SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(22) Dátum podania: 02.11.95

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 9422205.6

(32) Dátum priority: 03.11.94

(33) Krajina priority: GB

(40) Dátum zverejnenia: 04.02.98

(86) Číslo PCT: PCT/GB95/02588, 02.11.95

(21) Číslo dokumentu:

545-97

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6] :

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

(71) Prihlasovateľ: British Gas Plc, Reading, Berkshire, GB;

(72) Pôvodca vynálezu: Flitsch Sabine Lahja, Edinburgh, GB;
Nickerson Darren Paul, Oxford, GB;
Wong Luet-Lok, Oxford, GB;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Mutantný monooxygenázový cytochróm P-450cam**

(57) Anotácia:
Je opísaný monooxygenázový cytochróm P-450_{cam}, v ktorom je tyrozínový zvyšok v polohe 96 a/alebo cysteínový zvyšok v polohe 334 nahradený zvyškom ľubovoľnej aminokyseliny s výnimkou fenylalanínu.

PV 545-97

Mutantný monooxygenázový cytochróm P-450$_{cam}$

Oblasť techniky

Vynález sa týka mutantov monooxygenázového cytochrómu P-450$_{cam}$ a spôsobu oxidácie určitých organických zlúčenín týmto mutantom.

Doterajší stav techniky

Monooxygenázy katalyzujú selektívnu oxidáciu nefunkcionalizovaných uhľovodíkov kyslíkom ("Cytochrome P-450: Structure, Mechanism a Biochemistry", ed. P.R. Ortiz de Montellano, Plenum Press, New York, 1986) a sú preto veľmi zaujímavé pre potenciálne použitie v organických syntézach. Avšak vývoj v tejto oblasti komplikujú problémy spojené s izoláciou dostatočného množstva enzýmov a súvisiacich proteínov elektrónového prenosu. Napriek dostupnosti aminokyselinových sekvencií viac ako 150 rôznych cytochrómových P-450 monooxygenáz, sú v súčasnosti dostupné ((T.L. Poulos, B.C. Finzel a A.J. Howard, J. Mol. Biol., 1987, 195, 687-700), (J.A. Peterason, U.Y. Lu, J. Geisselsoder, S. Graham-Lorence, C. Carmona, F. Witney a M.C. Lorence, J. Biol. Che., 1992, 267, 14193-14203) a (K.G. Ravichandran, S.S. Boddupali, C.A. Hasemann, J.A. Petrson a J. Deisenhofer, Science, 1993, 216, 731-736)) štruktúrne dáta len troch týchto monoxygenáz a niekoľko ich bolo úspešne preexprimovaných v bakteriálnych systémoch (B.P. Unger, I.C. Gunsalus a S.G Sligar, J. Biol. Chem., 1986, 216, 1158-1163; J.S. Miles, A.V. Munro, B.N. Rospendowski, W.E. Smith, J. McKnight a A.J. Thompson, Biochem. J., 1992, 288, 503-509;3 T.H. Richardson, M.J. Hsu, T. Kronbach, H.J. Barnes, G. Chan, m.R. Waterman, B. Kemper a E.F. Johnson, Arch. Biochem. Biophys., 1993, 300, 510-516; S.S. Boddupalli, T. Oster, R.W. Estabrook a J.A. Peterson, J. Biol. Chem., 1992, 267, 10 375-10 380; H. Li K. Darish a T.L. Poulos, J. Biiol. Chem., 1991, 266-11 909-11 914).

Jedinou cytochrómovou P-450 monooxygenázou, ktorá je

rozpustná a ktorú je možné exprimovať v dostatočných množstvách, je vysoko špecifická P-450$_{cam}$ s P.putidmi, ktorá katalyzuje regioselektívnu a stereoselektívnu hydroxyláciu gáfra (1) na 5-exohydroxygáfor (I.C. Gunsalus a G.C. Wagner, Methods Enzymol., 1978, 52, 166-188). Použitím zariadenia s vysokou rozlišovacou schopnosťou sa určila kryštalická štruktúra P-450$_{cam}$ (T.L. Polous, B.C. Finzel a A.J. Howard, J. Mol. Biol., 1987, 195, 687-700) a pretože sa dá predpokladať, že mechanizmus pôsobenia tohoto bakteriálneho enzýmu je veľmi podobný mechanizmu pôsobenia jeho cicavčích náprotivkov, použila sa táto ako základná štruktúra, na ktorej sú modely cicavčích enzýmov založené.

