

74.826/SZE

P070340 -

A2

**AZ *ESCHERICHIA COLI*-BÓL SZÁRMAZÓ FITÁZ  
HELYSPECIFIKUS MUTAGENEZISE**

**KIVONAT**

A jelen találmány tárgyát egy javított enzimátikus tulajdonságokkal rendelkező, izolált, mutáns savas foszfatáz/fitáz képezi. A mutáns savas foszfatáz/fitáz különösen alkalmas a takarmány-készítményekben történő felhasználásra.



2002. 11. 20.

S. B. C. & K.  
Szabadalmi Ügyvivői Iroda  
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.  
Telefon: 461-1000, Fax: 461-1099



74.826/SZE

P0203250

## AZ *ESCHERICHIA COLI*-BÓL SZÁRMAZÓ FITÁZ HELYSPECIFIKUS MUTAGENEZISE

A jelen bejelentés az 1999. november 18-án benyújtott, 60/166,179 számú, amerikai egyesült államokbeli ideiglenes szabadalmi bejelentés elsőbbségét igényli.

A jelen találmány tárgyát az *Escherichia coli*-ből származó foszfatáz/fitáz helyspecifikus mutagenezise képezi.

A fitázok (amelyek a monoészter foszfatázok egy speciális csoportját alkotják) szükségesek ahhoz, hogy elindítsák a foszfát („P”) lehasadását a fitátról (más néven mio-inozitol-hexafoszfátról), amely a gabonák esetén a fő P-tárolási forma [N.R. Reddy és mtsai.: „Phytates in Legumes and Cereals”, *Advances in Food Research*, 28: 1, (1982)]. Mivel az egyszerű gyomorral rendelkező szervezetek (mint amilyen például a sercszony a baromfi vagy az ember) gyomor- és bélrendszerében alacsony a fitáz-aktivitás, az elfogyasztott fitát foszfátja majdnem teljes egészében emészthetetlen. Ezért ezen szervezetek esetén szükség van a szerves foszfát (ami egy drága és nem megújítható tápanyag) pótlására. Még ennél is nagyobb problémát jelent az ezen élőlények ürüléke által a környezetbe juttatott hasznosítatlan fitát-P a környezet számára P-szennyeződést jelent [G.L. Cromwell és mtsai.: „P -A Key Essential Nutrient, Yet a Possible Major Pollutant – Its Central Role in Animal Nutrition”, *Biotechnology In the Feed Industry; Proce-*



dings Alltech 7th Annual Symposium, 133. oldal, (1991)]. Továbbá, a fitát esszenciális nyomelemekkel, mint például a cinkkel, kelátot képez, ami hiánybetegségeket okoz, mint például a növekedés és a szellemi fejlődés visszamaradását, olyan gyerekekben, akik főleg növényi eredetű táplálékot (amiből nem vették ki a fitátot) fogyasztanak.

*Aspergillus niger* NRRL3135-ből két fitázt –a *phyA*-t és a *phyB*-t– klónoztak és szekvenáltak [K.C. Ehrlich és mtsai.: „Identification and Cloning of a Second Phytase Gene (*phys*) from *Aspergillus niger (ficus)*”, Biochem. Biophys. Res. Commun., 195: 53-57 (1993); C.S. Piddington és mtsai.: „The Cloning and Sequencing of the Genes Encoding Phytase (*phy*) and pH 2.5-optimum Acid Phosphatase (*aph*) from *Aspergillus niger* var. *awamori*”, Gene, 133: 56-62, (1993)]. Nemrég új fitáz-géneket izoláltak *Aspergillus terreus*-ből és *Miceliophthora thermophila*-ból [Mitchell és mtsai.: „The Phytase Subfamily of Histidine Acid Phosphatases: Isolation of Genes for Two Novel Phytases From the Fungi *Aspergillus terreus* and *Miceliophthora thermophila*”, Microbiology, 143: 245-252, (1997)], *Aspergillus fumigatus*-ból [Pasamontes és mtsai.: „Gene Cloning, Purification, and Characterization of a Heat-Stable Phytase from the Fungus *Aspergillus fumigatus*”, Appl. Environ. Microbiol., 63: 1696-1700, (1997)], *Emiricella nidulans*-ból és *Talaromyces thermophilus*-ból [Pasamontes és mtsai.: „Cloning of the Phytase from *Emiricella nidulans* and the Thermophilic Fungus *Talaromyces thermophilus*”, Biochim. Biophys. Acta, 1353: 217-223, (1997)], valamint kukoricából [Maugenest és mtsai.: „Cloning and Characterization of a cDNA Encoding a Maize Seedling Phytase”, Biochem. J., 322: 511-517, (1997)].

Sokféle típusú fitáz enzimet izoláltak és/vagy tisztítottak *Enterobacter sp. 4*-ből [Yoon és mtsai.: „Isolation and Identification of Phytase-Producing Bacterium, *Enterobacter sp. 4*, and Enzymatic Properties of Phytase Enzyme”, *Enzyme and Microbial Technology*, 18: 449-454, (1996)], *Klebsiella terrigena*-ból [Greiner és mtsai.: „Purification and Characterization of a Phytase from *Klebsiella terrigena*”, *Arch. Biochem. Biophys.*, 341: 201-206, (1997)] és *Bacillus sp. DS11*-ből [Kim és mtsai.: „Purification and Properties of a Thermostable Phytase from *Bacillus sp. DS11*”, *Enzyme and Microbial Technology*, 22: 2-7, (1998)]. Ezen enzimek tulajdonságait tanulmányozták. Ráadásul az *Aspergillus ficuum*-ból származó phyA kristályszerkezetét is meghatározták [Kostrewa és mtsai.: „Crystal Structure of Phytase from *Aspergillus ficuum* at 2.5 Å Resolution”, *Nature Structure Biology*, 4: 185-190 (1997)].

Hartingsveldt és mtsai. a *phyA*-gént bejuttatták az *A. niger*-be, és azt tapasztalták, hogy a fitáz-aktivitás tízszeresére nőtt a vad típushoz képest [”Cloning, Characterization and Overexpression of the Phytase-Encoding Gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*”, *Gene*, 127: 87-94, (1993)]. Kimutatták, hogyha a sertések és a baromfiak táplálékát ezzel a típusú mikrobiális fitázzal egészítik ki, akkor jobban hasznosul a fitátból származó foszfát, valamint a cink [Simons és mtsai.: „Improvement of Phosphorus Availability By Microbial Phytase in Broilers and Pigs”, *Br. J. Nutr.*, 64: 525 (1990); X.G. Lei és mtsai.: „Supplementing Corn-Soybean Meal Diets With Microbial Phytase Linearly Improves Phytate P Utilization by Weaning Pigs”, *J. Anim. Sci.*, 71: 3359, (1993); X.G. Lei és mtsai.: „Supplementing Corn-Soybean Meal Diets With Microbial Phytase



Maximizes Phytate P Utilization by Weaning Pigs”, J. Anim. Sci., 71: 3368, (1993); G.L. Cromwell és mtsai.: „P -A Key Essential Nutrient, Yet a Possible Major Pollutant – Its Central Role in Animal Nutrition”, Biotechnology In the Feed Industry; Proceedings Alltech 7th Annual Symposium, 133. oldal, (1991)]. A fitáz takarmány-kiegészítőként történő gyakorlati alkalmazását az állattenyésztésben azonban eleve kizárja az, hogy a fitáz nagyüzemileg csak korlátozottan és drágán állítható elő, valamint az, hogy instabil, ha a takarmány tablettázása során hőhatásnak teszik ki [A.W. Jongbloed és mtsai.: „Effect of Pelleting Mixed Feeds on Phytase Activity and Apparent Absorbability of Phosphorus and Calcium in Pigs”, Animal Feed Science and Technology, 28: 233-242, (1990)]. Sőt, az *A. niger* által termelt fitáz feltehetőleg nem a legbiztonságosabb forrás az emberi fogyasztásra alkalmas élelmiszerek előállítására.

Ezért szükség van a fitáz-termelés fejlesztésére, hogy a fitázt alkalmazni lehessen az élelmiszer- és a takarmányiparban.

A jelen találmány tárgyát egy izolált, mutáns savas foszfátáz/fitáz képezi, amelyet úgy állítunk elő, hogy egy vad típusú, *Escherichia coli*-ből származó savas foszfátáz/fitáz (amelynek aminosav-szekvenciája az 1-es számú szekvenciának felel meg) több aminosavát kicseréljük. Ezeket az aminosav-cseréket az 1-es számú szekvencia 200., 207. és 211. pozíciójában hajtjuk végre. A jelen találmány tárgyát képezi egy olyan, izolált, mutáns savas foszfátáz/fitáz is, amely abban különbözik az 1-es számú szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciájú, vad típusú savas foszfátáztól/fitáztól, hogy abban legalább egy aminosav ki van cserélve, amely aminosav-csere megakadályozza,



hogy a 200. és a 210. pozícióban található ciszteinek között diszulfid-kötés alakuljon ki. A jelen találmány szerinti mutáns savas foszfatáz/fitáz takarmány-készítményekben alkalmazható.

A jelen találmány tárgyát képezi egy olyan eljárás is, amelynek segítségével javíthatók az 1-es számú szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciájú, vad típusú, *Escherichia coli*-ből származó savas foszfatáz/fitáz enzimatis tulajdonságai. Ez az eljárás magába foglalja a vad típusú savas foszfatáz/fitáz aminosav-szekvenciájának a megváltoztatását, azáltal hogy az 1-es számú szekvencia 200., 207. és 211. pozíciójában aminosav-cseréket hajtunk végre. Ezen eljárás egy másik kiviteli forma szerint azt foglalja magába, hogy az 1-es számú szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciájú, vad típusú savas foszfatáz/fitáz aminosav-szekvenciáját úgy változtatjuk meg, hogy legalább egy olyan aminosav-cserét hajtunk végre, amely aminosav-csere megakadályozza, hogy a 200. és a 210. pozícióban található ciszteinek között diszulfid-kötés alakuljon ki.

A jelen találmány tárgyát képezi egy olyan, izolált DNS-molekula is, amely a jelen találmány szerinti mutáns savas foszfatáz/fitáz kódozza. A találmány tárgyát képezik továbbá olyan, rekombináns DNS expresszálására alkalmas rendszerek és gazdasejtek is, amelyek a jelen találmány szerinti DNS-molekulát tartalmazzák. Ezek a konstrukciók alkalmasak a jelen találmány szerinti mutáns savas foszfatáz/fitáz rekombináns úton történő előállítására.

A jelen találmány tárgyát képezi egy olyan alapvető molekuláris módszer is, amely széleskörűen alkalmazható különféle élőlényekből származtatható mutáns savas foszfatázok/fitázok tervezésére, aminek eredményeképpen javított enzimatis tulajdonságokkal (mint például nagyobb hőstabilitással és katali-



tikus hatékonysággal) rendelkező mutánsokat kapunk. Ez a módszer magába foglalja egy vad típusú enzim génjének az azonosítását és izolálását; valamint az ezen a génen végzett helyspecifikus mutagenezist, abból a célból, hogy javítsuk az enzim működését és/vagy stabilitását. A jelen találmány egyik kiviteli formája szerint azért végzünk helyspecifikus mutagenezist, hogy a vad típusú génbe célzottan vigyünk be mutációkat, abból a célból, hogy a vad típusú enzimhez N-glikozilációs helyeket adjunk és/vagy megváltoztassuk az enzim fizikai-kémiai tulajdonságait (például növeljük az enzim nettó pozitív töltését). Ezenkívül a vad típusú génen abból a célból is végezhetünk célzott mutagenezist, hogy megszüntessünk bizonyos diszulfid-kötéseket (amelyek eredetileg jelen vannak a végleges fehérje-termékben), és így javítsuk az enzim hőstabilitását és katalitikus működését.

Az 1. ábrán az *E. coli*-ből származó savas foszfatáz/fitáz génjének (appA) a nukleotid-szekvenciája (2-es számú szekvencia) és a savas foszfatáz/fitáz ebből levezetett aminosav-szekvenciája (1-es számú szekvencia) látható. A primereket aláhúzással és nyilakkal jelöltük. A GH-hurok régiót (202-211) vastag betűkkel jelöltük; az  $\alpha$ -domén egyetlen diszulfid-kötésének a kialakításában a C200 (amely a G-hélixben található) és a C210 (amely a GH-hurokban található) vesz részt. A kicserélt aminosavakat (A131, V134N, C200, D207 és S211) vastagon aláhúztuk.

A 2. ábrán a *Pichia pastoris*-ban expresszált rekombináns fehérjék (tisztított fehérjék) SDS-gélelektrofórezis (15 %) vizsgálatának az eredménye látható. Minden sávban 30  $\mu$ g fehérjét futtattunk. Az egyes sávok jelentése az alábbi: M: előre meg-

festett marker (Biorad, kDa) (foszforiláz b, 103; szarvasmarha szérum albumin, 76; ovalbumin, 49; szénsav-anhidráz, 33,2; szója tripszin-inhibitor, 28); 1: Endo H<sub>f</sub> (endoglikozidáz H<sub>f</sub>); 2: r-AppA (az *appa* gén által *Pichia pastorisban* termelt rekombináns fehérje); 3: r-AppA + Endo H<sub>f</sub>; 4: az U jelű mutáns fehérje; 5: az U jelű mutáns fehérje + Endo H<sub>f</sub>; 6: az R jelű mutáns fehérje; 7: az R jelű mutáns fehérje + Endo H<sub>f</sub>; 8: az Y jelű mutáns fehérje; 9: az Y jelű mutáns fehérje + Endo H<sub>f</sub>.

