsou popsány v příložených literárních odkazech. Typický enzymový systém většinou ještě zahrnuje, spolu s mutovanou formou enzymu, putidaredoxin a putidaredoxinreduktázu s NADH jako kofaktory. Příklad oxidace cyklohexylbenzenu je popsán dále v experimentální části. Dále jsou popsány rovněž příklady různých typů uvažovaných organických sloučenin. Zjistili jsme, že přirozeně se vysky-

tující P-450cam je aktivní při oxidaci velkého počtu molekul popsaných v následujících sekcích. Avšak ve všech případech vykazovala mutovaná forma P-450cam mnohem vyšší aktivitu při přeměně substrátu.

- i) Organickou sloučeninou se rozumí aromatická sloučenina, buď uhlovodík nebo jiná sloučenina použitá za podmínek, při kterých nedochází k inaktivaci nebo denaturaci enzymu. Jelikož mutace byla provedena se záměrem vytvořit v aktivním centru enzymu enzymovou kapsu vázající aromáty, mutovaná forma enzymu je schopná katalyzovat oxidaci širokého spektra organických sloučenin. Příklady oxidace aromatických a polyaromatických sloučenin jsou popsány dále v experimentální části. Oxidace těchto sloučenin je celkem překvapivá, vzhledem k tomu, že je známo, že přirozeně se vyskytující forma enzymu je schopna oxidovat pouze sloučeniny strukturálně odvozené od kafru a vykazuje nízkou aktivitu vůči několika dalším molekulám, jako je styren, viz. Fruetet J. A., Collins J. R., Camper D. L., Loew G. H. a Ortiz de Montallano P. R., J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, strana 6987 až 6993; etylbenzen, viz. Loida P. J. a Sligar S. G., Biochemistry, 1993, 32, strana 11530 až 11538; Loida P. J. a Sligar S. G., Protein Eng., 1993, 6, strana 207 až 212, deriváty tetralonu, viz. Watanabe T. a Ishimura Y. J., Am. Chem. Sec. 1989, 111, strana 410 až 411; a nikotin, viz. Jones J. P., Trager W. F. a Carlson T. J., J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, strana 381 až 387.
- ii) Organickou sloučeninou může být též uhlovodík, například alifatický či alicyklický uhlovodík, který nese funkční skupinu (viz. schéma 1). Před vlastní oxidační reakcí je aromatická chránicí skupina navázána na funkční skupinu

a po proběhnutí oxidační reakce je (zmíněná chránicí skupina) z funkční skupiny odstraněna. Vhodnou chránicí skupinou se jeví benzylová skupina. Chránicí skupiny slouží ke dvěma účelům - jednak činí substrát více hydrofobní a tím zesilují jeho vazbu k hydrofobní kapse enzymu, a za druhé pomáhají držet substrát na místě v aktivním centru enzymu. Tak lze použitím vhodných aromatických chránicích skupin dosáhnout jak polohově specifické tak prostorově selektivní hydroxylace substrátu. Příklady uhlovodíků s jednou funkční skupinou jsou deriváty cyklohexanu, cyklopentanu a alkylů (viz. schéma 1). Oxidační produkty těchto sloučenin jsou cenným výchozím materiálem pro organické syntézy, zvláště jsou-li produkovány v chirálně homogenní formě. Mezi používané chránicí skupiny patří například benzyl- nebo naftylethery, či benzoylethery a amidy (viz. schéma 1). Významné jsou také benzoxazolové skupiny, které jsou vhodné jako skupiny chránicí karboxyl a N-benzyloxazolidinové skupiny, které slouží k ochraně aldehydových skupin. Oba typy chránicích skupin mohou být po proběhnutí enzymové oxidace lehce odstraněny a byly popsány v literatuře zabývající se mikrobiální oxidací aldehydů a kyselin, viz. Davis H. G., Green R. H., Kelly D. R. a Roberts S. M.: "Biotransformation in Preparative Organic Chemistry", Academic Press, London, 1989, strana 169 ff.

- iii) Organickou sloučeninou je dále alifatický nebo alicyklický uhlovodík C₄ až C₁₂. Oxidace cyklohexanu a lineárních a větvených uhlovodíků je popsána dále v experimentální části. Bylo zjištěno, že pro oxidaci těchto molekul lze také použít přirozeně se vyskytující formu enzymu P-450cam, ale její aktivity jsou nízké a mutantní formy vykazovaly ve všech případech podstatně

21.10.98

vyšší aktivity.

iv) Organická sloučenina může také být halogenovaný alifatický nebo alicyklický uhlovodík. Oxidace lindanu (hexachlorocyklohexanu) je popsána níže.