Takisto už bola popísaná (B.P. Unger, I.C. Gunsalus a S.G. Sligar, J. biol. Chem., 1986, 216, 1158-1163; J.S. Miles, A.V. Munro, B.N. Rospendowski, W.E. Smith, J. McKnight a A.J. Thompson, Biochem. J., 1992, 288, 503-509; T.H. Richiradson, M.J. Hsu, T. Kronbach, H.J. Barnes, G. Chan, M.R. Waterman, B. Kemper a E.F. Johnson, Arch. Biochem. Biophys., 1993, 300, 510-516; S.S. Boddupalli, T. Oster, R.W. Estabrook a J.A. Pterson, J. Biol. Chem., 1992, 267, 10 375-10 380; H. Li K. Darish a T.L. Poulos, J. Biol. Chem., 1991, 266-11 909-11 914) nukleotidová sekvencia a zodpovedajúca aminokyselinová sekvencia P-450$_{cam}$. Takisto je známe umiestenie aktívneho miesta enzýmu a navyše bol zistený ((D. Filipovic, Biochemical a Biophysical Research Communications, zv. 189, č. 1, 1992, 30. novembra 1992, str. 488-495) a (S.G. Sligar, D. Filipovic a P.S. Stayton, Methods in Enzymology, zv. 206, str. 31-49)) vzťah medzi štruktúrou a funkčnosťou. Takisto už boli popísané mutanty P-450$_{cam}$ v polohách (P.J. Loida a S.G. Sligar, Protein Engineering, zv. 6, č. 2, str. 207-212, 1993) 101, 185, 247 a v polohe (S.F. Tuck a kol., The Journal of Biological Chemistry, zv. 268, č. 1, 5. januára 1993, str. 269-275) 87 bol popísaný ((C. Di Primou, G. Hui Bin Hoaem, P. Douzou a S. Sligarom, J. Biol. Chem., 1990, 265, 5 361-5 363), (W.M. Atkinsom a S.G. Sligarom, The Journal of Biological Chemistry, zv. 263, č. 35, 15. decembra 1988, str. 18 842-18 849) a (W.M. Atkinsom a S.G. Sligarom, Biochemistry 1990, 29, 1 271-1 275)) mutant, v ktorom bol tyrozín 96 nahradený fenylalanínom 96.

Ale vo všetkých týchto prípadoch publikácie popisujú len účinky mutácií na mechanizmy známych oxidačných reakcií. V žiadnej z týchto správ sa neuvádza ani nenavrhuje možnosť použitia mutácie s cieľom získania biokatalyzátora pre oxidáciu iných substrátov.

Pri pokusoch nájsť nové biokatalyzátory bol iniciovaný projekt, ktorého cieľom je redesignovať aktívne miesto $P\text{-}450_{cam}$ tak, aby bolo možné tu uskutočňovať špecifické oxidácie organických molekúl, ktoré nie sú substrátmi pre štandardný proteín. Prvotným cieľom bolo zabudovať do aktívneho miesta cytochrómu $P\text{-}450_{cam}$ "aromatické vrecko", ktoré by podnietilo naviazanie substrátov obsahujúcich aromatické bočné reťazce.

Navyše sa zistilo, že povrchový zvyšok vzdialený od aktívneho miesta (cysteín-334) má vplyv na stabilitu proteínu a na manipulovateľnosť s týmto proteínom. Tento cysteín je zodpovedný za nežiadúcu dimerizáciu proteínu počas čistenia a preto bol nahradený alanínovým zvyškom, ktorý zlepšil obidve tieto vlastnosti.

Trojrozmerná štruktúra cytochrómu $P\text{-}450_{cam}$ vykazuje aktívne miesto, ktoré umožňuje tesný van der Waalsov kontakt s hydrofóbnymi skupinami gáfra, pozri obr. 1. Tri aromatické zvyšky (Y96, F87 a F98) sú zoskupené a poskytujú vrecko viažúce substrát do radu s vodíkovou väzbou medzi tyrozínom 96 a karbonyloxidom gáfra, s tým, že sa udržuje substrát v správnej orientácii a tým zaisťuje regiošpecifickosť a stereošpecifickosť reakcie. Náhrada ľubovoľného aromatického zvyšku menším, hydrofóbnym, nearomatickým bočným reťazcom by mohla poskytnúť požadované "aromatické vrecko".