A 3. ábrán a tisztított r-AppA (●) és a mutáns fehérjék (U: ■; Y: ▲; R: ◆) enzimatis aktivitása látható a pH függvényében, 37°C-on, szubsztrátként nátrium-fitátot használva. Minden egyes mutáns fehérje, valamint az r-AppA maximális aktivitását 100 %-nak definiáltuk. Az alábbi puffereket használtuk: pH 1,5-3,5: 0,2 M glicin-HCl; pH 4,5-7,5: 0,2 M nátrium-citrát; pH 8,5-11 0,2 M Tris-HCl. Csillagokkal jelöltük az r-AppA és a többi, mutáns fehérje közötti szignifikáns különbséget ( $P < 0,05$ ). Az adatok három kísérlet mérési eredményeinek felhasználásával átlag  $\pm$  standard hiba formájában vannak feltüntetve.

A 4. ábrán a tisztított r-AppA (●) és a mutáns fehérjék (U: ■; Y: ▲; R: ◆) megmaradó enzimatis aktivitása látható, miután 15 percig a jelzett hőmérsékletnek tettük ki azokat. A tisztított enzimeket 15 percig inkubáltuk 0,2 M glicin-HCl-ben, pH 2,5-ön. A hőhatásnak való kitevés után a reakcióelegyet 30 percig jégen tartottuk. A nátrium-fitát felhasználásával meghatározott kezdeti aktivitást minden egyes rekombináns enzim esetén 100 %-nak definiáltuk. Csillagokkal jelöltük az r-AppA és a többi, mutáns fehérje közötti szignifikáns különbséget ( $P < 0,05$ ). Az adatok három kísérlet mérési eredményeinek felhasználásával átlag  $\pm$  standard hiba formájában vannak feltüntetve.

A jelen találmány tárgyát egy izolált, mutáns savas foszfátáz/fitáz képezi, amelyet egy vad típusú, *Escherichia coli*-ből származó savas foszfátáz/fitáz helyspecifikus mutagenézisével állítottunk elő. Az egyik kiviteli forma szerint a mutáns savas foszfátáz/fitáz úgy állítjuk elő, hogy egy vad típusú, *Escherichia coli*-ből származó savas foszfátáz/fitáz több aminosavat célzottan kicseréljük. Egy másik kiviteli forma szerint a mutáns savas foszfátáz/fitáz úgy állítjuk elő, hogy a vad típusú savas foszfátáz/fitáz legalább egy aminosavat kicserélünk, abból a célból, hogy a mutáns savas foszfátáz/fitáz cisztein aminosavai között megakadályozzuk a diszulfid-kötés kialakulását. A vad típusú savas foszfátáz/fitáz aminosav-szekvenciája az alábbi, 1-es számú szekvenciának felel meg:

Met	Lys	Ala	Ile	Leu	Ile	Pro	Phe	Leu	Ser	Leu	Leu	Ile	Pro	Leu	Thr
1				5					10					15	
Pro	Gln	Ser	Ala	Phe	Ala	Gln	Ser	Glu	Pro	Glu	Leu	Lys	Leu	Glu	Ser
			20					25					30		
Val	Val	Ile	Val	Ser	Arg	His	Gly	Val	Arg	Ala	Pro	Thr	Lys	Ala	Thr
		35					40					45			
Gln	Leu	Met	Gln	Asp	Val	Thr	Pro	Asp	Ala	Trp	Pro	Thr	Trp	Pro	Val
	50					55					60				
Lys	Leu	Gly	Trp	Leu	Thr	Pro	Arg	Gly	Gly	Glu	Leu	Ile	Ala	Tyr	Leu
65					70					75					80
Gly	His	Tyr	Gln	Arg	Gln	Arg	Leu	Val	Ala	Asp	Gly	Leu	Leu	Ala	Lys
			85						90					95	
Lys	Gly	Cys	Pro	Gln	Pro	Gly	Gln	Val	Ala	Ile	Ile	Ala	Asp	Val	Asp
			100					105					110		
Glu	Arg	Thr	Arg	Lys	Thr	Gly	Glu	Ala	Phe	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Pro
		115					120					125			
Asp	Cys	Ala	Ile	Thr	Val	His	Thr	Gln	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Pro	Asp
	130					135					140				
Pro	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Lys	Thr	Gly	Val	Cys	Gln	Leu	Asp	Asn	Ala
145				150						155					160



Asn	Val	Thr	Asp	Ala	Ile	Leu	Ser	Arg	Ala	Gly	Gly	Ser	Ile	Ala	Asp	165	170	175	
Phe	Thr	Gly	His	Arg	Gln	Thr	Ala	Phe	Arg	Glu	Leu	Glu	Arg	Val	Leu	180	185	190	
Asn	Phe	Pro	Gln	Ser	Asn	Leu	Cys	Leu	Lys	Arg	Glu	Lys	Gln	Asp	Glu	195	200	205	
Ser	Cys	Ser	Leu	Thr	Gln	Ala	Leu	Pro	Ser	Glu	Leu	Lys	Val	Ser	Ala	210	215	220	
Asp	Asn	Val	Ser	Leu	Thr	Gly	Ala	Val	Ser	Leu	Ala	Ser	Met	Leu	Thr	225	230	235	240
Glu	Ile	Phe	Leu	Leu	Gln	Gln	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Glu	Pro	Gly	Trp	245	250	255	
Gly	Arg	Ile	Thr	Asp	Ser	His	Gln	Trp	Asn	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	His	260	265	270	
Asn	Ala	Gln	Phe	Tyr	Leu	Leu	Gln	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Ala	Arg	Ser	275	280	285	
Arg	Ala	Thr	Pro	Leu	Leu	Asp	Leu	Ile	Lys	Thr	Ala	Leu	Thr	Pro	His	290	295	300	
Pro	Pro	Gln	Lys	Gln	Ala	Tyr	Gly	Val	Thr	Leu	Pro	Thr	Ser	Val	Leu	305	310	315	320
Phe	Ile	Ala	Gly	His	Asp	Thr	Asn	Leu	Ala	Asn	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	325	330	335	
Glu	Leu	Asn	Trp	Thr	Leu	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	340	345	350	
Gly	Glu	Leu	Val	Phe	Glu	Arg	Trp	Arg	Arg	Leu	Ser	Asp	Asn	Ser	Gln	355	360	365	
Trp	Ile	Gln	Val	Ser	Leu	Val	Phe	Gln	Thr	Leu	Gln	Gln	Met	Arg	Asp	370	375	380	
Lys	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Glu	Val	Lys	Leu	Thr	385	390	395	400
Leu	Ala	Gly	Cys	Glu	Glu	Arg	Asn	Ala	Gln	Gly	Met	Cys	Ser	Leu	Ala	405	410	415	
Gly	Phe	Thr	Gln	Ile	Val	Asn	Glu	Ala	Arg	Ile	Pro	Ala	Cys	Ser	Leu	420	425	430	

Az 1-es számú szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciájú, vad típusú savas foszfátáz/fitáz az alábbi, 2-es szá-



mú szekvenciának megfelelő nukleotid-szekvencia kódoló szakasza (a 187. és az 1486. bázisok közötti szakasz) kódolja:

```

1   taa  gga  gca  gaa  aca  ATG TGG TAT TTA CTT TGG TTC GTC GGC ATT
46  TTG TTG ATG TGT TCG CTC TCC ACC CTT GTG TTG GTA TGG CTG GAC
91  CCG CGA TTG AAA AGT T   aac  gaa  cgt  agg  cct  gat  gcg  gcg  cat
134 tag  cat  cgc  atc  agg  caa  tca  ata  atg  tca  gat  atg  aaa  agc  gga
179 aac  ata  tcg  ATG AAA GCG ATC TTA ATC CCA TTT TTA TCT CTT CTG
224 ATT CCG TTA ACC CCG CAA TCT GCA TTC GCT CAG AGT GAG CCG GAG
269 CTG AAG CTG GAA AGT GTG GTG ATT GTC AGC CGT CAT GGT GTG CGT
314 GCC CCA ACC AAG GCC ACG CAA CTG ATG CAG GAT GTC ACC CCA GAC
359 GCA TGG CCA ACC TGG CCG GTA AAA CTG GGT TGG CTG ACA CCA CGC
404 GGT GGT GAG CTA ATC GCC TAT CTC GGA CAT TAC CAA CGC CAG CGT
449 CTG GTG GCC GAC GGA TTG CTG GCG AAA AAG GGC TGC CCG CAG CCT
494 GGT CAG GTC GCG ATT ATT GTC GAT GTC GAC GAG CGT ACC CGT AAA
539 ACA GGC GAA GCC TTC GCC GCC GGG CTG GCA CCT GAC TGT GCA ATA
584 ACC GTA CAT ACC CAG GCA GAT ACG TCC AGT CCC GAT CCG TTA TTT
629 ATT CCT CTA AAA ACT GGC GTT TGC CAA CTG GAT AAC GCG AAC GTG
674 ACT GAC GCG ATC CTC AGC AGG GCA GGA GGG TCA ATT GCT GAC TTT
719 ACC GGG CAT CGG CAA ACG GCG TTT CGC GAA CTG GAA CGG GTG CTT
764 AAT TTT CCG CAA TCA AAC TTG TGC CTT AAA CGT GAG AAA CAG GAC
809 GAA AGC TGT TCA TTA ACG CAG GCA TTA CCA TCG GAA CTC AAG GTG
854 AGC GCC GAC AAT GTT TCA TTA ACC GGT GCG GTA AGC CTC GCA TCA
899 ATG CTG ACG GAA ATA TTT CTC CTG CAA CAA GCA CAG GGA ATG CCG
944 GAG CCG GGG TGG GGA AGG ATC ACT GAT TCA CAC CAG TGG AAC ACC
989 TTG CTA AGT TTG CAT AAC GCG CAA TTT TAT TTA CTA CAA CGC ACG
1034 CCA GAG GTT GCC CGC AGT CGC GCC ACC CCG TTA TTG GAT TTG ATC
1079 AAG ACA GCG TTG ACG CCC CAT CCA CCG CAA AAA CAG GCG TAT GGT
1124 GTG ACA TTA CCC ACT TCA GTG CTG TTT ATT GCC GGA CAC GAT ACT
1169 AAT CTG GCA AAT CTC GGC GGC GCA CTG GAG CTC AAC TGG ACG CTT

```

1214 CCA GGT CAG CCG GAT AAC ACG CCG CCA GGT GGT GAA CTG GTG TTT  
 1259 GAA CGC TGG CGT CGG CTA AGC GAT AAC AGC CAG TGG ATT CAG GTT  
 1304 TCG CTG GTC TTC CAG ACT TTA CAG CAG ATG CGT GAT AAA ACG CCG  
 1349 CTA TCA TTA AAT ACG CCG CCC GGA GAG GTG AAA CTG ACC CTG GCA  
 1394 GGA TGT GAA GAG CGA AAT GCG CAG GGC ATG TGT TCG TTG GCC GGT  
 1439 TTT ACG CAA ATC GTG AAT GAA GCG CGC ATA CCG GCG TGC AGT TTG  
 1484 TAA

Ez a savas foszfátáz/fitáz az *E.coli*-ből származik.

A jelen találmány szerinti mutáns savas foszfátáz/fitáz előállításánál az 1-es számú szekvencia 200., 207. és 211. pozíciójában hajtjuk végre az aminosav-cseréket. Különösen előnyös, ha az 1-es számú szekvenciának megfelelő savas foszfátázon/fitázon az alábbi aminosav-cseréket hajtjuk végre: a 200. pozícióban lévő Cys-t Asn-ra cseréljük; a 207. pozícióban lévő Asp-t Asn-ra cseréljük; valamint a 211. pozícióban lévő Ser-t Asn-ra cseréljük. A mutáns savas foszfátáz/fitáz aminosav-szekvenciája ennek eredményeképpen az alábbi, 3-as számú szekvenciának felel meg (az aminosav-cseréket aláhúzással és vastag betűvel jelöltük):

Met	Lys	Ala	Ile	Leu	Ile	Pro	Phe	Leu	Ser	Leu	Leu	Ile	Pro	Leu	Thr
1				5					10					15	
Pro	Gln	Ser	Ala	Phe	Ala	Gln	Ser	Glu	Pro	Glu	Leu	Lys	Leu	Glu	Ser
			20					25					30		
Val	Val	Ile	Val	Ser	Arg	His	Gly	Val	Arg	Ala	Pro	Thr	Lys	Ala	Thr
		35					40					45			
Gln	Leu	Met	Gln	Asp	Val	Thr	Pro	Asp	Ala	Trp	Pro	Thr	Trp	Pro	Val
	50					55					60				
Lys	Leu	Gly	Trp	Leu	Thr	Pro	Arg	Gly	Gly	Glu	Leu	Ile	Ala	Tyr	Leu
65					70					75					80



Gly His Tyr Gln Arg Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys  
85 90 95  
Lys Gly Cys Pro Gln Pro Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp  
100 105 110  
Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro  
115 120 125  
Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp  
130 135 140  
Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala  
145 150 155 160  
Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp  
165 170 175  
Phe Thr Gly His Arg Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu  
180 185 190  
Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Asn Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asn Glu  
195 200 205  
Ser Cys Asn Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala  
210 215 220  
Asp Asn Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr  
225 230 235 240  
Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp  
245 250 255  
Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His  
260 265 270  
Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser  
275 280 285  
Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His  
290 295 300  
Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu  
305 310 315 320  
Phe Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu  
325 330 335  
Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly  
340 345 350  
Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln  
355 360 365  
Trp Ile Gln Val Ser Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp  
370 375 380



Lys	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Glu	Val	Lys	Leu	Thr
385					390					395					400
Leu	Ala	Gly	Cys	Glu	Glu	Arg	Asn	Ala	Gln	Gly	Met	Cys	Ser	Leu	Ala
				405					410						415
Gly	Phe	Thr	Gln	Ile	Val	Asn	Glu	Ala	Arg	Ile	Pro	Ala	Cys	Ser	Leu *
			420					425					430		

A 3-as számú szekvenciának megfelelő, mutáns savas foszfatáz/fitáz molekulatömege deglikoziláció után 45-48 kDa, és a specifikus fitáz-aktivitása 63 egység/mg. Az érett fehérje a 3-as számú szekvencia 21. és 432. aminosava közötti szakaszának az aminosav-szekvenciájával rendelkezik.