Byly vytvořeny i mutanty enzymu, kde je substituce v aktivním centru kombinovaná s povrchovou mutací. U těchto mutantů je cystein v pozici 334 nahrazen alaninem a místo tyrosinu v pozici 96 (Y96) obsahují alanin, leucin, valin nebo fenylalanin. Nakonec bylo zkombinováno několik mutací v aktivním místě a zmíněná mutace na povrchu enzymu a byly tak vytvořeny mutantní formy enzymu s násobnými mutacemi. Geny kódující cytochrom P-450cam a jeho přirozené partnery při přenosu elektronů putidaredoxin a putidaredoxinreduktázu byly amplifikovány za využití polymerázové řetězové reakce (PCR) z celkové buněčné DNA vyizolované z *P. putida*. Dále byly použity následující kombinace expresivního vektoru a hostitelského kmene *E. coli*: vektor pRH1091 (viz. Baldwin J. E., Blackburn J. M., Heath R. J. a Sutherland J. D., *Bioorg. Med. Chem. Letts.* 1992, 2, strana 663 až 668) ve kmeni JM109 pro P-450cam; vektor pUC118 ve kmeni JM109 pro putidaredoxin; a vektor pGL W11 ve kmeni DH5 pro putidaredoxinreduktázu. Cílená mutagenese pomocí oligonukleotidů byla provedena za použití subklonu M13 mp postupem podle Zollera a Smitha (viz. Zoller M. J. a Smith M., *Nucleic Acids Res.*, 1982, 10, strana 6487 až 6500). Selekcce mutantů byla prováděna metodou podle Kunkela (viz. Kunkel T. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82, strana 488 až 492).

Vazba potenciálních substrátů byla zkoumána pomocí spektrofotometrických metod. Přirozeně se vyskytující enzym se vyskytuje v hexakoordinované nízkospinové formě se slabě vázanou vodou na šestém koordinačním místě a vykazuje charak-

teristické Soretovo maximum při vlnové délce 418 nm. Vazbou kofaktoru a analogických substrátů jako adamantanonu, adamantanu a norbonanu dojde ke změně hemového kruhu na pentakoordinovanou vysokospinovou formu, která má charakteristický Soretův pás při 392 nm. Tento posuv spinového stavu hemu je doprovázen zvýšením redukčního potenciálu hemu, což umožňuje fyziologický přenos elektronů z putidaredoxinu za současné redukce P-450cam a iniciuje tak katalytický hydroxylační cyklus, viz. Sligar S. G. a Gunsalus I. C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1976, 73, strana 1078 až 1082. Posun spinového stavu hemu je tak kvalitativním ukazatelem pravděpodobnosti, že molekuly uvedené v Tabulce 1 a 2 jsou oxidovány pomocí přirozeně se vyskytujícího se typu P-450cam respektive pomocí jeho mutantních forem.

Příklady provedení vynálezu

Pufrovaný roztok (50mM Tris.HCl, pH 7,4), obvykle o objemu 3 ml, obsahující 10 μ M putidaredoxin, 2 μ M putidaredoxinreduktázu, 1 μ M monooxygenázu cytochrom P-450cam (přirozeně se vyskytující typ nebo mutantní formu), 200 mM KCl, 50 μ g/ml hovězí jaterní katalázy (Sigma) a 1 mM cílovou organickou sloučeninu jakou je například cyklohexylbenzen (přidaný jako 0,1 M zásobní roztok v ethanolu) byl inkubován při teplotě 30°C po dobu pěti minut. Enzymová reakce byla odstartována přidáním NADH do výsledné koncentrace 2 mM. V desetiminutových intervalech byly přidány čtyři alikvoty NADH ke zvýšení jeho koncentrace vždy o 1 mM. Po třiceti minutách inkubace byl rovněž přidán jeden alikvot substrátu tak, aby jeho koncentrace vzrostla o 1 mM. Reakce byla zastavena po 60 minutách přidáním 0,5 ml chloroformu a vortexováním směsi. Fáze byly odděleny centrifugací (4000 x g)

21.10.98

při 4°C. Chloroformová vrstva byla analyzována plynovou chromatografií.

Co se týká množství substrátových sloučenin jako je například cyklohexylbenzen, u kterých nejsou komerčně dostupné všechny produkty oxidace pomocí P-450cam, chloroformové extrakty se odpaří do sucha pod proudem dusíku. Zbytky po odpaření se extrahují hexanem a oxidační produkty se dělí vysokotlakou kapalinovou chromatografií, pomocí eluce v gradientu hexan/isopropanol. Přečištěné produkty jsou potom identifikovány pomocí hmotnostní spektroskopie a zvláště pak pomocí magnetické rezonanční spektroskopie.

Pro různé substráty, které se liší svou rozpustností ve vodném pufru se liší množství substrátu přidané do inkubačních směsí. Koncentrace se mění v rozsahu od 0,2 do 4 mM výsledné koncentrace substrátu. Koncentrace NADH se měří spektrofotometricky absorbancí při 340 nm, ve všech případech se v průběhu inkubace přidávalo další množství substrátu i NADH.

Užitím výše zmíněných experimentálních způsobů, původci vynálezu prověřili velký počet organických sloučenin, které by mohly sloužit jako substráty jak pro přirozeně se vyskytující formu enzymu P-450cam, tak pro mutovanou verzi enzymu Y96A. Vynález zahrnuje mutanty označené Y96V, Y96L, Y96f, C334A, kombinovaný mutant F87A-Y96G-F193A a mutanty s kombinací mutací v aktivním místě a na povrchu enzymu Y96A-C334A, Y96V-C334A, Y96L-C334A, Y96F-C334A a F87A-Y96G-F193A-C334A. Výsledky pro mutantní formy C334A a C334A-Y96A jsou shrnuty v Tabulkách 1 a 2, kde jsou strukturně podobné molekuly uvedeny ve společných skupinách.