Na stanovenie podobných účinkov bodových mutácií na tri aromatické zvyšky sa použil molekulový modelling. Na výpočet energie interakcie medzi aromatickou sondou a možnými mutantmi cytochrómu $P\text{-}450_{cam}$, v ktorých sú tieto zvyšky nahradené alanínom (F87A, Y96A a F98A) sa použil program GRID (P.J. Goodford, J. Med. Chem,. 1985, 28, 849-857). Výsledky sa potom určili

graficky, použitím molekulárneho modelinogového puzdrového Quanta (Quanta 4.0, Molecular Simulations Inc., 19 New England Executive Park, Burlington, MA 01803-5297).

Ukázalo sa, že mutant F98A má najsilnejšiu interakciu vnútri aktívnej bodovej dutiny, prístupnej pre aromatickú sondu, pričom Y96A je o niečo menší a F87A je podstatne menší. V prvej inštancii sa rozhodlo mutovať tyrozín 96 na alanín, pretože je bližšie k stredu väzbového vrecka, zatiaľ čo fenylalanín 98 je súčasťou jednej strany väzbového vrecka. Odstránenie tyrozínu 96 by takisto malo znížiť špecifickosť enzýmu voči gáfru vďaka strate vodíka viazaného na substrát.

Podstata vynálezu

Ako už bolo uvedené, vynález sa týka mutantov monooxygenázového cytochrómu P-540$_{cam}$, v ktorom je tyrozínový zvyšok v polohe 96 a/alebo cysteínový zvyšok v polohe 334 nahradený zvyškom ľubovoľnej aminokyseliny s výnimkou fenylalanínu.

Vynález takisto poskytuje mutant monoxygenázového cytochrómu P-450$_{cam}$, v ktorom je tyrozínový zvyšok v polohe 96 a/alebo cysteínový zvyšok v polohe 334 nahradený iným aminokyselinovým zvyškom, pričom tento mutant má schopnosť katalyzovať oxidáciu ľubovoľnej z nasledujúcich zlúčenín: polycyklické aromatické uhľovodíky, lineárne alebo rozvetvené alkány, difenylové a bifenylové zlúčeniny zahrnujúce halogénované varianty týchto zlúčenín a halogénované uhľovodíky.

Vynález sa ďalej týka spôsobu oxidácie zlúčenín zvolených zo skupiny zahrnujúcej polycyklické aromatické uhľovodíky, lineárne alebo rozvetvené alkány, difenylové a bifenylové zlúčeniny zahrnujúce halogénované varianty týchto zlúčenín a halogénované uhľovodíky, pričom tento spôsob zahrnuje uvedenie zvolenej zlúčeniny pri oxidačných podmienkach do kontaktu s monooxygenázovým cytochrómom P-450$_{cam}$, v ktorom je tyrozínový

zvyšok v polohe 96 a/alebo cysteínový zvyšok v polohe 334 nahradený iným aminokyselinovým zvyškom.

Výhodne zvolenou aminokyselinou je niektorá z nasledujúcich aminokyselín: alanín, arginín, asparagín, kyseliny asparágová, cysteín, kyselina glutámová, glutamín, glycín, histidín, izoleucín, leucín, lyzín, metionín, prolín, serín, treonín, tryptofán, tyrozín a valín s tou výnimkou, že v prípade tyrozínového zvyšku v polohe 96 sa nepoužije pre mutáciu tyrozín v prípade cysteínového zvyšku v polohe 334 nebude použitou aminokyselinou cysteín.

Aminokyselinou, ktorá nahradí tyrozín v polohe 96, je bežne jedna z malých hydrofóbnych aminokyselín, napr. alanín, glycín, valín, leucín alebo izoleucín, pričom výhodnou aminokyselinou je alanín, ako bude uvedené v príkladovej časti.

Alternatívne môže byť aminokyselinou nahrádzajúcou tyrozín v polohe 96 jedna z aminokyselín s nábojom, napr. kyselina asparágová alebo kyselina glutámová s vodíkom, ktorý sa viaže na pozitívne nabitý substrát; alebo zlúčenina s pozitívnym nábojom, napr. lyzín, arginín alebo histidín s vodíkom, ktorý sa naviaže na negatívne nabitý substrát, ktorý nie je členom rodiny gáfra.