A jelen találmány egy másik kiviteli formája szerint a mutáns savas foszfatázt/fitázt úgy állítjuk elő, hogy az 1-es számú szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciában legalább egy aminosavat kicserélünk, abból a célból, hogy a mutáns savas foszfatázban/fitázban megakadályozzuk a diszulfid-kötés kialakulását. Ennek során leginkább úgy járunk el, hogy az 1-es számú szekvencia 200. és/vagy 210. pozíciójában lévő ciszteineket célzottan kicseréljük valamilyen más aminosavra, azért hogy megakadályozzuk a diszulfid-kötés kialakulását ezen két aminosav között.

A 3-as számú szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciájú, mutáns savas foszfatázt/fitázt az alábbi, 4-es számú szekvenciának megfelelő nukleotid-szekvencia kódoló szakasza (a 187. és az 1486. bázisok közötti szakasz) kódolja (az aminosav-szekvencia 200., 207. és 211. pozíciójában lévő aszparaginnokat kódoló kodonokat aláhúzással és vastag betűvel jelöltük):

```

1   taa  gga  gca  gaa  aca  ATG TGG TAT TTA CTT TGG TTC GTC GGC ATT
46  TTG TTG ATG TGT TCG CTC TCC ACC CTT GTG TTG GTA TGG CTG GAC

```



91 CCG CGA TTG AAA AGT T aac gaa cgt agg cct gat gcg gcg cat  
 134 tag cat cgc atc agg caa tca ata atg tca gat atg aaa agc gga  
 179 aac ata tcg ATG AAA GCG ATC TTA ATC CCA TTT TTA TCT CTT CTG  
 224 ATT CCG TTA ACC CCG CAA TCT GCA TTC GCT CAG AGT GAG CCG GAG  
 269 CTG AAG CTG GAA AGT GTG GTG ATT GTC AGC CGT CAT GGT GTG CGT  
 314 GCC CCA ACC AAG GCC ACG CAA CTG ATG CAG GAT GTC ACC CCA GAC  
 359 GCA TGG CCA ACC TGG CCG GTA AAA CTG GGT TGG CTG ACA CCA CGC  
 404 GGT GGT GAG CTA ATC GCC TAT CTC GGA CAT TAC CAA CGC CAG CGT  
 449 CTG GTG GCC GAC GGA TTG CTG GCG AAA AAG GGC TGC CCG CAG CCT  
 494 GGT CAG GTC GCG ATT ATT GTC GAT GTC GAC GAG CGT ACC CGT AAA  
 539 ACA GGC GAA GCC TTC GCC GCC GGG CTG GCA CCT GAC TGT GCA ATA  
 584 ACC GTA CAT ACC CAG GCA GAT ACG TCC AGT CCC GAT CCG TTA TTT  
 629 ATT CCT CTA AAA ACT GGC GTT TGC CAA CTG GAT AAC GCG AAC GTG  
 674 ACT GAC GCG ATC CTC AGC AGG GCA GGA GGG TCA ATT GCT GAC TTT  
 719 ACC GGG CAT CGG CAA ACG GCG TTT CGC GAA CTG GAA CGG GTG CTT  
 764 AAT TTT CCG CAA TCA AAC TTG AAC CTT AAA CGT GAG AAA CAG AAT  
 809 GAA AGC TGT AAC TTA ACG CAG GCA TTA CCA TCG GAA CTC AAG GTG  
 854 AGC GCC GAC AAT GTT TCA TTA ACC GGT GCG GTA AGC CTC GCA TCA  
 899 ATG CTG ACG GAA ATA TTT CTC CTG CAA CAA GCA CAG GGA ATG CCG  
 944 GAG CCG GGG TGG GGA AGG ATC ACT GAT TCA CAC CAG TGG AAC ACC  
 989 TTG CTA AGT TTG CAT AAC GCG CAA TTT TAT TTA CTA CAA CGC ACG  
 1034 CCA GAG GTT GCC CGC AGT CGC GCC ACC CCG TTA TTG GAT TTG ATC  
 1079 AAG ACA GCG TTG ACG CCC CAT CCA CCG CAA AAA CAG GCG TAT GGT  
 1124 GTG ACA TTA CCC ACT TCA GTG CTG TTT ATT GCC GGA CAC GAT ACT  
 1169 AAT CTG GCA AAT CTC GGC GGC GCA CTG GAG CTC AAC TGG ACG CTT  
 1214 CCA GGT CAG CCG GAT AAC ACG CCG CCA GGT GGT GAA CTG GTG TTT  
 1259 GAA CGC TGG CGT CGG CTA AGC GAT AAC AGC CAG TGG ATT CAG GTT  
 1304 TCG CTG GTC TTC CAG ACT TTA CAG CAG ATG CGT GAT AAA ACG CCG  
 1349 CTA TCA TTA AAT ACG CCG CCC GGA GAG GTG AAA CTG ACC CTG GCA



1394 GGA TGT GAA GAG CGA AAT GCG CAG GGC ATG TGT TCG TTG GCC GGT  
 1439 TTT ACG CAA ATC GTG AAT GAA GCG CGC ATA CCG GCG TGC AGT TTG  
 1484 TAA

A jelen találmány egyik kiviteli formája szerint a mutáns savas foszfatáz/fitáz génjét a szakmában jól ismert rekombináns DNS technológia segítségével egy expressziós vektor-rendszerbe építjük be. Ezáltal a gént egy gazdaszövetben expresszáltathatjuk, és így megnyílik a lehetőség a savas foszfatáz/fitáz termelésére és tisztítására, valamint különböző készítményekben (mint például takarmányokban) történő felhasználására.

A mutáns savas foszfatáz/fitáz génjének DNS-e DNS-hibridizációs technikák segítségével izolálható és/vagy azonosítható. A jelen találmány szerinti nukleinsav-próbák (DNS- vagy RNS-próbák) szigorú feltételek mellett hibridizálni fognak egy komplementer nukleinsavval. Kevésbé szigorú feltételeket is választhatunk. A szigorú körülményeket általában úgy választjuk meg, hogy a hőmérséklet az aktuális szekvencia olvadási hőmérsékleténél ( $T_m$ ) körülbelül  $50^\circ\text{C}$ -kal alacsonyabb legyen, meghatározott ionerősségnél és pH-nál. A  $T_m$  az a hőmérséklet, amelynél az aktuális szekvencia 50 %-a egy tökéletesen összeillő próbával hibridizál (meghatározott ionerősségnél és pH-nál). A  $T_m$  függ az oldat jellemzőitől és a próba bázisösszetételétől; a  $T_m$  DNS-RNS hibridizáció esetén az alábbi képlet szerint számolható ki:

$$\begin{aligned}
 T_m = & 79,8^\circ\text{C} + (18,5 \times \log [\text{Na}^+]) \\
 & + (58,4^\circ\text{C} \times \%[\text{G}+\text{C}]) \\
 & - (820 / \text{a duplex bázispárjainak a száma}) \\
 & - (0,5 \times \% \text{formamid})
 \end{aligned}$$

(Promega Protocols and Applications Guide, 2. kiadás, Promega)



Corp., Madison, WI, (1991); amely teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). A nem-specifikus kötődés a sokféle, ismert eljárás bármelyikével megakadályozható, ilyen eljárások például az alábbiak: a membrán blokkolása fehérjetartalmú oldattal, heterológ RNS, DNS, és SDS hozzáadása a hibridizációs pufferhez, RN-ázzal történő kezelés.

A nukleinsav-hibridizációs vizsgálatokhoz vagy a génszorosozódás kimutatására szolgáló eljárásokhoz az alkalmas, szigorú feltételek általában a fent leírtaknak vagy az alábbi közleményben leírtaknak felelnek meg: Southern: „Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis”, J. Mol. Biol., 98: 503-517, (1975); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi. Például, a következő körülményeket olyan nukleinsav-próbák esetében alkalmazhatjuk, amelyek legalább 20, előnyösen legalább 25, vagy még előnyösebben legalább 30 bázist tartalmaznak: 42°C-on történő hibridizáció, 5X SSPE-vel és 50 % formamiddal; valamint 50°C-on történő mosás 0,5X SSPE-vel. A szigorúságot például azáltal növelhetjük, hogy 55°C-on vagy előnyösebben 60°C-on mosunk, megfelelően választott mosóközeget használva, ahol növekszik a mosóközeg nátrium-koncentrációja (pl.: 1X SSPE, 2X SSPE, 5X SSPE, stb.). Abban az esetben, ha továbbra is gondot okozna a kereszt-hibridizáció, tovább emelhetjük a hőmérsékletet, például úgy, hogy 65, 70, 75 vagy 80°C-on mosunk. A hibridizációs körülmények változtatásával azonosíthatók a kívánt homológia-fokú [pl. nagyobb mint 80, 85, 90 vagy 95 %-os homológia-fokú; a homológia-fok a TBLASTN nevű program (S.F. Altschul és mtsai.: „Basic Local Alignment Search Tool”, J. Mol. Biol., 215: 403-410, (1990); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képe-



zi) segítségével határozható meg, az alapértelmezés szerinti beállításokat használva] szekvenciák.

A jelen találmány szerinti, mutáns savas foszfatáz/fitáz előnyösen a szakmában ligázos detektálási reakcióként (LDR) és ligáz láncreakcióként (LCR) ismert módszerek (Barany: „Genetic Disease Detection and DNA Amplification Using Cloned Thermostable Ligase”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88(1): 189-193, (1991); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi) segítségével detektálható.

A jelen találmány szerinti DNS-molekula bármely prokariota vagy eukariota expressziós rendszerben expresszáltatható, ha a DNS-molekulát az expressziós rendszerbe megfelelő orientációban és leolvasási keretben építjük be. A fehérjekódoló szekvencia/szekvenciák expresszálására számos gazda-vektor rendszer alkalmas. Az előnyös vektorok közé tartoznak a virális vektorok, a plazmidok, a kozmidok vagy az oligonukleotidok. A vektor-rendszernek először is kompatibilisnek kell lennie a gazdasejttel. A gazda-vektor rendszerek közé többek között, de nem kizárólag, az alábbiak tartoznak: bakterioifág DNS-sel, plazmid DNS-sel vagy kozmid DNS-sel transzformált baktériumok; élesztő-vektorokat tartalmazó mikroorganizmusok (mint például élesztő); vírussal (pl. vakcinia vírussal, adenovírussal, stb.) fertőzött emlős-sejt rendszerek; vírussal (pl. bakulovírussal, stb.) fertőzött rovar-sejt rendszerek; valamint baktériumokkal fertőzött növényi sejtek. Ezen vektorok expressziós elemei különböző erősségűek és specificitásúak lehetnek. Az alkalmazott gazda-vektor rendszertől függően a számos, alkalmas transzkripciós és transzlációs elem bármelyike használható. Például, egy a jelen találmány szerinti DNS-molekula, a helyes leolvasási keretet figyelembe véve, egy transzkripciós enhan-



cer-elemmel van összekapcsolva.

A jelen találmány szerinti DNS-molekula expresszáására alkalmas előnyös gazdasejtek közé például különféle gombasejtek –mint például élesztők vagy fonalas gombák– tartoznak. Az előnyös élesztő-gazdasejtek például a *Saccharomyces cerevisiae* különféle törzseihez tartoznak. Másfajta élesztőket (mint például *Kluyveromyces*-t, *Torulospóra*-t vagy *Schizosaccharomyces*-t) is használhatunk. A fehérje túltermelésére használt élesztő-törzs egy előnyös kiviteli forma szerint a *Saccharomyces cerevisiae*. Az előnyös fonalas gomba gazdasejtek közé például az *Aspergillus*- és a *Neurospóra*-sejtek tartoznak. Az *Aspergillus* előnyösebb törzse az *Aspergillus niger*.

Az élesztő-törzs a jelen találmány egy másik előnyös kiviteli formája szerint egy metilotróf élesztő-törzs. A metilotróf élesztők azon élesztő-nemzetségekhez tartoznak, amelyek a sejtműködés fenntartásához szükséges energiaforrások előállítására szénforrásként képesek metanolt használni, és amelyek egy alkohol-oxidázt kódoló gént tartalmaznak. A jellegzetes metilotróf élesztők a *Pichia*, a *Hansenula*, a *Torulopsis*, a *Candida* és a *Karwinskia* nemzetségekhez tartoznak. Ezen élesztő-nemzetségek tagjai képesek arra, hogy egyedüli szénforrásként metanolt használjanak. A metilotróf élesztő-törzs egy előnyösebb kiviteli forma szerint a *Pichia pastoris*.

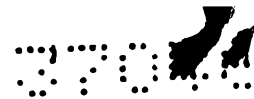
A tisztított fehérjét sokféle eljárás segítségével kaphatjuk meg. A jelen találmány szerinti fehérjét vagy polipeptidet előnyösen tisztított formában (előnyösen legalább körülbelül 80 %-os, még előnyösebben 90 %-os tisztaságban) állítjuk elő, hagyományos technikák segítségével. A jelen találmány szerinti fehérje vagy polipeptid általában a rekombináns gazdasejtek tényésztőközegébe szekretálódik. A jelen találmány szerinti fe-



hérje vagy polipeptid egy másik változat szerint nem szekretálódik a tenyésztőközegbe. Ez esetben –a fehérje izolálása céljából– a rekombináns plazmidot tartalmazó gazdasejteket szaporítjuk, majd azokat szonikálással, hővel vagy kémiai kezeléssel lizáljuk, és végül a homogenizátum centrifugálásával eltávolítjuk a sejttörmelékét. A felülúszót ezután sorozatos ammónium-szulfátos kicsapásnak vetjük alá. A jelen találmány szerinti fehérjét vagy polipeptidet tartalmazó frakciót a fehérjék szeparálása céljából egy megfelelő méretű dextrans- vagy poliakrilamid-oszlop felhasználásával gélszűrésnek vetjük alá. A fehérje-frakció szükség esetén HPLC-vel tisztítható tovább.