Tabulka 1 popisuje spotřebu NADH pro oxidační reakci malých lineárních, větvených a cyklických uhlovodíků za použití mutované formy enzymu Y96A-C334A. Tabulky 2(a) až 2(h) popisuje detaily o rozdělení produktů jednotlivých mutant-

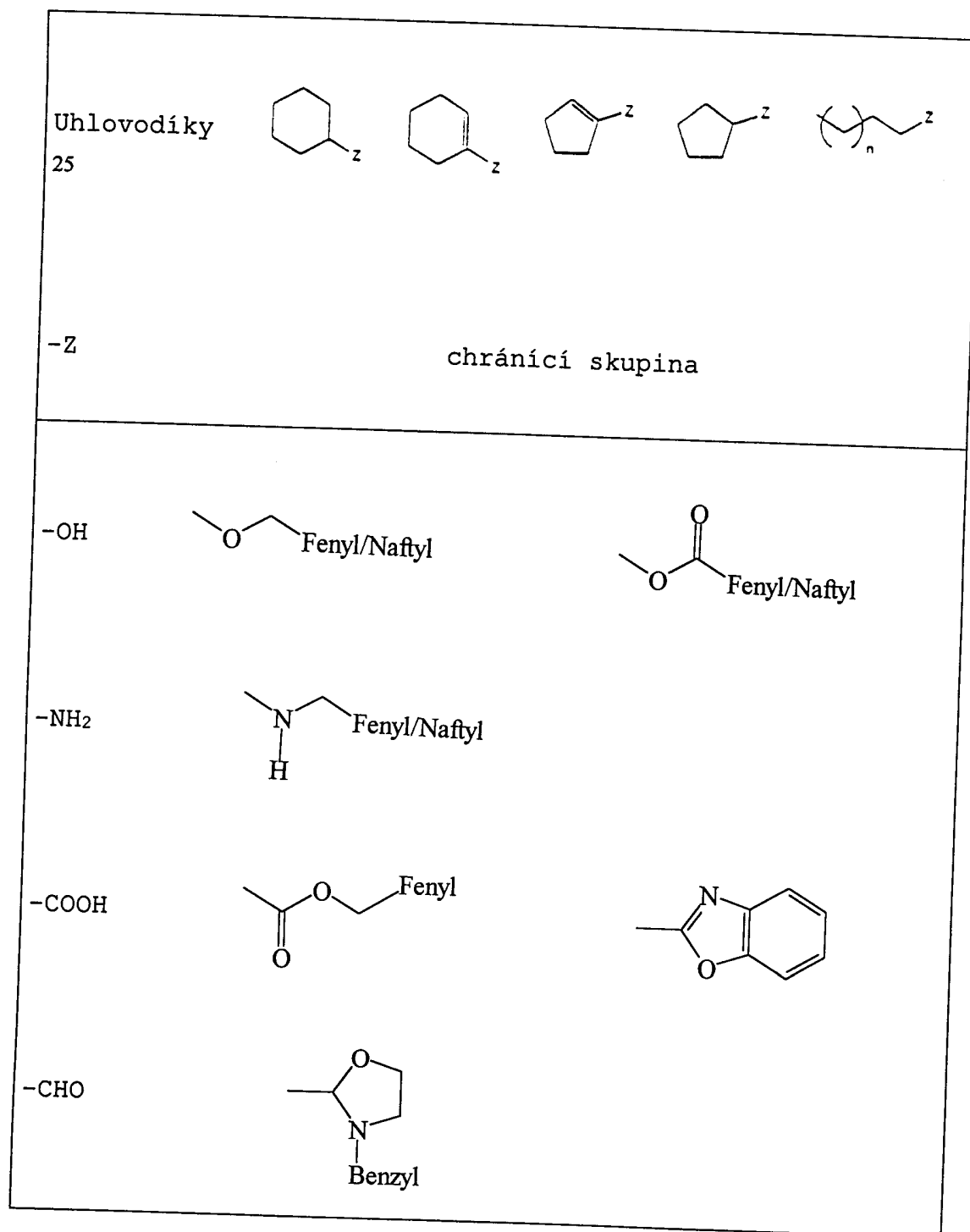
21.10.98

ních forem enzymu a vhodné kombinace substrátů pro tyto enzymy tam, kde jsou tyto údaje známy.

Cysteinový zbytek v pozici 344 může být odstraněn pomocí všech volně dostupných standardních způsobů známých ze stavu techniky, a proto zde není jeho odstranění podrobně popsáno.