Dá sa predpokladať, že mutácia v polohe 96 je kľúčom, ktorý umožňuje mutantným enzýmom katalyzovať oxidáciu relatívne širokého spektra organických substrátov. Ďalšie aminokyseliny susediace s aktívnym miestom enzýmu je možné takisto mutovať s cieľom zmenenia tvaru a špecifickosti aktívneho miesta. Týmito ďalšími aminokyselinami sú napr. aminokyseliny v polohách 87, 98, 185, 244, 295 a 297. Dá sa predpokladať, že aminokyselina v jednej alebo niekoľkých polohách môže byť nahradená malou hydrofóbnou aminokyselinou, čím dôjde k zväčšeniu aktívneho miesta; alebo veľkou hydrofóbnou aminokyselinou, čím sa zväčší veľkosť aktívneho miesta; alebo aminokyselinou majúcou aromatický kruh, ktorý sa môže naviazať na príslušný aromatický kruh substrátu.

V použitej literatúre (uvedenej v texte) sú popísané podmienky oxidačných reakcií. Enzymatický systém zahrnuje zvyčajne okrem mutantného enzýmu takisto putidaredoxín a putidaredoxínreduktázu spoločne s NADH, ako kofaktory. Do úvahy je možné brať rôzne triedy organických zlúčenín:

i) Organickou zlúčeninou je aromatická zlúčenina, buď uhľovodík, alebo zlúčenina použitá pri podmienkach, pri ktorých neaktivuje ani nedenaturuje enzým. Vzhľadom na to, že pri mutácii dôjde k vytvoreniu aromatického väzbového vrecka v povrchu enzýmu, je mutantný enzým schopný katalyzovať oxidáciu širokého spektra aromatických zlúčenín. Oxidácia príkladných aromatických a polyaromatických zlúčenín je demonštrovaná v príkladovej časti, kde sa ukazuje, že štandardný typ enzýmu katalyzuje len oxidáciu členov gáfrovej rodiny.

ii) Organickou zlúčeninou môže byť uhľovodík, napr. alifatický alebo alicyklický, nesúci funkčnú skupinu. Pred oxidačnou reakciou sa k funkčnej skupine pridá aromatická ochranná skupina, ktorá sa po ukončení oxidačnej reakcie odstráni. Vhodnou aromatickou skupinou je fenolová skupina. Očakáva sa, že aromatická ochranná skupina pridrží substrát na mieste, takže táto ochranná skupina má dve funkcie: 1) zvyšuje hydrofóbny charakter substrátu a tým spevňuje väzbu na hydrofóbne aromatické vrecko a 2) pridržiava substrát na mieste v aktívnom mieste enzýmu, takže pomocou správnej aromatickej ochrannej skupiny je možné dosiahnuť ako regioselektívnu, tak aj stereoselektívnu hydroxyláciu substrátu. V príkladovej časti je tento typ organickej zlúčeniny demonštrovaný na príklade cyklohexylbenzénu. Príkladmi monofunkčných uhľovodíkov sú cyklohexylové, cyklopentylové a alkylové deriváty (schéma 1). Oxidačné produkty týchto zlúčenín sú cennými východiskovými materiálmi pre organické syntézy, predovšetkým ak sú pripravené v homochirálnej forme. Použiteľnými aromatickými

ochrannými skupinami sú napr. benzylétery alebo naftylétery a benzoylestery alebo naftoylestery a amidy (schéma 1). Zaujímavé sú predovšetkým benzoxazolové skupiny ako karboxylové ochranné skupiny a N-banzyloxazolidínové skupiny ako aldehydové ochranné skupiny. Obidve tieto skupiny je možné po skončení enzymatickej oxidácie ľahko oddeliť a boli už popísané v literatúre zaoberajúcej sa mikrobiálnymi oxidáciami aldehydov a kyselín.

iii) Organickou zlúčeninou je alifatický alebo alicyklický uhľovodík s 5 až 12 atómami uhlíka. Oxidácia cyklohexánu a lineárnych uhľovodíkov je demonštrovaná v príkladovej časti.

iv) Organickou zlúčeninou je halogénovaný alifatický alebo alicyklický uhľovodík. Oxidácia tohoto typu organickej zlúčeniny je v popisnej časti demonštrovaná na oxidácii lindánu (hexachlórcyklohexánu).