A jelen találmány tárgyát képezi ezenkívül egy olyan élesztő-törzs is, amely egy fitáz-aktivitással rendelkező fehérjét vagy polipeptidet kódoló heterológ gént tartalmaz. A heterológ gén működtethetően hozzá kell, hogy legyen kapcsolva egy olyan promoterhez, amely élesztőben képes elősegíteni a fitáz expresszióját.

A jelen találmány további tárgyát képezi egy olyan vektor, amely a fitáz élesztőben történő expresszáására szolgál. Ez a vektor egy olyan gént tartalmaz, amely nem élesztőből származik, és amely egy fitáz-aktivitással rendelkező fehérjét vagy polipeptidet kódol. A fitáz-gén bármely olyan vektorba klónozható, amely autonóm módon replikálódik vagy amely beépül az élesztő genomjába. Az autonóm módon replikálódó plazmidok (pl. az YE<sub>p</sub> plazmidok) kópiaszáma magas lehet, miközben a mitotikus stabilitásuk azonban elégtelen lehet (Bitter és mtsai.: „Expression and Secretion Vectors for Yeast”, Meth. Enzymol., 153: 516-544, (1987); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). Ezek tartalmazhatják a 2 mu-plazmid szekvenciát, amely az autonóm módon történő replikációért



felelős, valamint tartalmazhatnak egy *E. coli* eredetű szekven-  
ciát, amely az *E. coli*-ban történő replikációért felelős. A vek-  
torok előnyösen tartalmaznak egy genetikai markert, amely az  
élesztő-transzformánsok szelektálására szolgál; valamint egy  
antibiotikum-rezisztencia gént, amely az *E. coli*-ban történő  
szelektálásra szolgál. Az ARS és a CEN szekvenciákat tartal-  
mazó episzomális vektorok a sejtben egyetlen példányban for-  
dulnak elő, és sokkal stabilabbak, mint az YE<sub>p</sub> vektorok. Ha a  
DNS-fragmenst egy vagy több kópiában be akarjuk építeni az  
élesztő genomjába, akkor integrálódó vektorokat alkalmazunk.  
A rekombináns DNS ebben az esetben stabil, és nincs szükség  
szelekcióra (Struhl és mtsai.: „High-Frequency Transformation  
of Yeast: Autonomous Replication of Hybrid DNA Molecules”,  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 1035-1039, (1979); Powels és  
mtsai.: Cloning Vectors I-IV, és a következők, Elsevier,  
(1985); valamint Sakai és mtsai.: „Enhanced Secretion of Hu-  
man Nerve-Growth Factor from *Saccharomyces Cerevisiae*  
Using an Advanced  $\delta$ -Integration System”, Biotechnology, 9:  
1382-1385, (1991); amely közlemények mindegyike teljes egé-  
szében a jelen kitanítás részét képezi). Néhány vektor repliká-  
ciós origóval rendelkezik, amely a kiválasztott gazdasejtben  
működik. Az alkalmas replikációs origók közé például a követ-  
kezők tartoznak: 2 $\mu$ , ARS1 és 25  $\mu$ M. A vektorok restrikciós  
endonukleáz hasítási helyekkel is rendelkeznek, a fúziós gén, a  
promoter-szekvenciák és a szelekciós markerek beépítése céljá-  
ból. A vektorok restrikciós endonukleáz hasítási helyek eltávo-  
lításával vagy hozzáadásával, illetve egyéb, nemkívánatos nuk-  
leotidok eltávolításával módosíthatók.

A fitáz-gént bármilyen promoter irányítása alá helyezhet-  
jük (Stetler és mtsai.: „Secretion of Active, Full- and Half-

-Lenght Human Secretary Leukocyte Protease Inhibitor by *Saccharomyces cerevisiae*”, Biotechnology, 7: 55-60, (1989); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). Konstitutív vagy regulált élesztő promotert választhatunk. Az élesztő-vektorokhoz használható promoter-szekvenciák közé többek között a metallothionein vagy a 3-foszfo-glicerát-kináz promoterei tartoznak (Hitzeman és mtsai.: J. Biol. Chem., 255: 2073, (1980); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi), vagy egyéb glikolitikus enzimek promoterei (Hess és mtsai.: J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149, (1968); valamint Holland és mtsai.: Biochem., 17: 4900, (1978); amely közlemények mindegyike teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi), ilyen glikolitikus enzimek például az alábbiak: enoláz, glicerín-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz, hexokináz, piruvát-dekarboxiláz, foszfo-frukto-kináz, glükóz-6-foszfát-izomeráz, 3-foszfo-glicerát-mutáz, piruvát-kináz, trióz-foszfát-izomeráz, foszfo-glükóz-izomeráz és glükokináz. Az élesztős expressziós rendszerekben használható további alkalmas vektorokról és promoterekről az EP A-73,657 számú, európai szabadalmi leírásban (Hitzemann) olvashatunk, amely szabadalmi leírás teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi. Használhatjuk továbbá a glükózzal represszálható ADH2 promotert is (Russel és mtsai.: J. Biol. Chem., 258: 2674, (1982); valamint Beier és mtsai.: Nature, 300: 724, (1982); amely közlemények mindegyike teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi).

Konstitutív vagy regulált élesztő promotereket használhatunk. Az erős promoterek (mint például a foszfo-glicerát-kináz (PGK) génjének a promotere, vagy egyéb, glikolitikus enzimeket kódoló gének promoterei, valamint az alfa-faktor génjének a promotere) konstitutív promoterek. Ha konstitutív promotert



használunk, akkor a termék a sejtek növekedése során szintetizálódik. Az ADH2 promoter etanollal és glükózzal, a GAL-1-10 és a GAL-7 promoterek galaktózzal és glükózzal, a PHO5 promoter foszfáttal, a metallotionin promoter pedig rézzel regulálható(k). A hősokk promotereket, amelyekhez a HSP 150 promoter is tartozik, a hőmérséklet regulálja. Hibrid promotereket is használhatunk. Abban az esetben használunk regulált promotereket, ha a kívánt termék folyamatos expressziója káros a gazdas sejtekre. Élesztő-promoter helyett egy erős prokariota-promotert (ilyen például a T7 promoter) is használhatunk, de ez esetben az élesztő-törzset egy olyan génnel kell transzformálnunk, amely a megfelelő polimerázt kódolja. A transzkripció terminációjához a HSP 150 terminátort használhatjuk, vagy használhatunk bármilyen más, működőképes terminátor-szekvenciát is. A promotereket és a terminátor-szekvenciákat itt szabályozó elemeknek nevezzük. A jelen találmány nem korlátozódik semmilyen konkrét vektorra, promoterre vagy terminátor-szekvenciára.

A vektor egy szelektálható markert is tartalmazhat. A szelektálható markerek gyakran antibiotikum-rezisztencia gének, vagy olyan gének, amelyek képesek olyan élesztő-törzseket komplementálni, amelyek alaposan jellemzett anyagcsere-hiányosságokat mutatnak; ilyen élesztő-törzsek például azok a mutánsok, amelyek nem képesek triptofánt vagy a hisztidint szintetizálni. Az előnyös, szelektálható markerek közé például az alábbiak tartoznak: URA3, LEU2, HIS3, TRP1, HIS4, ARG4, vagy antibiotikum-rezisztencia gének.

A vektor tartalmazhat egy olyan replikációs origót is, amely egy baktérium-sejtben teszi lehetővé a replikációt. A vektorok manipulálása baktérium-törzsekben hatékonyabb. Az



előnyös, bakteriális replikációs origók közé tartozik a ColE1, az Ori vagy az oriT.

A fitáz-aktivitással rendelkező fehérjét vagy polipeptidet a sejtek előnyösen a tenyésztő-közegbe szekretálják. Ez nagyobb expressziós szintet tesz lehetővé, ráadásul így könnyebben izolálható a termék. A fitáz-aktivitással rendelkező fehérje vagy polipeptid ez esetben egy szignál-szekvenciához van hozzákapcsolva, amely a fehérjét a sejten kívülre irányítja. A szignál-szekvencia előnyös esetben lehasad a fehérjéről.

Az expresszált fitáz-enzimnek a tenyésztő-közegbe történő kiválasztásának az elősegítésére egy vezér-szekvenciát használhatunk, amely az élesztőből vagy a fitáz-génekből, illetve egyéb helyről származik. A jelen találmány nem korlátozódik semmilyen konkrét vezér-szekvenciára vagy szignál-peptidre.

Az alkalmas vezér-szekvenciák közé tartozik az élesztő alfa-faktorának a vezér-szekvenciája, amelyet a fitáz szekréciónak az irányítására használhatunk. Az alfa-faktor vezér-szekvenciáját gyakran a promoter szekvencia és a strukturális gén-szekvencia közé építjük be (Kurjan és mtsai.: Cell, 30: 933, (1982); Bitter és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 5330, (1984); a 4,546,082 számú, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; valamint a 324,274 számú, európai szabadalmi bejelentés; amely közlemények mindegyike teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). További alkalmas vezér-szekvencia a *S. cerevisiae* eredetű MF alfa 1 (alfa-faktor) vezér-szekvenciája; az MF alfa 1 egy 165 aminosavból álló prepro formaként szintetizálódik, amely egy 19 aminosavas szignál- vagy prepeptidet tartalmaz, amelyet egy 64 aminosavas „vezér”- vagy propeptid követ, amely három N-glikozilációs helyet tartalmaz, amit a (LysArg(Asp/Glu, Ala)<sup>2-3</sup> alfa-faktor)<sup>4</sup> követ

(Kurjan és mtsai.: Cell, 30: 933-943, (1982); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). A prepro MF alfa 1 szignál-vezér részét széleskörűen használták heterológ fehérjék *S. cerevisiae*-ben történő termeltetésére és szekréciónak az elősegítésére. Az élesztőével homológ szignál-/vezér-peptidek alkalmazásáról az alábbi közleményekben olvashatunk: a 4,546,082 számú, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; a 116,201, a 123,294, a 123,544, a 163,529 és a 123,289 számú, európai szabadalmi bejelentések; valamint a DK 3614/83 számú szabadalmi bejelentés; amely közlemények mindegyike teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi. Az idegen fehérjék szekréciónak az elősegítésére a 123,289 számú, európai szabadalmi bejelentés (amely teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi) a *S. cerevisiae* eredetű a-faktor prekurzor alkalmazását, a WO 84/01153 számú, nemzetközi közzétételi irat (amely teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi) a *Saccharomyces cerevisiae* eredetű invertáz szignál-peptid alkalmazását, a DK 3614/83 számú szabadalmi bejelentés (amely teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi) pedig a *Saccharomyces cerevisiae* eredetű PHO5 szignál-peptid alkalmazását javasolja.

A *Saccharomyces cerevisiae* eredetű alfa-faktor (MF alfa 1 vagy MF alfa 2) szignál-, illetve vezér-peptidje szintén alkalmas az élesztőben expresszált heterológ fehérjék szekréciónak az elősegítésére (lásd az alábbi közleményeket: a 4,546,082 számú, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; a 116,201, a 123,294, a 123,544 és a 163,529 számú, európai szabadalmi bejelentések; amely közlemények mindegyike teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). Kimutatták, hogyha a *S. cerevisiae* eredetű MF alfa 1 szignál-, illetve ve-

zér-szekvenciáját kódoló DNS-szekvenciát a kívánt fehérje génjének 5'-végéhez kapcsolták, akkor a kívánt fehérje szekretálódik és végbemennek rajta a szükséges módosulások. A WO 89/02463 és a WO 90/10075 számú, nemzetközi közzétételi iratokban (amelyek mindegyike teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi) arról olvashatunk, hogy az egér nyál-amiláz szignál-peptidje (vagy annak valamilyen mutánsa) alkalmas az élesztőben expresszált heterológ fehérjék szekréciónak az elősegítésére.

Az 5,726,038 számú, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban olvashatjuk, hogy az élesztő aszparaginsav-proteáz 3 szignál-peptidje alkalmas az élesztőben expresszált fehérjék szekréciónak a javítására. A szakember egyéb olyan vezér-szekvenciákat is ismer, amelyek képesek megkönnyíteni a rekombináns polipeptideknek az élesztő gazdasejtekből történő szekréciónak. A vezér-szekvencia a 3'-vég közelében módosítható, abból a célból, hogy kialakítsunk egy vagy több restriktív endonukleáz hasítási helyet. Ez megkönnyíti a vezér-szekvencia és a struktúrgén fúzióját.

A szakember számára ismertek az élesztő-transzformálás receptjei. Az egyik ilyen receptet Hinnen és mtsai. írták le (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1929, (1978); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). A Hinnen és mtsai. által ismertetett recept a Trp transzformánsok szelektív tápközegben történő szelektálását írja le, ahol a szelektív tápközeg az alábbiakat tartalmazza: 0,67 % élesztő nitrogén-alap; 0,5 % olyan aminosav, amit a kazein enzimatis lebonthatásával kapunk; 2 % glükóz; 10 µg/ml adenin és 20 µg/ml uracil.

A gén egy stabil expressziós vektorban vagy egy mester-



séges kromoszómában tartható fenn, vagy a gént beépíthetjük az élesztő gazdasejt kromoszómájába. A kromoszómába történő beépítés úgy valósítható meg, hogy a fitázt-gént egy olyan vektorba klónozzuk, amely rekombinációval beépül az élesztő valamelyik kromoszómájába. Az alkalmas vektorok olyan nukleotid-szekvenciákat tartalmazhatnak, amelyek homológok az élesztőkromoszóma nukleotid-szekvenciáival. A fitáz-gén egy másik változat szerint rekombinációs helyek (mint például átvihető genetikai elemek) között lehet, ami által a gén be tud épülni a kromoszómába.