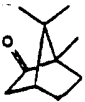
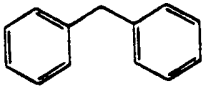
21.10.98

Schéma 1



21.10.98

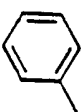
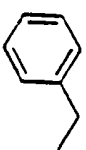
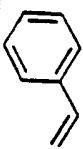
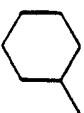
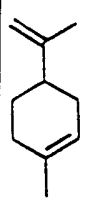
Tabulka 1

		K_{app} (μM) ^a	
		WT	Y96A
	1	6,3	12
	2	12	28
	3	8,4	1,4
	4	330	92
	5	>1500 ^b	73

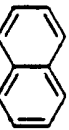
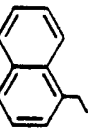
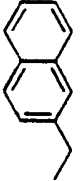
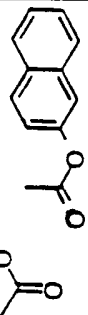
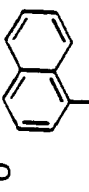
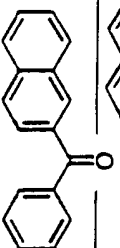
^a Hodnoty jsou průměrem dvou nezávislých měření za použití metody podle Sligara (Sligar S. G., Biochemistry, 1976, 15, strana 5399 až 5406). Hodnota K_{app} silně závisí na koncentraci iontů K^+ v pufru. Při hodnotách $[\text{K}^+] > 150 \text{ mM}$ je K_{app} pro kafr 0,6 μM jak pro enzym divokého typu tak pro mutant Y96A. Dat v této tabulce byla stanovována při $[\text{K}^+] = 70 \text{ mM}$ ve fosfátovém pufru o pH 7,4 proto, aby se zabránilo vysolení substrátů při vyšších koncentracích iontů.

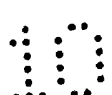
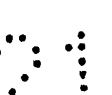
^b Nebylo dosaženo saturace.

Tabulka 2 (a)

Podskupina : 1 kruh		Divoký typ		Mutant Y96A		Divoký typ		Mutant Y96A	
		Aspinu vysokospinový/ nízkospinový	Vs DTT	Aspinu vysokospinový/ nízkospinový	Vs DTT	Přeměna NADH?	GC?	Přeměna NADH?	GC?
	Benzen	-	-	-	-				
	Toluen	-	-	30	30				
	Ethylbenzen	-	-	40	40				
	Styren	-	-	30	30				
	Cyklohexen	-	5	40	40				
	1,3-cyklohexadien	nd	nd	nd	nd				
	1,4-cyklohexadien	-	5	15	20				
	Cyklohexan	-	-	60	60			+	
	Hexan	-	-	70	60			+	
	Methylcyklohexan	50	50	100	70				
	(S) - (+) - Karvon	10	60	10	80				

Tabulka 2 (b)

Podkupina: 2 kruhy, naftalen		Divoký typ		Mutant Y96A		Divoký typ		Mutant Y96A	
		Δspinu vysokospinový/ nízkospinový	Vs DTT	Δspinu vysokospinový/ nízkospinový	Vs DTT	Přeměna NADH?	GC?	Přeměna NADH?	GC?
	Naftalen	-	-	15	20				
	1-ethylnaftalen	-	-	5	20				
	2-ethylnaftalen	-	-	10	20				
	2-naftylnacetát	-	5	-	5				
	1-naftylnacetát	-	5	-	5				
	1-naftylnpropionát	-	20	0	20				
	1-naftylnbutyrát	-	5	-	5				
	Naftylnfenylnketon	-	5	-	5				
	1,2-dihydronaftalen	5	20	30	90				
	1,2,3,4,-tetrahydro-naftalen	5	10	40	40				








Interakce P450cam-substrát

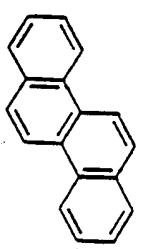
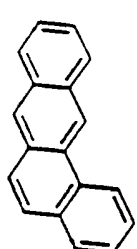
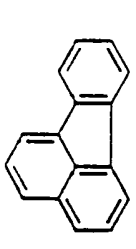
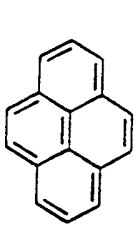
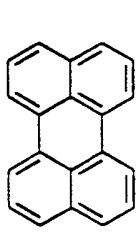
Tabulka 2(c)

Podskupina: 2 kruhy, DEM		Divoký typ		Mutant Y96A		Divoký typ		Mutant Y96A	
		Aspinu vysokospinový/ nízkospinový	Vs DTT	Aspinu vysokospinový/ nízkospinový	Vs DTT	Přeměna NADH?	GC?	Přeměna NADH?	GC?
	Difenylmethan	-	5	45	nd			+	+
	Difenylether	10	5	20	50				
	Benzoftenon	-	20	-	20				
	Cyklohexylfenyliketon	-	30	60	nd				
	Fenylbenzoát	-	5	-	-				
	N-fenylbenzylamin	-	5	45	nd				
	Bibenzyl	-	-	55	55				
	cis-Stilben	-	20	40	50				
	Bifenylyl	-	20	-	90				
	Cyklohexylbenzen	20	20	80	nd				
	trans-stilben	-	-	-	-				
	Benzylether	-	5	55	nd				

21.10.2022

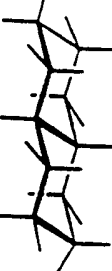
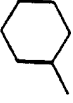
Interakce P450cam-substrát

Tabulka 2(e)