Stručný popis obrázkov

Obr. 1 znázorňuje trojrozmernú štruktúru aktívneho miesta cytochrómu P-450$_{cam}$ a priľahlých aminokyselín;

Obr. 2 znázorňuje plynový chromatograf difenylmetánu (A) a hydroxylovaného produktu pripraveného následnou inkubáciou s Y96A mutantom cytochrómu P-450$_{cam}$.

Príklady realizácie vynálezu

Na základe vyššie uvedených úvah sa pripravili mutantné proteíny, ktoré obsahovali alanín, lyzín, valín alebo fenylalanín namiesto tyrozínu v polohe 96 (Y96). Ďalej sa pripravili mutanty, v ktorých sa náhrada aktívnych miest skombinovala s povrchovou mutáciou cysteínu v polohe 334 na alanín, nakoniec sa niekoľko mutácií aktívneho miesta skombinovalo s povrchovou mutáciou v jedinom proteíne, čím sa vytvoril násobný mutantný enzým. Gény

vybavené kódom cytochróm P-450$_{cam}$ a ich prirodzení partneri elektrónového prenosu, puridaredoxín a putidaredoxínreduktáza, sa znásobili z celobunkovej DNA P.Putimdi pomocou polymérnej reťazovej reakcie (PCR). Použitými kombináciami expresívneho vektora a E. coli hostiteľa boli pRH 1091 (J.E. Baldwin, J.M. Blackburn, R.J. Head a J.D. Sutherland, Bioorg, Med. Che., Letts., 1992, 2, 663-668) v kmeni JM109 pre cytochróm P-450$_{cam}$, pUC 118 v kmeni JM109 pre puridaredoxín a pGLW11v kmeni DH5°C pre putidaredoxínreduktázu. Špecifická mutagenéza oligonukleotidov a cieleného miesta sa uskutočňovala použitím M13mp19 subklonu Zoller-Smithovou (M.J. Zoller a M. Smith, Nucleic Acids Res., 1982, 10, 6 487) metódou a mutantná selekcia sa uskutočňovala Kunkelovou metódou (T.A. Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci., 1985, 82, 488-492).

Ukázalo sa, že mutant Y96A katalyzuje hydroxyláciu gáfra (1), aj keď v porovnaní so štandardným typom enzýmu je táto reakcia menej selektívna, podobne ako v literatúre popísanom prípade mutanta Y96F (C. Di Primom, G. Hui Bin Hoaom, P. Douzom a S. Sligarom, J. Biol. Chem., 1990, 265, 5 361-5 363). K tomuto zníženiu selektivity môže prispievať strata vodíkovej väzby medzi Y96 a gáfrom. Vlastnosti štandardného typu proteínu a mutantného proteínu Y96A boli ďalej zisťované použitím mnohých testov zisťujúcich väzbovosť a aktivitu.

Väzbovosť potencionálnych substrátov sa zisťovala pomocou spektroskopických metód. Enzým štandardných typov sa v neprítomnosti substrátu nachádzal v 6-koordinovanej, nízkospinovej forme so slabou väzbou k vode, obsadzujúc šieste koordinačné miesto, tento enzým vykazuje charakteristické Sorétové maximum pri 391 nm. Väzbovosť substrátových analógov, adamantanónu (3), adamantánu (3) a norbornanu (4) takisto úplne konvertuje hem na vysokospinovú formu. Avšak difenylmetán (5) absorpčné spektrum neposúva.

Aj keď mutant Y96A poskytuje rovnaké výsledky pre zlúčeniny (3) a (4), nebol úplne konvertovaný do vysokospinovej formy ani v

prípade, že sa (1) a (2) pridali v prebytku. Avšak najzaujímavejšie je, že na rozdiel od štandardného typu, vykazuje mutant Y96A čiastočnú konverziu na hem na vysokorýchlostnú formu s difenylmetánom, čo naznačuje väzbovosť tejto zlúčeniny na mutantný proteín.

Ako sa dalo očakávať, disociačné konštanty (K_{app}) gáfra a adamantanónu sa v mutante Y96A zvýšili. Na druhej strane sa K_{app} hodnoty hydrofóbnych substrátov adamantánu a norbornanu znížili, čo naznačuje že sa enzýmové vrecko stalo selektívnejšie pre hydrofóbne substráty. Najväčšie zmeny vo väzbovosti sa dosiahli pri difenylmetáne (5), ktorý sa n štandardný typ proteínu viazal len slabo, ale k mutantu Y96A vykazoval v podstate vyššiu afinitu.