A jelen találmány további tárgyát képezi egy vad típusú savas foszfatáz/fitáz enzimatisz tulajdonságainak a javítása. Az a kívánatos, hogy ezt a javítást úgy valósítsuk meg, hogy a vad típusú savas foszfatáz/fitáz aminosav-szekvenciáját a 200., a 207. és a 211. pozícióban módosítsuk, a fent leírtaknak megfelelően. Ezekkel a módosításokkal például javíthatjuk a savas foszfatáz/fitáz hőstabilitását. A javított enzimatisz tulajdonság egy másik változat szerint azt jelenti, hogy az enzim körülbelül pH 3,5 és 5,5 között nagyobb fitáz-aktivitással rendelkezik.

Egy élesztő-rendszerben termelt fitáz-enzim ugyanolyan hatékonyan hasítja le a foszfátot a kukorica- vagy szója-fitátról, mint az a fitáz, amely jelenleg a kereskedelmi forgalomban kapható, miközben azt tapasztaltuk, hogy egy élesztő-rendszerben termelt fitáz hőstabilabb. Az élesztős fitáz-overexpressziós rendszer alkalmas egy, az élelmiszer- és a takarmányiparban felhasználható hőstabil fitáz termelésére.

A jelen találmány szerinti, javított savas foszfatáz/fitáz felhasználható a takarmányozásban, abból a célból, hogy javítsuk az egyszerű gyomrú állatok [ilyen állatok például a követ-



kezők: baromfi, sertés, fejletlen bendővel rendelkező borjúk, egyes állatkerti állatok és kedvtelésből tartott állatok (pl. macskák vagy kutyák)] foszfát-emésztését. A jelen találmány alkalmazásával elérhető lenne, hogy a takarmányokhoz ne kelljen nagy mennyiségben szerves foszfátot keverni, így olcsóbb lenne a takarmányok előállítása, továbbá a takarmányok kisebb koncentrációban tartalmoznák a nem megújítható formában jelenlévő foszfátot. Mivel a jelen találmány megkönnyíti a foszfát felszívódását az egyszerű gyomrú állatok számára, ezért lehetséges, hogy ezeknek az állatoknak az ürüléke kevesebb hasznosítatlan fitát-foszfátot tartalmazzon, aminek következtében csökken a foszfát-szennyeződés mértéke.

A mutáns savas foszfatázt/fitázt a jelen találmány szerinti takarmány-készítmények előállítása során valamilyen nyers növényi anyaggal keverjük, majd a végterméket ezen keverék feldolgozásával tablettá vagy por formájában állítjuk elő. A nyers növényi anyag sokféle növény és/vagy a takarmányozásban általánosságban használt növényi melléktermék számos kombinációját tartalmazhatja, ezen növények vagy növényi részek közé például az alábbiak tartoznak: kukorica, szójabab, búza, rizs, gyapotmag, repcemag, cirok és burgonya. A takarmány-készítmény ezenkívül feljavítható különféle vitaminokkal, ásványi anyagokkal, állati fehérjékkel és antibiotikumokkal. A takarmány-készítmény az egyik kiviteli forma szerint az alábbiak keverékét tartalmazza: a mutáns savas foszfatáz/fitáz (a megfelelő koncentrációban), energiaforrás(ok) (pl. kukorica, búza), fehérjeforrás(ok) (pl. szójabab, rizs, gyapotmag-liszt, repcemag-liszt, cirokliszt), valamint vitamin- és ásványi anyag kiegészítők. A takarmány-készítmény a mutáns savas foszfatázt/fitázt 300-1000 egység/kg mennyiségben tartalmazza. Egy tipikus



takarmány-készítmény például az alábbiakat tartalmazza: 50-70 % kukorica, 20-30 % szójabab, körülbelül 1 % vitamin- és ásványi anyag kiegészítők, valamint a mutáns savas foszfatáz/fitáz megfelelő mennyisége.

A jelen találmány szerinti mutáns savas foszfatáz/fitáz ráadásul az emberi táplálkozás javítására is alkalmas, különösen azért, mert növeli a cink és a vas felvételét. Ha az emberi táplálékhoz hozzáadjuk a mutáns savas foszfatázt/fitázt, akkor számos, táplálkozási hiányból származó probléma (mint például a gyermekek növekedési zavara vagy szellemi visszamaradottsága) kezelhető, illetve megelőzhető.

A jelen találmány tárgyát képezi egy olyan alapvető molekuláris módszer is, amely széleskörűen alkalmazható különféle élőlényekből származtatható mutáns savas foszfatázok/fitázok tervezésére, aminek eredményeképpen javított enzimátikus tulajdonságokkal (mint például nagyobb hőstabilitással és katalitikus hatékonysággal) rendelkező mutánsokat kapunk. Ez a módszer magába foglalja egy vad típusú enzim génjének az azonosítását és izolálását; valamint az ezen a génen végzett helyspecifikus mutagenezist, abból a célból, hogy javítsuk az enzim működését és/vagy stabilitását. A jelen találmány egyik kiviteli formája szerint azért végzünk helyspecifikus mutagenezist, hogy a vad típusú génbe célzottan vigyünk be mutációkat, abból a célból, hogy a vad típusú enzimhez N-glikozilációs helyeket adjunk és/vagy megváltoztassuk az enzim fizikai-kémiai tulajdonságait (például növeljük az enzim nettó pozitív töltését). Ezenkívül a vad típusú génen abból a célból is végezhetünk célzott mutagenezist, hogy megszüntessünk bizonyos diszulfid-kötéseket (amelyek eredetileg jelen vannak a végleges fehérje-termékben), és így javítsuk az enzim hőstabilitását és katalitikus

működését.

## PÉLDÁK

### 1. Példa

#### A mutációk tervezéséhez szükséges szekvencia-analízis

Az AppA enzim glikozilációját javító mutációk tervezésénél az alábbiak voltak a fő szempontok: 1) a potenciális glikozilációs helynek az oldószer általi hozzáférhetősége 25 %-os, vagy annál nagyobb legyen; továbbá 2) a hely egy egyszeri aminosav-csere által könnyen kialakítható legyen, és így egy N-glikozilációs motívumot (Asn-X-Ser vagy Asn-X-Thr, ahol az X nem prolin) kapjunk. Kezdetben, az AppA enzim kristályszerkezetének a hiányában a patkány savas foszfatázának (35 %-os szekvencia-azonosság) a kristályszerkezetét (G. Schneider és mtsai.: EMBO J., 12: 2609-2615, (1993); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi) használtuk a hozzáférhetőségeknek az alábbiakban leírtak alapján történő kiszámítására. Először is, az AppA enzim és a patkány savas foszfatáz szekvenciáját a PIMA nevű program [amely képes több szekvenciát egymáshoz igazítani (egymás mellé rendelni)] (R. Smith és mtsai.: Protein Engineering, 5: 35-41, (1992); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi) segítségével számos, közeli rokon foszfatáz/fitáz szekvenciájához igazítottuk. Az alábbi fehérjék szekvenciáit igazítottuk egymáshoz: emberi prosztata savas foszfatáz prekursor (génbank (GeneBank) hozzáférési szám: P15309), a *Caenorhabditis elegans*-ból származó hisztidin savas foszfatáz (génbank (GeneBank) hozzáférési szám: Z68011), az *Aspergillus fumigatus*-ból származó fitáz (génbank (GeneBank) hozzáférési szám:

U59804), a *Pichia angusta*-ból származó, represszálható savas foszfatáz (génbank (GeneBank) hozzáférési szám: AF0511611), patkány savas foszfatáz (génbank (GeneBank) hozzáférési szám: 576257), és az *E. coli*-ból származó AppA (génbank (GeneBank) hozzáférési szám: M58708). Ezután a DSSP (definition of secondary structure of proteins) (W. Kabsch és mtsai.: Biopolymers, 22: 2577-2637, (1983); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi) nevű program segítségével a patkány foszfatáz összes aminosavának meghatároztuk az oldószer által hozzáférhető felszínét, majd ezekből az értékekből kiszámoltuk a százalékos hozzáférhetőséget, úgy hogy a megfelelő aminosav teljes felszínével osztottunk, amint azt korábban már leírták (D. Eisenberg és mtsai.: *Chemica Scripta*, 29A: 217-221, (1989); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). Csak azokat az aminosavakat tekintettük az oldószer számára hozzáférhetőnek, amelyekre 25 %-nál nagyobb érték jött ki. Az értékeket az AppA enzim megfelelő aminosavaihoz a fent leírt szekvencia-igazítás alapján rendeltük hozzá, azt feltételezve, hogy a patkány savas foszfatáz és az AppA enzim általános szerkezete konzervált. Végül pedig azokat az aminosavakat, amelyekről azt feltételeztük, hogy hozzáférhetőek az oldószer számára, abból a szempontból vizsgáltuk, hogy melyiknek a pontmutációja által lehetne könnyen egy N-glikozilációs helyet kialakítani. A 31 potenciális hely közül kiválasztottunk azt az 5-öt, amelyik a kívánt feltételeknek a legjobban megfelelt. A P2 jelű primer segítségével (amelyet egy másik *appA*-mutagenézis vizsgálatra terveztünk) egy további mutációt (a C200N-t) hajtottunk végre. A szekvenciák egymáshoz igazításából az derült ki, hogy a C200N mutáció egy úgynevezett hézag-régióban (gapped region) található; valamint

az, hogy a C200 a C210-zel együtt [Lim és mtsai. C178/C188-cal jelölik (Nat. Struct. Biol., 7: 108-113, (2000); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi)] részt vesz egy egyedüli diszulfid-kötés [amely a fehérje  $\alpha$ -doménjében a G-hélix és a GH-hurok (egy rendezetlen szakasz a G- és a H-hélixek között) között található] kialakításában (Lim és mtsai.: Nat. Struct. Biol., 7: 108-113, (2000); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). Így tehát 6 PCR-primert terveztünk: az E2-t és az K2-t a vad típusú *appA*-szekvencia (J. Dassa és mtsai.: J. Bacteriol., 172: 5497-5500, (1990); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi) felszaporítására, a többit pedig négy mutáns kialakítására (1. táblázat és 1. ábra). Az összes primert a Cornell University (Ithaca, NY) Oligonukleotid-Szintézis Részlegén szintetizálták.

1. táblázat  
Módosított primerek és a felszínnek az oldószerhez történő  
hozzáférhetőségének a mértéke a mutációk esetén

Primer <sup>1</sup>	Pozíció <sup>2</sup>	Primer-szekvencia <sup>3</sup>	Modosítás <sup>4</sup>	Hozzáférhetőség <sup>5</sup> (%)
E2 (f)	241-264	5' GGAATTCGCTCAGAGCCG GA 3' (5-ös számú szekvencia)	<i>Eco</i> RI restrikciós hely	-----
A1 (r)	565-592	5' CTGGGTATGGT <u>T</u> GGTTAT <u>ATT</u> ACAGTCAGGT 3' (6-os számú szekvencia)	A131N V134N	1,05 0,55
P2 (f)	772-795	5' CAAACTTGA <u>A</u> CCTTAAAC GTGAG 3' (7-es számú szekvencia)	C200N	nm
P3 (r)	796-825	5' CCTGCGTTAAGTTACAG CTTTC <u>A</u> TTCTGTTT 3' (8-as számú szekvencia)	D207N S211N	0,63 0,65
K2 (r)	1469-1491	5' GGGGTACCTTACAAACTG CACG 3' (9-es számú szekvencia)	<i>Kpn</i> I restrikciós hely	-----

<sup>1</sup> f=forward; r=reverse

<sup>2</sup> A nukleotid-pozíció az *E. coli*-nak a periplazmatikus, 2,5-ös pH-optimumú, savas foszfatázán (génbank (GeneBank) hozzáférési szám: M58708) alapul.

<sup>3</sup> Az aláhúzás a kicserélt nukleotidokat jelöli.

<sup>4</sup> Aminosav-mutációk vagy kialakított restrikciós helyek. A kódoló régió a 20. kodonnál kezdődik, és a 432. kodonnál ér véget. Az A131, a V134, a C200, a D207 és az S211 jelű aminosavakat Lim és mtsai. A109-cel, V112-vel, C178-cal, D185-tel és S189-cel jelölik (Nat. Struct. Biol., 7: 108-113, (2000); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi).

<sup>5</sup> Az aminosav-felszín oldószerhez való hozzáférhetőségének a százalékos mértéke (R. Smith és mtsai.: Protein Engineering, 5: 35-41, (1992); W. Kabsch és mtsai.: Biopolymers, 22: 2577-2637, (1983); amely közlemények mindegyi-

ke teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi); nm=nincs meghatározva.

## 2. Példa

### A mutánsok előállítása PCR-rel

Az *E. coli appA*-mutánsait a megaprimer helyspecifikus mutagenézis módszer szerint állítottuk elő (B. Seraphin és mtsai.: Nucl. Acids Res., 24: 3276-3277, (1996); valamint A.M. Smith és mtsai.: BioTechniques, 22: 438-439, (1997); amely közlemények mindegyike teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). A PCR –amelyet az *appA* intakt kódoló régiójának a felszaporítására használtunk– reakcióelegye az alábbi összetételű volt: 50 µl-es végtérfogat; 200 ng DNS [az *E. coli* BL21 jelű törzséből izolált, pAPPA1 jelű plazmidba (J. Dassa és mtsai.: J. Bacteriol., 172: 5497-5500, (1990); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi) beépített *appA*]; az E2 és a K2 jelű primerek mindegyikéből 50 pmol-nyi mennyiség; 5 egység AmpliTaq DNS-polimeráz (Perkin Elmer, Norwalk, CT); 10 mM koncentrációjú Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM koncentrációjú KCl; 12,5 mM koncentrációjú MgCl<sub>2</sub>; valamint mindegyik dNTP (Promega Corp., Madison, WI) 200 mM koncentrációban. A reakcióhoz a GeneAmp PCR system 2400 nevű készüléket (Perkin Elmer) használtuk, a PCR menete pedig a következő volt: 1 ciklus 94°C-on (3 perc); 30 ciklus, amely az alábbi szakaszokból állt: 0,5 perc 94°C-on, 1 perc 54°C-on és 1,5 perc 72°C-on; és végül 1 ciklus 72°C-on (10 perc). A mutánsokhoz tartozó megaprimereket egy külön PCR során állítottuk elő (2. táblázat).