Podskupina: 4, 5 kruhů		Divoký typ		Mutant Y96A		Divoký typ		Mutant Y96A	
		Δspinu vysokospinový/ nízkospinový	Vs DTT	Δspinu vysokospinový/ nízkospinový	Vs DTT	Přeměna NADH?	GC?	Přeměna NADH?	GC?
	Chrysen	-	-	-	-				
	1,2-benzanthracen	-	-	-	-				
	Fluoranthen	-	5	20	10				
	Pyren	-	-	-	-				
	Perylen	-	-	-	-				

Interakce P450cam-substrát

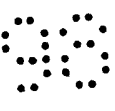
Tabulka 2(f)

Podskupina: Cyklické alky	Divoký typ		Mutant Y96A		Divoký typ		Mutant Y96A	
	Δ spinu vysokospinový/ nizkospinový	Vs DTT	Δ spinu vysokospinový/ nizkospinový	Vs DTT	Přeměna NADH?	GC?	Přeměna NADH?	GC?
 <i>cis</i> - dekahydronaftalen	nd	nd	nd	nd				
 <i>trans</i> - dekahydronaftalen	20	10	90	70				
 Cyklohexan	-	-	60	60			+	
 Methylcyklohexan	50	50	100	70				

Interakce P450cam-substrát

Tabulka 2 (g)

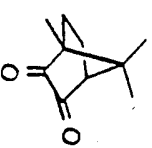
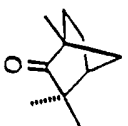
Podskupina: n-alkany		Divoký typ		Mutant Y96A		Divoký typ		Mutant Y96A	
		Aspinu vysokospinový/ nízkospinový	Vs DTT	Aspinu vysokospinový/ nízkospinový	Vs DTT	Přeměna NADH?	GC?	Přeměna NADH?	GC?
	n-pentan	-	5	55	40			+	
	n-hexan	-	-	60	40			+	
	n-heptan	5	5	60	40			+	
	n-oktan	-	5	80	45			+	
	n-nonan	-	-	70	45			+	
	n-dekan	nd	nd	nd	nd				
	n-undekan	nd	nd	20	20				
	n-dodekan	nd	nd	5	5				
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$	n-hexadekan	-	-	-	-				
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$	n-heptadekan	-	-	-	-				
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\cdot\text{Na}$	SDS	-	20	-	60				
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	kyselina oleová	-	10?	-	20_				
$[(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-]_2$	skvalen	-	-	-	20				
	isopren	-	-	10	10				






Interakce P450cam-substrát

Tabulka 2(h)

Podskupina: Podobné kafru	Divoký typ		Mutant Y96A		Divoký typ		Mutant Y96A	
	Δ spinu vysokospinový/ nízkospinový	Vs DTT	Δ spinu vysokospinový/ nízkospinový	Vs DTT	Přeměna NADH?	GC?	Přeměna NADH?	GC?
	(1R) - (-) -Kaferochinon 80	80	80	80				
	(1R) - (-) -Fenchon 40	70	50	80				
	Dicyklopentadien 50	80	90	90				

21.10.98

Tabulka 3

Přeměna alkanů působením mutantů P450cam

Všechny mutanty zmíněné níže obsahují rovněž mutaci C344A.

Rychlost přeměny byla stanovována jako úbytek NADH (nmol NADH/nmol P450cam/s).

Substrát:			
Délka hlavního řetězce	Název	Divoký typ	Y96A
C4	n-butan	-	-
C4	2-methylbutan	pozadí	4,6
C4	2,3-dimethylbutan	pozadí	16,8
C4	2,2-dimethylbutan	pozadí	14,0
C5	n-pentan	pozadí	5,8
C5	2-methylpentan	3,8	11,7
C5	3-methylpentan	1,3	14,2
C5	2,4-dimethylpentan	0,2	12,6
C5	2,2-dimethylpentan	5,2	12,8
C5	2,2,4-trimethyl pentan	0,9	5,3
C5	3-ethylpentan	pozadí	16,2
C6	n-hexan	pozadí	6,0
C6	2-methylhexan	pozadí	10,6
C7	n-heptan	2,7	4,4
C7	2-methylheptan	pozadí	2,1
C7	4-methylheptan	1,4	10,2
C8	n-oktan	pozadí	5,8
C7	cykloheptan	4,4	42,5

Struktury produktů a rozmístění funkčních skupin po oxidaci substrátů pomocí mutantů aktivního místa P450cam. "pozadí" - typické pozadí rychlosti oxidace NADH je 0,07 nmol NADH (nmol P450cam)⁻¹sek⁻¹

Tabulka 4 (a)

Struktura produktů a rozmištění funkčních skupin po oxidaci substrátů pomocí mutantů aktivního místa P450cam. Všechny mutanty zobrazené níže obsahují rovněž mutaci C344A.