Roztok obsahujúci 10 µM putidaredoxínu, 2 µM putidaredoxínreduktázy, 1 µM cytochrómovej $P\text{-}450_{cam}$ monooxygenázy (štandardný typ alebo mutant) a 1 mM difenylmetánu v 100 mM KCl, 20 mM KH_2PO_4, pH 7,4 sa predinkuboval pri teplote 25 °C 5 minút v trepačke. Enzymatická reakcia sa iniciovala najprv pridaním NADH do dosiahnutia celkovej koncentrácie 2 mM. Ďalšie 4 alikvótne podiely NADH (zvýšenie koncentrácie NADH vždy o 1 mM) sa pridávali v 5 minútových intervaloch a reakčná zmes sa ďalších 30 minút preplachovala pridaním 0,5 ml chloroformu. Chloroformová vrstva sa analyzovala plynovou chromatografiou.

Organické extrakty surovej inkubačnej zmesi sa analyzovali plynovou chromatografiou. Táto chromatografia určila len jeden hlavný nový pik (pozri obr. 2), ktorý mal rovnakú retenčnú dobu ako autentická vzorka para-hydroxydifenylmetánu (6). Ďalšie aromatické hydroxylačné produkty, orto- a metaizoméry, mali rôzne retenčné doby. Identita produktu majúceho štruktúru (6) sa takisto potvrdila pomocou hmotnostnej spektroskopie, ktorá poskytla správny hmotnostný pik pri 184. Pomocou vyššie uvedených experimentálnych techník sa určilo značné množstvo organických zlúčenín, ktoré môžu predstavovať substráty, ako pre enzým štandardného typu cytochrómu $P\text{-}450_{cam}$, tak aj pre jeho mutantnú

verziu Y96A. Ďalšie práce zahrnovali mutanty označené Y96V; Y96L; Y96F; C334A; kombinovaný mutant F87A, Y96G, F193A a skombinované aktívne miesto a povrchové mutanty Y96A, C334A; A96B, C334A; Y96L, C334A; Y96F, C334A; F97A, Y96G, F193A, C334A.

Výsledky pre mutant Y96A sú uvedené v tabuľke 2, v ktorej sú zoskupené štruktúrne súvisiace molekuly. Tie substráty, v ktorých bola oxidácia demonštrovaná NADH premenou, sú označené znamienkom +.

Spin vysoký/nízky: počet ukazuje percentá cytochrómu $P540_{cam}$ (OD_{417} 0,2-0,4) prevedené z nízkospinového rovnovážneho stavu do vysokospinového rovnovážneho stavu v prítomnosti 200 µM testovanej zlúčeniny a vo fosfátovom pufri (400 mM fosfátu, 68 mM draslíka, pH 7,4). Spinový rovnovážny stav sa stanovil pomocou UV/vis spektrofotometra: nízky spin pri OD_{417}a vysoký spin pri OD_{392} (nd znamená neuskutočňované).

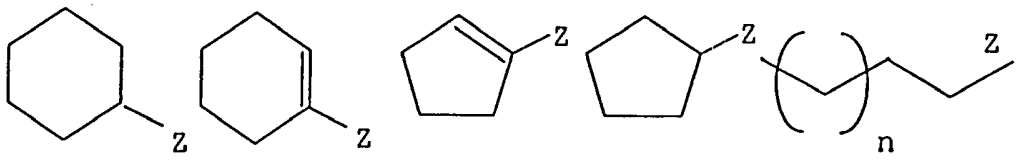
Vs DDT: ukazuje percentnú náhradu DTT (200 mM) viazanej na cytochróm $P-450_{cam}$ v porovnaní s testovanými zlúčeninami (200 mM) vo fosfátovom pufri. Výsledkom DTT väzby na cytochróm $P-450_{cam}$ sú absorbačné piky pri OD_{374} a OD_{461}, takže toto percentné nahradenie sa mohlo merať pomocou UV/vsi spektrofotometra.

Tabuľky 2a až 2h uvádzajú údaje pre príklady všetkých troch zlúčenín definovaných v bodoch i) až iv).