2. táblázat

Az *E. coli* *appA*-mutánsok elnevezése és konstrukciója

		Konstrukció <sup>1</sup>	Méret (bp)	Glikozilációs helyek száma
Mutáns	R	E2A1P3K2	1350	7
	U	E2P2P3K2	1350	5
	Y	E2A1P2P3K2	1350	7
Vad típus	r-AppA	E2K2	1350	3

<sup>1</sup> A primer elnevezésével kapcsolatban lásd az 1. táblázatot.

Az első mutagén PCR-reakciót (100  $\mu$ l) a fent leírtak szerint végeztük, az alábbiak felhasználásával: az *appA* PCR-reakciókeverékének 4  $\mu$ l-e; valamint a megfelelő, az 1. táblázatban felsorolt, módosított primerek. Az összes megaprimer PCR-terméket agaróz gélelektroforézissel választottuk szét (1,5 %-os, alacsony olvadáspontú agaróz, Gibco BRL, Grand Island, NY). A gélből a várt fragmentumokat kivágtuk, majd azokat a GENE-CLEAN II nevű kit (Bio101, Vista, CA) segítségével mostuk ki a gélből. A végső mutagén PCR-reakciót (100  $\mu$ l) a fent leírtak szerint végeztük, az alábbiak felhasználásával: az *appA* PCR-reakciótermékének 4  $\mu$ l-e; valamint a tisztított megaprimer (különböző mennyiségben –50 ng és 4  $\mu$ g között–, a méretétől függően). Öt olyan ciklust végeztünk, ahol az egyes ciklusok a következő szakaszokból álltak: 1 perc 94°C-on, majd 2 perc 70°C-on. Miközben a reakcióelegy 70°C-os volt, 1  $\mu$ mol forward-primert és 2 egység AmpliTaq DNS-polimerázt adtunk hozzá, majd az elegyet óvatosan megkevertük; majd ezt követően 25 olyan ciklust végeztünk, ahol az egyes ciklusok a következő szakaszokból álltak: 1 perc 94°C-on, 1 perc 56°C-on, vala-



mint 1,5 perc 70°C-on.

### 3. Példa

#### Szubklónozás és expresszió

Kiindulási gazdaszervezetként az *E. coli* TOP10F' jelű törzsét (Invitrogen, San Diego, CA) használtuk. A PCR-fragmenseket tisztítottuk, majd a pGEMT-Easy nevű vektorba (Promega) klónoztuk, a gyártó utasításait követve. Az izolált plazmid-DNS *EcoRI*-es emésztését használtuk a pozitív transzformások szűrésére. A kapott inszerteket az *EcoRI*-helyen a pPICZ $\alpha$ A-ba (Kit Easy-Select, Invitrogen) klónoztuk, majd a plazmiddal TOP10F'-sejteket transzformáltunk, amelyeket 25  $\mu$ g/ml Zeocint tartalmazó LB (Luria-Bertani) közegen szélesztettünk. A kívánt inszertet a helyes orientációban tartalmazó kolóniák szűrésére a plazmid-DNS *SalI*-es vagy *BstXI*-es emésztését használtuk. A fehérje-expresszió céljára gazdaszervezetként a *P. pastoris* X33 jelű törzsét (Mut<sup>+</sup>His<sup>+</sup>; Invitrogen) használtuk, amelyet az elektroporációt megelőzően egy YPD (yeast extract peptone dextrose medium) nevű folyékony tápközegben tenyésztettünk. 2  $\mu$ g plazmid DNS-t a *BglII* vagy a *PmeI* jelű restriktív enzimek segítségével linearizáltunk, majd ezzel a DNS-sel a gyártó (Invitrogen) utasításainak megfelelően X33-sejteket transzformáltunk. Miután a szelektált transzformánsokat 24 órán keresztül glicerint tartalmazó minimál-tápközegben (GMGY) tenyésztettük, 0,5 % metanolt tartalmazó tápközeg (GMMY) használtunk a fehérje-expresszió indukálására.

### 4. Példa

#### Az enzim tisztítása és biokémiai jellemzése

A tápközeg felülúszójában lévő, expresszált r-AppA-t és a



mutáns enzimeket kétlépéses ammónium-szulfátos kicsapásnak (25 % és 75 %) vetettük alá, amint azt fentebb már említettük (E. Rodriguez és mtsai.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 257: 117-123, (1999); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). Az első lépés szuszpenzióját 4°C-on, 25000 g-n 20 percig centrifugáltuk. A második lépés csapadékát 10 ml, 25 mM koncentrációjú Tris-HCl-ben (pH 7) szuszpendáltuk, majd a szuszpenziót az említett oldattal szemben egy éjszakán át dializáltuk. A fehérje-extraktumot a dialízis után egy 25 mM koncentrációjú Tris-HCl-oldattal (pH 7) ekvibrált DEAE(diethyl-amino-etil)-Sepharose oszlopra (Sigma, St. Louis, MO) vittük fel. Az oszlophoz kötődött fehérjét 1 M koncentrációjú NaCl-oldattal [az oldószer egy 25 mM koncentrációjú Tris-HCl-oldat (pH 7)] eluáltuk. Azt a három frakciót, amelynek a legnagyobb volt az aktivitása, a következő vizsgálat céljára egyesítettük, és egy 25 mM koncentrációjú Tris-HCl-oldattal (pH 7,5) szemben dializáltuk. A fitáz-aktivitás méréséhez szubsztrátként nátrium-fitátot használtunk (E. Rodriguez és mtsai.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 257: 117-123, (1999); valamint C.S. Piddington és mtsai.: *Gene*, 133: 56-62, (1993); amely közlemények mindegyike teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). Az enzimet 0,25 M glicin-HCl-oldattal (pH 2,5) hígítottuk, és ugyanannyi térfogat szubsztrát-oldatot [amely 11 mM nátrium-fitátot tartalmazott (Sigma)] adtunk hozzá. A mintát 15 percig inkubáltuk 37°C-on, majd a reakciót azonos térfogatú, 15 %-os triklór-ecetsav hozzáadásával állítottuk le. Ezután 0,2 ml mintához a következőket adtuk: 1,8 ml víz és az alábbi összetételű oldatból 2 ml: 0,6 M koncentrációjú kénsav, 2 % aszkorbinsav és 0,5 % ammónium-molibdát; majd az elegyet megkevertük, és 50°C-on 20 percig inkubáltuk, és



végül a szabad, szervesetlen foszfor mennyiségét 820 nm-en meghatároztuk. 1 fitáz-egységet úgy definiáltunk, mint azt az aktivitást, amely a nátrium-fitátról 1 perc alatt, 37°C-on 1  $\mu$ mol szervesetlen foszfort hasít le. Az enzim-kinetikai mérésekhez a nátrium-fitátot a következő végkoncentrációkban használtuk: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2,5; 10 és 25 mM. A savas foszfatáz-aktivitás meghatározására pNPP-t (Sigma) használtunk, 25 mM végkoncentrációban (R. Smith és mtsai.: Protein Engineering, 5: 35-41, (1992); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). 50  $\mu$ l enzimhez (40 nmol) 850  $\mu$ l, 250 mM koncentrációjú glicin-HCl-oldatot (pH 2,5) adtunk. Az elegyet ezután 37°C-on 5 percig inkubáltuk, majd 100  $\mu$ l pNPP-t adtunk hozzá. Ezt követően 0,1 ml mintát 0,9 ml, 1 M koncentrációjú NaOH-oldattal kevertünk, majd az elegyet 10 percig inkubáltuk, és végül a felszabadult *p*-nitro-fenol mennyiségét 405 nm-en meghatároztuk. Az enzim-kinetikai mérésekhez a pNPP-t a következő végkoncentrációkban használtuk: 0,1; 0,2; 0,75; 1; 2,5; 10 és 25 mM. A savas foszfatáz-/fitáz-aktivitás 1 egységét úgy definiáltunk, mint azt az enzim-mennyiséget, amely 1 perc alatt 1  $\mu$ mol *p*-nitro-fenol keletkezését katalizálja. Az enzimet (2 mg/ml) a hőstabilitási vizsgálat előtt 0,2 M koncentrációjú glicin-HCl-oldattal (pH 2,5) 1:400 arányban hígítottuk. A hígított mintákat 25, 55, 80 vagy 90°C-on 15 percig inkubáltuk. A mintákat ezután 30 percig jégen tartottuk, majd a fent leírtak alapján meghatároztuk a megmaradó fitáz-aktivitást. A tisztított enzimeket úgy deglikoziláltuk, hogy 100  $\mu$ g összfehérje-mennyiséget 37°C-on 0,5 nemzetközi egység endoglikozidáz H<sub>f</sub>-fel (Endo H<sub>f</sub>) 4 órán keresztül inkubáltuk, a gyártó (New England Biolabs, Beverly, MA) utasításainak megfelelően. A nátrium-dodecil-szulfátos poliakrilamid-gélelektroforézist (SDS-



-PAGE) (15 vegyes %-os gélt használva) az irodalomban leírtak alapján (U.K. Laemmli: Nature, 227: 680-685, (1970); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi) végeztük. A fehérje-koncentrációkat a Lowry-módszer (O.H. Lowry és mtsai.: J. Biol. Chem., 193: 265-275, (1951); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi) segítségével határoztuk meg.

Az adatokat a SAS nevű program (6.04-es verzió, SAS institute, Cary, NC, USA) segítségével elemeztük.

### 5. Példa

#### A helyspecifikus mutagenézisnek a fitáz-expresszióra és a glikozilációra gyakorolt hatása

Minden egyes élesztő-transzformánsból genomikus DNS-t vontunk ki, azért hogy a kívánt, mutáltatott *appA*-t az E2 és a K2 jelű primerek segítségével PCR-rel felszaporítsuk. Minden egyes kívánt mutációt szekvenálással erősítettünk meg. Minden egyes mutáns esetén 24 kolónia fitáz-aktivitását vizsgáltuk, az indukció után különböző időpontokban. Mindhárom mutáns fehérje (vagyis az R, az U és az Y jelű mutáns fehérje), továbbá az r-AppA is, expresszáldott és szekretáldott, ami azt eredményezte, hogy az extracelluláris fitáz-aktivitás időben nőtt, amely 96 órával a metanollal történő indukció után elért egy platót. A tápközeg felülúszójában a plató-aktivitás 35, 175, 57 és 117 egység/ml volt (3. táblázat). Kontrollként a pPICZ $\alpha$ A jelű expressziós vektorral transzformált, X33 jelű élesztő-törzset használtuk, amely nem mutatott semmiféle aktivitást, továbbá SDS-PAGE-s vizsgálattal sem tudtunk kimutatni fitáz-fehérjét. Ha a tisztított fehérjéket vesszük alapul, akkor az U jelű mutáns fehérjének volt a legnagyobb a specifikus fitáz-aktivitá-

sa (63 egység/mg), amelyet az Y jelű mutáns fehérje (51 egység/mg), az r-AppA (41 egység/mg) és az R jelű mutáns fehérje aktivitása (32 egység/mg) követett. A tisztítás után az U jelű mutáns fehérje, az Y jelű mutáns fehérje, az r-AppA és az R jelű mutáns fehérje kitermelése 654, 324, 688, illetve 425 mg/l volt (3. táblázat).

### 3. táblázat

#### Fitáz-kitermelés, valamint az r-AppA és a három mutáns fehérje specifikus aktivitása

Fehérje	Fitáz-aktivitás <sup>1</sup>	Fehérje-kitermelés <sup>2</sup>	Specifikus aktivitás <sup>3</sup>	
			-Endo H <sub>f</sub>	+Endo H <sub>f</sub>
r-AppA	117±15	688±44	41±3	37±4
R	35±4	425±26	32±2	29±2
U	175±19	654±39	63±4*	65±5*
Y	57±8	324±18	51±5	46±6

<sup>1</sup> Fitáz-aktivitás (egység/ml) GMMY tápközegben, 96 órás tenyésztés után

<sup>2</sup> Fehérje-kitermelés (mg tisztított fehérje egy liter tenyészetben)

<sup>3</sup> Specifikus fitáz-aktivitás (egység/mg tisztított fehérje)

\* Szignifikáns különbség (P<0,05) az r-AppA kontrollhoz képest. Az eredményeket három kísérletből kaptuk.

Az SDS-PAGE-s vizsgálat során a tisztított r-AppA molekulatömege 50-56 kDa-nak, az R jelű mutáns fehérje molekulatömege 68-70 kDa-nak, az Y jelű mutáns fehérje molekulatömege pedig 86-90 kDa-nak bizonyult (2. ábra). A molekulatömeg növekedésének az oka a glikozilációs fok növekedése (a glikozilációs fok 14 %-os az r-AppA-ban, 48 %-os az R jelű mutáns fehérjében, és 89 %-os az Y jelű mutáns fehérjében). Az U jelű mutáns fehérje glikozilációs foka azonosnak bizonyult az r-

-AppA glikozilációs fokával. Endo  $H_f$ -fel történő deglikoziláció után ezen rekombináns enzimek mindegyikének hasonló volt a molekulatömege (45-48 kDa). A deglikoziláció nem volt szignifikáns hatással a mutánsok, valamint az r-AppA specifikus aktivitására (3. táblázat). Ha azonban ezeket a tisztított fehérjéket  $\beta$ -merkaptó-etanollal és Endo  $H_f$ -fel is kezeltük, akkor a fitáz-aktivitás teljes elvesztését tapasztaltuk.