Produkty cyklohexylbenzenu		Produkty (v procentech) pro jednotlivé mutanty:				
		WT	Y96A	Y96F	Y96L	Y96V
 D nebo L	3-ol	43	20	54	38	28
	3-ol	20	20	27	23	39
	L nebo D					
	trans-4-ol	25	15	6	23	10
	cis-4-ol	12	45	13	16	23
Celkové množství produktů (plocha/10 ⁵)		0,8	7,4	1,1	10,4	12,5

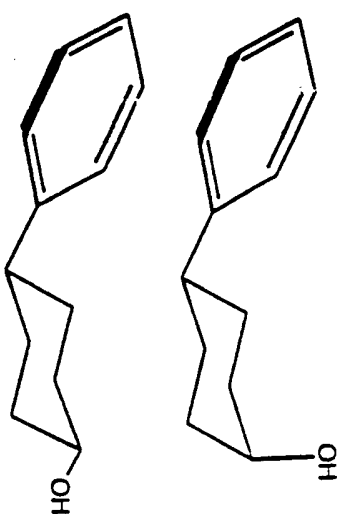
Cyklohexylbenzen



P450cam



+



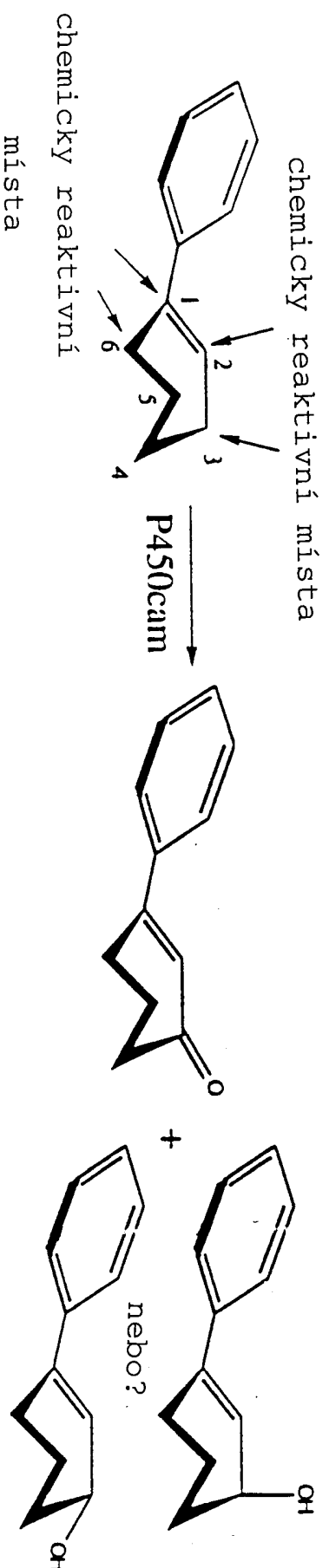
chemicky nejreaktivnější

místo

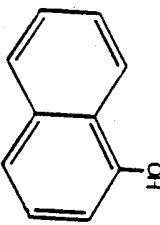
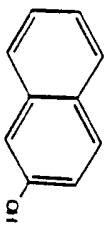
Tabulka 4 (b)

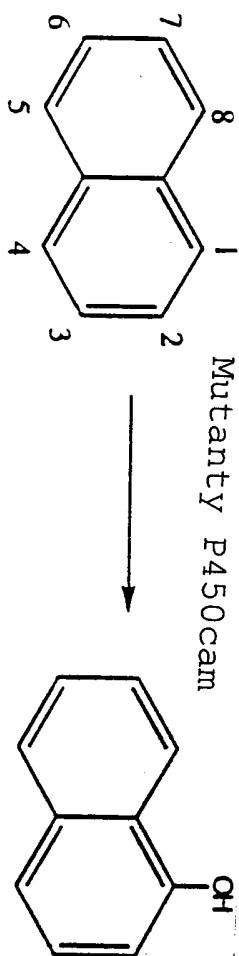
Produkty fenylcyklohexenu		Produkty (v procentech) pro jednotlivé mutanty:	
		WT	Y96A
	3-on (A)	24	25
	3-ol (B)	76	75
Celkové množství produktů (plocha/10 ⁶)		42	36

08.07.13



Tabulka 4 (c)

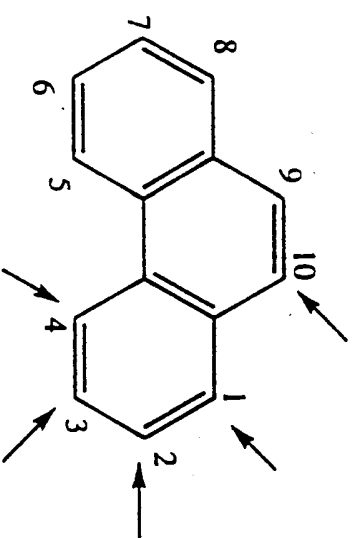
Produkty naftalenu	Produkty (v procentech) pro jednotlivé mutanty:					
	WT	Y96A	Y96F	Y96L	Y96V	F87A-F96G-F193A
	100	100	100	100	100	100
	0	0	0	0	0	0
Celkové množství produktů (plocha/10 ⁵)						
	(0,016)	1,1	2,4	0,7	1,4	0,1



Tabulka 4 (d)

Produkty fenantrenu	Produkty (v procentech) pro jednotlivé mutanty:					
	WT	Y96A	Y96F	Y96L	Y96V	F87A-F96G-F193A
A	38	49	41	35,5	41	27
B	15	23	31	41	38	41
C	12	13	5	9	11	3
D	35	15	23	14,5	10	29
Celkové množství produktů (plocha/10 ⁶)	0,075	7,0	4,5	2,8	1,6	0,065