### 6. Példa

#### A helyspecifikus mutagenézisnek a fitáz pH- és hőmérsékleti optimumára, valamint hőstabilitására gyakorolt hatása

Habár mind az R, mind az U, mind az Y jelű mutáns fehérjének ugyanaz volt pH-optimuma, mint az r-AppA-nak (2,5), pH 3,5-ön, 4,5-ön és 5,5-ön az U jelű mutáns fehérje aktívabb volt, mint az r-AppA ( $p < 0,05$ ), az Y jelű mutáns fehérje pedig kevésbé volt aktív, mint az r-AppA ( $p < 0,05$ ) (3. ábra). Az U jelű mutáns fehérje hőmérsékleti optimuma  $65^\circ\text{C}$  volt, a másik két mutáns fehérje és az r-AppA hőmérsékleti optimuma pedig  $55^\circ\text{C}$  volt. 0,2 M glicin-HCl-ben (pH 2,5) az U jelű mutáns fehérje megmaradó fitáz-aktivitása magasabb volt, mint az r-AppA megmaradó fitáz-aktivitása ( $p < 0,05$ ), miután az enzimeket 15 percig  $80$ , illetve  $90^\circ\text{C}$ -on tartottuk (4. ábra).

### 7. Példa

#### A helyspecifikus mutagenézisnek az enzim-kinetikára gyakorolt hatása

Az U jelű mutáns fehérje esetén az r-AppA-hoz képest a pNPP-re (*p*-nitrofenil-foszfát) vonatkozó  $K_m$ -érték a felére csökkent, a nátrium-fitátra vonatkozó  $K_m$ -érték pedig 70 %-kal csökkent ( $p < 0,05$ ) (4. táblázat). Következésképpen az U jelű

mutáns fehérje látszólagos katalitikus hatékonysága ( $k_{cat}/K_m$ ) a pNPP esetén 1,9-szeres, a nátrium-fitát esetén pedig 5,2-szeres emelkedést mutatott az r-AppA-nál tapasztaltakhoz képest. Habár az Y jelű mutáns fehérje  $k_{cat}/K_m$ -értéke a nátrium-fitát esetén szintén szignifikánsan különbözött az r-AppA  $k_{cat}/K_m$ -értékétől, a valódi növekedés csak viszonylag kismértékű volt. Az R jelű mutáns fehérje katalitikus hatékonysága ezzel szemben mindkét szubsztrát esetén szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az r-AppA katalitikus hatékonysága.

4. táblázat

Az r-AppA és a három mutáns fehérje katalitikus tulajdonságai<sup>1</sup>

Enzim	Szubsztrát					
	pNPP			Na-fitát		
	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (min <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (min <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )
r-AppA	3,66± 0,44	752± 7,9	(2,0±0,18) x10 <sup>5</sup>	1,95± 0,25	2148± 33	(1,11±0,13) x10 <sup>6</sup>
R	7,87± 0,84*	390± 5,9*	(0,5±0,07) x10 <sup>5</sup> *	3,07± 0,26*	1657± 23*	(0,54±0,09) x10 <sup>6</sup> *
U	1,86± 0,35*	1073± 13*	(5,8±0,37) x10 <sup>5</sup> *	0,58± 0,08*	4003± 56*	(6,90±0,70) x10 <sup>6</sup> *
Y	3,18± 0,39	787± 6,7	(2,5±0,17) x10 <sup>5</sup>	2,03± 0,19	3431± 41*	(1,69±0,21) x10 <sup>6</sup> *

<sup>1</sup> A reakciósebességi méréseket három párhuzamosban végeztük, az itt leírtak szerint. A  $K_m$ -értékeket a Lineweaver-Burk-féle grafikonos módszer segítségével számoltuk ki. Az összes reakciót 0,25 M glicin-HCl-ben (pH 2,5) végeztük.

\* Szignifikáns különbség ( $P < 0,05$ ) az r-AppA kontrollhoz képest. Az eredményeket öt független kísérletből kaptuk.

A fenti eredmények arra utalnak, hogy az AppA enzimhez helyspecifikus mutagenézissel további N-glikozilációs helyek adhatók, valamint/vagy egyéb aminosav-cserék végezhetők az enzimen. Az R és az Y jelű mutáns enzimek esetén –az intakt *appa*-génről termelődő r-AppA-val összehasonlítva– a nagyobb mértékű glikoziláció világosan látható volt, erre az utalt, hogy

ezen enzimeknek a deglikoziláció előtt és után különbözőek voltak a molekulatömegeik. Tehát ezen két mutáns esetén a *P. pastoris* valóban felismerte a mesterségesen kialakított N-glikozilációs helyeket, amelyeknek a sejten belül történő „feldolgoása” is helyesen történt. Mivel az R és az Y jelű mutánsok több mutációt is tartalmaznak, ezért ezen eredmények alapján nem tudjuk megbecsülni, hogy egy konkrét, mesterségesen kialakított N-glikozilációs helyen milyen fokú a glikoziláció, de hasznos információt nyerhetünk a mutáns fehérjék egymás közötti, valamint az r-AppA-val történő összehasonlításából. Először is, habár mind az R, mind az Y jelű mutáns fehérje négyszer több N-glikozilációs hellyel rendelkezik, mint az r-AppA, az Y jelű mutáns fehérje glikozilációs foka magasabb mint az R jelű mutáns fehérje glikozilációs foka (89 %, illetve 48 %). Mivel az Y jelű mutáns esetén végrehajtott C200N szubsztitúció az egyetlen különbség ezen két mutáns fehérje között, és mivel ezzel a szubsztitúcióval nem adtunk további, feltételezett N-glikozilációs helyeket a fehérjéhez, ezért úgy tűnik, hogy a C200N csere önmagában képes növelni az N-glikoziláció fokát bizonyos helyeken. Másodszor, habár az U jelű mutáns két hozzáadott N-glikozilációs hellyel is rendelkezik (Asn 207 és Asn 211), a látszólagos molekulatömege azonos volt az r-AppA-éval, ami arra enged következtetni, hogy a két mesterségesen kialakított N-glikozilációs hely az U jelű mutáns esetében „csendes”. Ez azt mutatja, hogy egy ilyen szignál-szekvencia jelenléte bár szükséges a glikozilációhoz, azonban az nem feltétlenül eredményez glikozilációt (M. Meldgaard és mtsai.: *Microbiol.*, 140: 159-166, (1994); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). Lehetséges, hogy azok az aminosavak, amelyek az U jelű mutáns fehérje esetében mu-



tálatva vannak, nem annyira hozzáférhetőek az oldószer számára, mint ahogyan azt a szerkezet alapján végzett szekvencia egymáshoz igazítás alapján váránk. Az AppA enzim mostanság publikált kristályszerkezete talán segít megoldani ezt a kérdést (Lim és mtsai.: *Nat. Struct. Biol.*, 7: 108-113, (2000); valamint Z. Jia és mtsai.: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 54: 647-649, (1998); amely közlemények mindegyike teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). Végül pedig, az R jelű mutáns fehérje glikozilációs foka szignifikánsan magasabb mint az U jelű mutáns fehérje glikozilációs foka. A különbséget az R jelű mutáns fehérjének a két hozzáadott N-glikozilációs helye (amelyeket az A131N és a V134N cserék által kaptunk) okozhatja. A fenti eredmények alapján az alábbiakat mondhatjuk: 1) az A131N és a V134N cserék fokozzák az AppA enzim glikozilációját; 2) a D207N és az S211N cserék „csendesek”; 3) a C200N csere úgy tűnik, hogy növelte az Y jelű mutáns fehérje glikoziláltságát egyéb helyeken, az U jelű mutáns fehérje glikoziláltságát azonban nem növelte.

Kimutatták, hogy a fehérjék további glikozilációja általában megkönnyíti a fehérjék térszerkezetének a kialakulását és fokozza a fehérjék stabilitását (M. Haraguchi és mtsai.: *Biochem. J.*, 312: 273-280, (1995); valamint B. Imperiali és mtsai.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 97-112, (1995); amely közlemények mindegyike teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). Ellentétben azzal, amit vártunk, az R és az Y jelű mutáns fehérjéknek nem volt nagyobb a hőstabilitásuk, annak ellenére, hogy magasabb volt a glikozilációs fokuk. Az U jelű mutáns fehérjének viszont meglepő módon nagyobb volt a hőstabilitása, annak ellenére, hogy a glikozilációs foka ugyanakkora volt, mint az r-AppA-é. Habár a C200N csere nem vonja maga után,



hogy az N-glikoziláció egyéb helyeken is megtörténjen, bizonyos helyeken azonban elképzelhető a glikoziláció fokozódása. Úgy tűnik, hogy inkább a mutációk *önmagukban* –mintsem a glikoziláció– járult(ak) hozzá ehhez az eredményhez. Egy nemrég megjelent tanulmány hat különböző fitáz előállítását ismerteti, amelyeket vagy az *Aspergillus niger*-ben vagy a *Hansenula polymorpha* nevű élesztőben expresszáltak (M. Wyss és mtsai.: Appl. Environ. Microbiol., 65: 359-366, (1999); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). Az eredmények azt mutatták, hogy a glikoziláció foka a választott gazdaszervezettől függött, azonban az nem befolyásolta szignifikánsan a hőstabilitást, a specifikus aktivitást vagy a fehérje térszerkezetének újbóli kialakulását (M. Wyss és mtsai.: Appl. Environ. Microbiol., 65: 359-366, (1999); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi).

A kinetikai adatok azt mutatják, hogy az r-AppA, továbbá mindhárom mutáns fehérje alacsonyabb  $K_m$ - és magasabb  $k_{cat}/K_m$ -értékekkel rendelkezik a nátrium-fitátra, mint a pNPP-re. Világosan látszik, hogy ezen rekombináns enzimek látszólagos hatékonysága nagyobb a nátrium-fitát esetén, mint a pNPP esetén, ami arra utal, hogy az AppA enzim inkább fitáz, mint savas foszfátáz (Lim és mtsai.: Nat. Struct. Biol., 7: 108-113, (2000); valamint E. Rodriguez és mtsai.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 257: 117-123, (1999); amely közlemények mindegyike teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). Az U jelű mutáns fehérjének nőtt a legjobban a látszólagos hatékonysága –mindkét szubsztrátra vonatkozóan– az r-AppA-éhoz képest. Az a legvalószínűbb, hogy a  $k_{cat}/K_m$  növekedése a  $K_m$  nagymértékű csökkenésének köszönhető (1,86 mM a 3,66 mM-lal szemben a pNPP esetén, valamint 0,58 mM az 1,95 mM-lal

szemben a nátrium-fitát esetén). Ez azt jelenti, hogy az U jelű mutáns már sokkal kisebb szubsztrát-koncentrációnál telítődik, mint az r-AppA. Ráadásul ezen két fitáz-forma között a  $k_{cat}$ -ban is szignifikáns különbség mutatkozott, mindkét szubsztrátra vonatkozóan. A patkány savas foszfatázának a szerkezete alapján (G. Schneider és mtsai.: EMBO J., 12: 2609-2615, (1993); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi) úgy tűnik, hogy ezek a mutációk nem érintik az enzim aktív helyét, vagy azon részét, amely a savas foszfatáz dimerek kialakulásáért felelős. Lehetséges, hogy ezek a mutációk –önmagukban vagy közösen– az enzim konformációs flexibilitására vannak hatással, amint azt korábban már egy másik fehérjére leírták (G. Kern és mtsai.: Protein Sci., 2: 1862-1868, (1993); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). Az *E. coli*-ből származó fitáz nemrég közölt kristályszerkezete alapján (Lim és mtsai.: Nat. Struct. Biol., 7: 108-113, (2000); valamint Z. Jia és mtsai.: Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 54: 647-649, (1998); amely közlemények mindegyike teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi) azt mondhatjuk, hogy ezen mutációk egyike sem érinti közvetlenül a szubsztrátkötő zsebet. Azonban a C200 és a C210 [amelyet Lim és mtsai. C178-cal és C188-cal jelölnek (Nat. Struct. Biol., 7: 108-113, (2000); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi)] a fehérje  $\alpha$ -doménjében a G-hélix és a GH-hurok között egy diszulfid-kötés kialakításában vesz részt (Lim és mtsai.: Nat. Struct. Biol., 7: 108-113, (2000); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). A C200N mutáció azt eredményezi, hogy megszűnik az  $\alpha$ -domén egyedüli diszulfid-kötése, amely a G-hélix és a GH-hurok között volt. Ennek a cserének az lehet a következménye, hogy az

$\alpha$ -domén könnyebben mozdul el az enzim központi ürege vagy „szubsztrátkötő helye” felé (Lim és mtsai.: Nat. Struct. Biol., 7: 108-113, (2000); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi). Ezt a belső flexibilitásról szóló elméletet az a tény is alátámaszthatja, hogy az U jelű mutáns fehérje, és kisebb mértékben az Y jelű mutáns fehérje is, fokozott katalitikus hatékonyságot mutatott a nátrium-fitát hidrolízise során. Mivel az U jelű mutáns fehérje glikozilációs foka nem nőtt, ezért a mesterségesen kialakított glikozilációs helyek [vagyis az N207 és az N211, amelyet Lim és mtsai. D 185-tel és S189-cel jelölnek (Nat. Struct. Biol., 7: 108-113, (2000); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi)] valószínűleg el vannak rejtve az oldószernek kitett felszíntől. Az U jelű mutáns fehérje fokozott hőstabilitása ezért a megnövekedett számú hidrofób kölcsönhatásokkal magyarázható, ami nincs jelen az Y vagy az R jelű mutáns fehérjékben.

Érdemes megemlíteni, hogy a deglikoziláció nem volt szignifikáns hatással a specifikus fitáz-aktivitásra, sem a három mutáns fehérje, sem az r-AppA esetén. A deglikoziláció azonban okozhat olyan konformációs változásokat, amelyek hatással vannak a szubsztrát-kötődésre és/vagy a szubsztrát-átalakítás sebességére, amint az a glikoprotein hormonok (M. Terashima és mtsai.: Eur. J. Biochem., 226: 249-254, (1994); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi) vagy az *S. cerevisiae*-ben expresszált, *Schwanniomyces occidentalis*-ből származó  $\alpha$ -amiláz (Y. Han és mtsai.: Appl. Environ. Microbiol., 65: 1915-1918, (1999); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi) esetében tapasztalható. A  $\beta$ -merkapto-etanolal történő kezelés és a deglikoziláció együtt teljesen inaktiválta mindegyik mutáns fehérjét, valamint az intakt



kontrollt is. Ez arra utal, hogy a négy diszulfid-kötés együtt kulcsszerepet játszik ezen rekombináns fitázok katalitikus működésének a fenntartásában (A.H.J. Ullah és mtsai.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 227: 311-317, (1996); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi).

Végezetül, az U jelű mutáns fehérjében, ahol hiányzik a G-hélix és a GH-hurok közötti diszulfid-kötés (amely egyébként a C200 és a C210 között alakul ki), lehetséges, hogy az  $\alpha$ -domén egy kicsivel flexibilisebbé válik, ami pozitív hatással van az enzim katalitikus hatékonyságára és hőstabilitására. Mivel az *E. coli*-ből származó fitáz kristályszerkezetét a közeljövőben fogják publikálni (Lim és mtsai.: *Nat. Struct. Biol.*, 7: 108-113, (2000); amely közlemény teljes egészében a jelen kitanítás részét képezi), ezért a további, célzott mutagenézises kísérletek fényében érthetővé kell, hogy váljanak azok a konformációs változások, amelyek javíthatják az enzim jellemzőit.

Habár itt részleteiben az előnyös kiviteli formákat ismergettük, a szakember számára nyilvánvaló, hogy számos módosítás, hozzáadás, behelyettesítés, stb. képzelhető el, anélkül hogy eközben eltávolodnánk a jelen találmány szellemétől, ezért ezek is a jelen találmány alábbi igénypontok által meghatározott tárgyát képezik.

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy izolált, mutáns savas foszfatáz/fitáz, amelyet úgy állítunk elő, hogy az 1-es számú szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciájú, *Escherichia coli*-ből származó, vad típusú savas foszfatázon/fitázon több aminosav-cserét hajtunk végre, ahol az említett aminosav-cserék magukba foglalják a 200., a 207. és a 211. pozícióban végrehajtott aminosav-cseréket.

2. Az 1. igénypont szerinti, izolált, mutáns savas foszfatáz/fitáz, azzal jellemezve, hogy a 200. pozícióban végrehajtott aminosav-csere egy Cys cseréje Asn-ra, a 207. pozícióban végrehajtott aminosav-csere egy Asp cseréje Asn-ra, valamint a 211. pozícióban végrehajtott aminosav-csere egy Ser cseréje Asn-ra, ahol az említett, izolált, mutáns savas foszfatáz/fitáz aminosav-szekvenciája a 3-as számú szekvenciának felel meg.

3. Az 1. igénypont szerinti, izolált, mutáns savas foszfatáz/fitáz, azzal jellemezve, hogy tiszta formában van jelen.

4. Az 1. igénypont szerinti, izolált, mutáns savas foszfatáz/fitáz, ahol az izolált, mutáns savas foszfatáz/fitáz rekombináns.

5. Eljárás a vad típusú, *Escherichia coli*-ből származó, az 1-es számú szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciájú savas foszfatáz/fitáz enzimatiskus tulajdonságainak a javítására, ahol az említett eljárás magába foglalja a következőt: az említett, vad típusú savas foszfatáz/fitáz aminosav-szekvenciájának a megváltoztatása, azáltal hogy az 1-es számú szekvencia 200.,

207. és 211. pozíciójában aminosav-cseréket hajtunk végre.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a 200. pozícióban végrehajtott aminosav-csere egy Cys cseréje Asn-ra, a 207. pozícióban végrehajtott aminosav-csere egy Asp cseréje Asn-ra, valamint a 211. pozícióban végrehajtott aminosav-csere egy Ser cseréje Asn-ra, ahol az említett aminosav-cserék egy olyan mutáns savas foszfatázt/fitázt eredményeznek, amelynek az aminosav-szekvenciája a 3-as számú szekvenciának felel meg.

7. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a javított enzimatiság tulajdonság a nagyobb hőstabilitás.

8. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a javított enzimatiság tulajdonság a fokozott fitáz-aktivitás, körülbelül 3,5 és 5,5 közötti pH-tartományban.

9. Egy, az 1. igénypont szerinti, mutáns savas foszfatázt/fitázt kódoló izolált DNS-molekula.

10. A 9. igénypont szerinti, izolált DNS-molekula, ahol a vad típusú savas foszfatázt/fitázt az *E. coli*-ből izoláljuk.

11. A 10. igénypont szerinti, izolált DNS-molekula, azzal jellemezve, hogy tartalmaz egy, a 4-es számú szekvenciának megfelelő nukleotid-szekvenciát, vagy egy olyan DNS-molekulához hibridizál, amely tartalmaz egy, a 4-es számú szekvenciának megfelelő nukleotid-szekvenciát, ahol a hibridizáció az alábbi szigorúsági feltételek mellett történik: 42°C-on történő

hibridizáció, 5X SSPE-t és 50 % formamidot tartalmazó hibridizációs közegben; valamint 50°C-on történő mosás 0,5X SSPE-vel.

12. A 9. igénypont szerinti, izolált DNS-molekula, azzal jellemezve, hogy a 200. pozícióban végrehajtott aminosav-csere egy Cys cseréje Asn-ra, a 207. pozícióban végrehajtott aminosav-csere egy Asp cseréje Asn-ra, valamint a 211. pozícióban végrehajtott aminosav-csere egy Ser cseréje Asn-ra, ahol az említett aminosav-cserék egy olyan mutáns savas foszfatázt/fitázt eredményeznek, amelynek az aminosav-szekvenciája a 3-as számú szekvenciának felel meg.

13. Egy rekombináns-DNS expressziós rendszer, amely tartalmaz egy, a 9. igénypont szerinti DNS-molekulát.

14. A 13. igénypont szerinti expressziós rendszer, azzal jellemezve, hogy a DNS-molekula egy heterológ expressziós vektorban van.

15. A 13. igénypont szerinti expressziós rendszer, azzal jellemezve, hogy a DNS-molekulát a megfelelő orientációban, valamint a helyes leolvasási keret figyelembe vételével építjük be az expressziós rendszerbe.

16. Egy gazdasejt, azzal jellemezve, hogy tartalmaz egy, a 9. igénypont szerinti, heterológ DNS-molekulát.

17. A 16. igénypont szerinti gazdasejt, azzal jellemezve, hogy az említett, heterológ DNS-molekula nukleotid-szekven-



ciája a 4-es számú szekvenciának felel meg.

18. A 16. igénypont szerinti gazdasejt, azzal jellemezve, hogy az említett, heterológ DNS-molekula egy rekombináns-DNS expressziós rendszerben van.

19. A 16. igénypont szerinti gazdasejt, ahol az említett gazdasejt egy élesztő-sejt.

20. A 19. igénypont szerinti gazdasejt, ahol az élesztő-sejt az alábbi nemzetségekbe tartozó fajok valamelyik törzséhez tartozik: *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspóra* és *Schizosaccharomyces*.

21. A 19. igénypont szerinti gazdasejt, ahol az élesztő-sejt egy metilotróf élesztő-törzshöz tartozik.

22. A 21. igénypont szerinti gazdasejt, ahol a metilotróf élesztő-törzs az alábbi nemzetségek valamelyikébe tartozik: *Pichia*, *Hansenula*, *Torulopsis*, *Candida* és *Karwinskia*.

23. Eljárás egy mutáns savas foszfatáz/fitáz rekombináns úton történő előállítására, amely eljárás magába foglalja a következőket: egy gazdasejt transzformálása legalább egy, a 9. igénypont szerinti, heterológ DNS-molekulával, olyan körülmények mellett, amelyek alkalmasak a mutáns savas foszfatáz/fitáz expresszálására; majd a mutáns savas foszfatáz/fitáz izolálása.

24. A 23. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve,

hogy a gazdasejt egy élesztő-sejt.

25. A 24. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az élesztő-sejt az alábbi nemzetségekbe tartozó fajok valamelyik törzséhez tartozik: *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspóra* és *Schizosaccharomyces*.

26. A 24. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az élesztő-sejt egy metilotróf élesztő-törzshöz tartozik.

27. A 26. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a metilotróf élesztő-törzs az alábbi nemzetségek valamelyikébe tartozik: *Pichia*, *Hansenula*, *Torulopsis*, *Candida* és *Karwinskia*.

28. Takarmány-készítmény, amely tartalmazza az 1. igénypont szerinti, izolált, mutáns savas foszfatázt/fitázt.

29. Eljárás egy takarmány-készítmény előállítására, ahol az eljárás magába foglalja a következőt: az 1. igénypont szerinti, izolált, mutáns savas foszfatáz/fitáz hozzáadása egy takarmányhoz, olyan körülmények mellett, amelyek mellett eredményesen lehet takarmány-készítményeket előállítani.

30. Egy izolált, mutáns savas foszfatáz/fitáz, amely abban különbözik az 1-es számú szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciájú, vad típusú, *Escherichia coli*-ből származó savas foszfatáztól/fitáztól, hogy abban legalább egy aminosav ki van cserélve, amely aminosav-csere megakadályozza, hogy a 200. és a 210. pozícióban található ciszteinek között diszulfid-kötés

alakuljon ki.

31. A 30. igénypont szerinti, izolált, mutáns savas foszfatáz/fitáz, azzal jellemezve, hogy tiszta formában van jelen.

32. A 30. igénypont szerinti, izolált, mutáns savas foszfatáz/fitáz, ahol az izolált mutáns savas foszfatáz/fitáz rekombináns.

33. Eljárás a vad típusú, *Escherichia coli*-ből származó, az 1-es számú szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciájú savas foszfatáz/fitáz enzimatis tulajdonságainak a javítására, ahol az említett eljárás magába foglalja a következőt: az említett, vad típusú savas foszfatáz/fitáz aminosav-szekvenciájának a megváltoztatása, azáltal hogy legalább egy aminosav-cserét hajtunk végre, amely aminosav-csere megakadályozza, hogy a 200. és a 210. pozícióban található ciszteinek között diszulfid-kötés alakuljon ki.

34. A 33. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a javított enzimatis tulajdonság a nagyobb hőstabilitás.

35. A 33. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a javított enzimatis tulajdonság a fokozott fitáz-aktivitás, körülbelül 3,5 és 5,5 közötti pH-tartományban.

36. Egy, a 30. igénypont szerinti, mutáns savas foszfatáz/fitáz kódoló izolált DNS-molekula.

37. Egy rekombináns-DNS expressziós rendszer, amely

tartalmaz egy, a 36. igénypont szerinti DNS-molekulát.

38. A 37. igénypont szerinti expressziós rendszer, azzal jellemezve, hogy a DNS-molekula egy heterológ expressziós vektorban van.

39. A 37. igénypont szerinti expressziós rendszer, azzal jellemezve, hogy a DNS-molekulát a megfelelő orientációban, valamint a helyes leolvasási keret figyelembe vételével építjük be az expressziós rendszerbe.

40. Egy gazdasejt, azzal jellemezve, hogy tartalmaz egy, a 36. igénypont szerinti, heterológ DNS-molekulát.

41. A 40. igénypont szerinti gazdasejt, azzal jellemezve, hogy az említett, heterológ DNS-molekula egy rekombináns-DNS expressziós rendszerben van.

42. A 40. igénypont szerinti gazdasejt, ahol az említett gazdasejt egy élesztő-sejt.

43. A 42. igénypont szerinti gazdasejt, ahol az élesztő-sejt az alábbi nemzetségekbe tartozó fajok valamelyik törzséhez tartozik: *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspóra* és *Schizosaccharomyces*.

44. A 42. igénypont szerinti gazdasejt, ahol az élesztő-sejt egy metilotróf élesztő-törzshöz tartozik.

45. A 44. igénypont szerinti gazdasejt, ahol a metilotróf

élesztő-törzs az alábbi nemzetségek valamelyikébe tartozik: *Pichia*, *Hansenula*, *Torulopsis*, *Candida* és *Karwinskia*.

46. Eljárás egy mutáns savas foszfatáz/fitáz rekombináns úton történő előállítására, amely eljárás magába foglalja a következőket: egy gazdasejt transzformálása legalább egy, a 36. igénypont szerinti, heterológ DNS-molekulával, olyan körülmények mellett, amelyek alkalmasak a mutáns savas foszfatáz/fitáz expresszáására; majd a mutáns savas foszfatáz/fitáz izolálása.

47. A 46. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gazdasejt egy élesztő-sejt.

48. A 47. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az élesztő-sejt az alábbi nemzetségekbe tartozó fajok valamelyik törzséhez tartozik: *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* és *Schizosaccharomyces*.

49. A 47. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az élesztő-sejt egy metilotróf élesztő-törzshöz tartozik.

50. A 49. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a metilotróf élesztő-törzs az alábbi nemzetségek valamelyikébe tartozik: *Pichia*, *Hansenula*, *Torulopsis*, *Candida* és *Karwinskia*.

51. Takarmány-készítmény, amely tartalmazza a 30. igénypont szerinti, izolált, mutáns savas foszfatázt/fitázt.

52. Eljárás egy takarmány-készítmény előállítására, ahol az eljárás magába foglalja a következőt: a 30. igénypont szerinti, izolált, mutáns savas foszfatáz/fitáz hozzáadása egy takarmányhoz, olyan körülmények mellett, amelyek mellett eredményesen lehet takarmány-készítményeket előállítani.

A meghatalmazott

**ifj. Szentpéteri Adám**  
szabadalmi ügyvivő  
az S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda  
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.  
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099

SBG  
Adám

2002.11.20.