Fenanthren

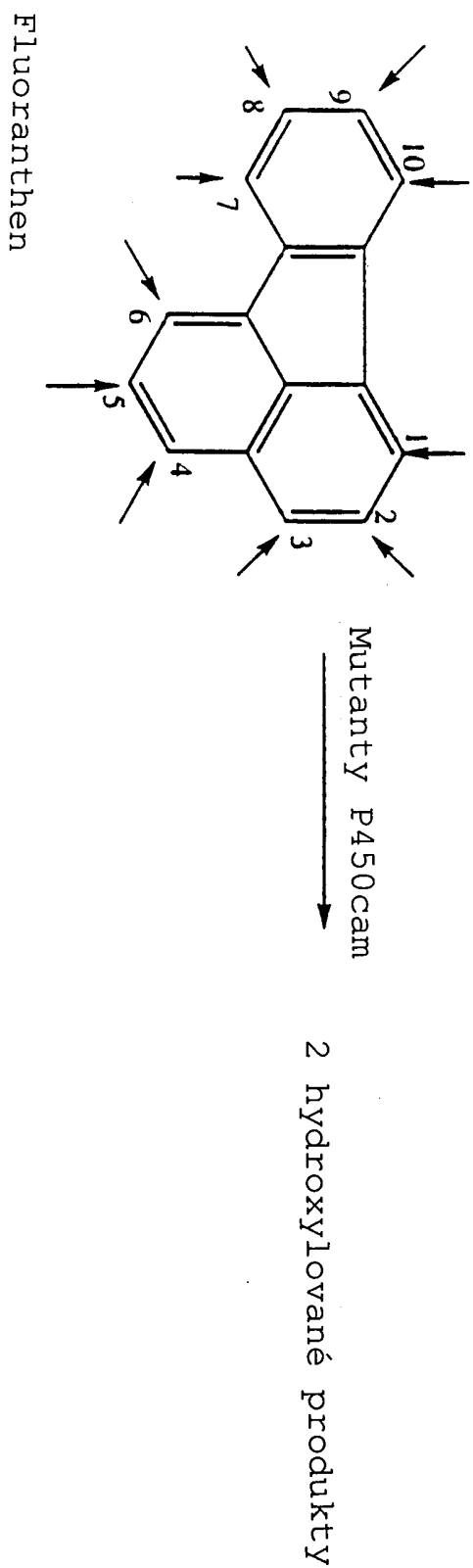


Mutantů P450cam
→
4 hydroxylované produkty

Tabulka 4 (e)

Produkty fluoranthenu	Produkty (v procentech) pro jednotlivé mutanty:					
	WT	Y96A	Y96F	Y96L	Y96V	F87A-F96G-F193A
A	0	84	-	-	-	0
B	0	16	-	-	-	100
Celkové množství produktů (plocha/10 ⁶)	0	2,7	-	-	-	0,2

21038

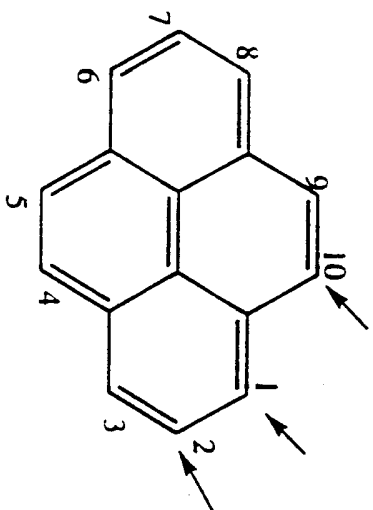


Tabulka 4(F)

Produkty pyrenu	Produkty (v procentech) pro jednotlivé mutanty:					
	WT	Y96A	Y96F	Y96L	Y96V	F87A-F96G-F193A
A	0	40	43	23	30	33
B	0	43,6	29	64,5	55	40
C	0	5	12,5	7,9	12	20
D	0	11,4	15,5	4,6	3	7
Celkové množství produktů (plocha/10 ⁶)	0	1,2	1,5	1,5	1,6	0,02

8. 10. 2015

Pyren



Mutanty P450cam

4 hydroxylované produkty

21.10.99

21.10.99



21.10.99

21.10.99

Tabulka 4h

Produkty odvozené od hexanu	Zastoupení produktů (v %) pro mutanty	
	Y96F	Y96A
2-hexanon	10	15
3-hexanon	16	28
2-hexanol	24	26
3-hexanol	50	32
Relativní aktivita (přirozeně se vyskytující enzym=1)	18,2	25,5

Produkty odvozené od 2-methyl hexanu	Zastoupení produktů (v %) pro mutanty	
	Y96F	Y96A
2-methyl-2-hexanol	72	74
5-methyl-2-hexanon	16	14
2-methyl-3-hexanol	7	4
5-methyl-2-hexanol	5	8
Relativní aktivita (přirozeně se vyskytující enzym=1)	2,3	2,6

21.10.98

PV 1273-98

PATENTOVÉ NÁROKY

64049

1. Mutant monooxygenázy cytochrom P450cam, kde je cysteinový zbytek v pozici 334 odstraněn.
2. Mutant podle nároku 1, kde je odstranění zmíněného cysteinového zbytku provedeno záměnou jinou aminokyselinou mimo cysteinu.
3. Mutant podle nároku 1, kde je odstranění zmíněného cysteinového zbytku z enzymu provedeno delecí cysteinu na pozici 334.
4. Mutant podle jakéhokoliv z předchozích nároků, kde je v tomto mutantu tyrosinový zbytek na pozici 96 nahrazen jakoukoliv jinou aminokyselinou mimo tyrosinu.
5. Mutant podle jakéhokoliv z nároků 1, 2 nebo 4, kde je zmíněná aminokyselina vybrána z následující skupiny: alanin, arginin, asparagin, kyselina asparagová, kyselina glutamová, glutamin, glycin, histidin, isoleucin, leucin, lysin, methionin, prolin, serin, threonin, tryptofan, tyrosin a valin.
6. Mutant podle jakéhokoliv z předchozích nároků, kde je aminokyselinový zbytek v jedné nebo ve více z pozic 87, 98, 101, 185, 193, 244, 247, 295, 297, 395 a 396 nahrazen jiným aminokyselinovým zbytkem.

21.10.98

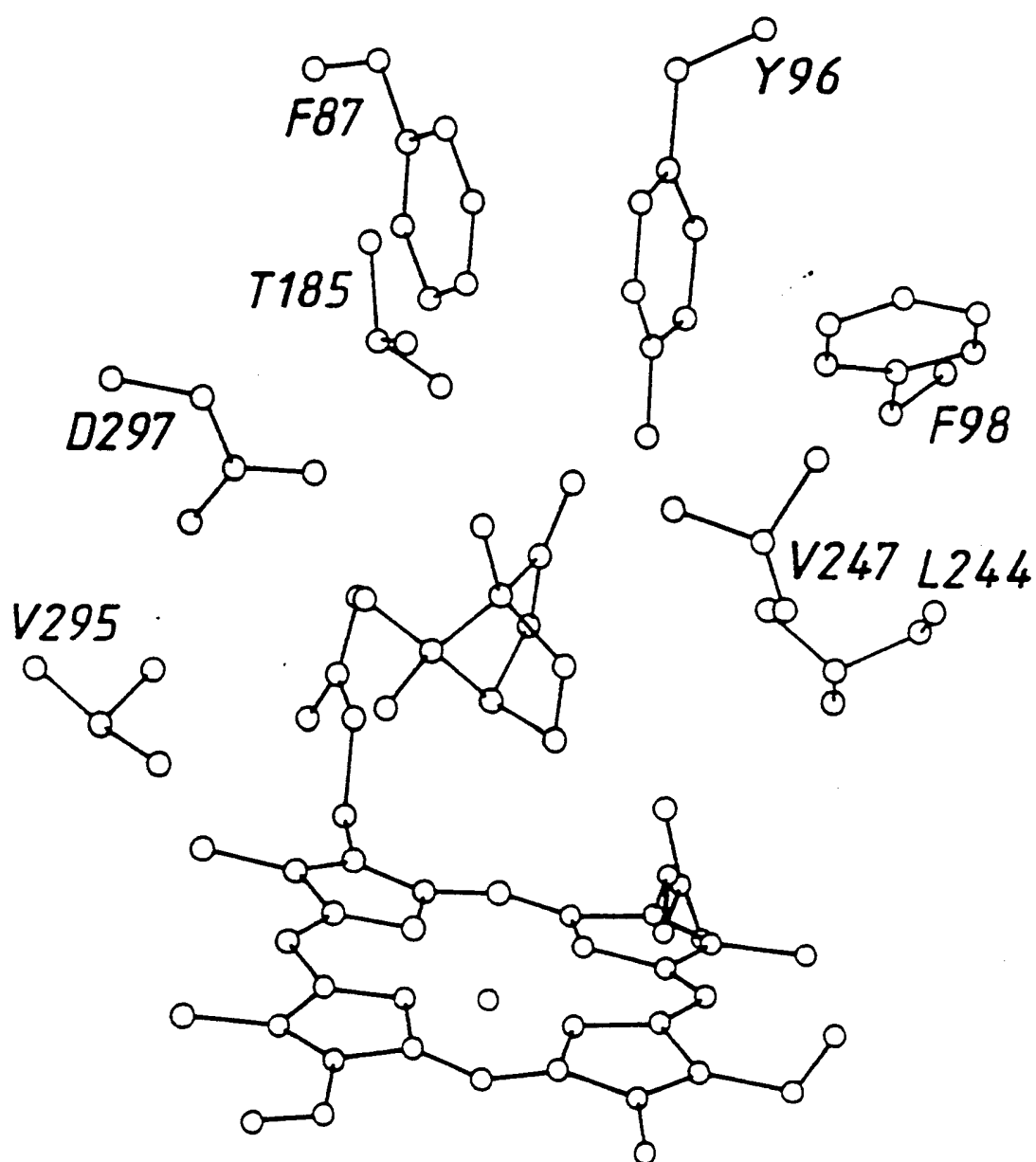
7. Mutant monooxygenázy cytochrom P450cam, popsaný výše,
s odkazy k doprovodným obrázkům a/nebo příkladům.

21.10.98

PV 1273-98

~~64079~~

OBRÁZEK 1



21.10.98

OBRÁZEK 2