Reakčné produkty niektorých substrátových zlúčenín sa čistili pomocou vysokovýkonnej kvapalinovej chromatografie a identifikovali podľa hmotnostnej spektroskopie, nukleárnej magnetickej rezonancie a/alebo koelúcie. Tabuľka 3 uvádza spotrebu NADH pri oxidácii malých lineárnych rozvetvených a cyklických uhľovodíkov mutantom Y96A, C334A. Tabuľky 4a až 4h uvádzajú distribúciu produktu pri skombinovaní mutantu a substrátu.

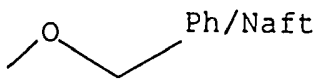
Schéma 1

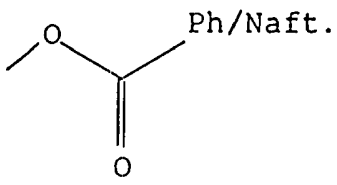
Uhľovodíky



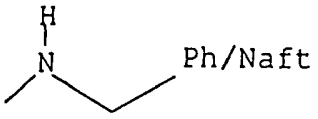
-Z Ochranná skupina

- OH

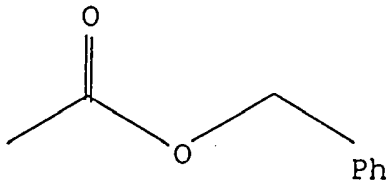


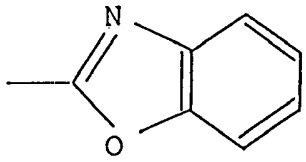


- NH_2

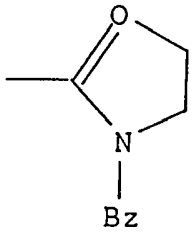


- COOH

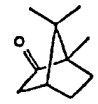
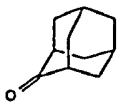
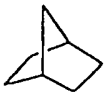
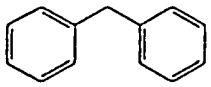




- CHO



Tabuľka 1

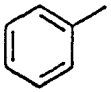
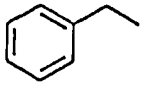
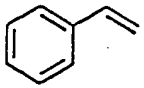
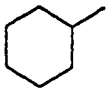
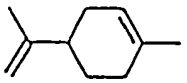
		K_{app} (μM) [a]	
		WT	Y96A
	1	6,3	12
	2	12	28
	3	8,4	1,4
	4	330	92
	5	>1 500[b]	73

[a] Hodnoty sú priemerom dvoch nezávislých meraní uskutočňovaných Sligarovou metódou (S.G. Sligar, *Biochemistry*, 1976, 15, 5 399 až 5 406). Hodnota K_{app} je silne závislá do koncentrácie K^+ v pufri. Pri $[K^+]>150$ mM má K_{app} pre gáfor hodnotu 0,6 μM ako pre štandardný typ, tak aj pre mutant Y96A. Výsledky v tejto tabuľke sa získali pri $[K^+]=70$ mM vo fosfátovom pufri, pH 7,4 aby sa zabránilo vysoľovaniu substrátov pri vyšších iónových koncentráciách.

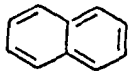
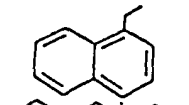
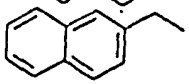
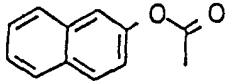
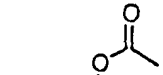
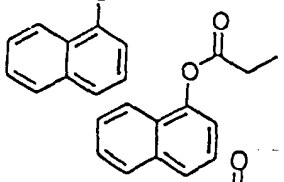
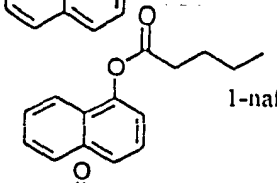
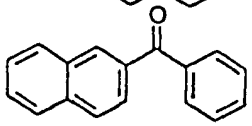
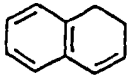
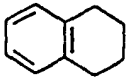
[b] Nasýtenie sa nedosiahlo.

Tabuľka 2 (a)

Interakcia P-450$_{cam}$ a substrátu
Podskupina: 1-kruh

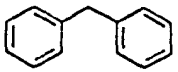
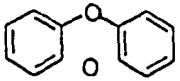
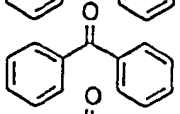
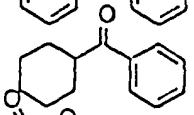
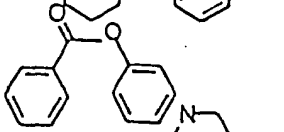
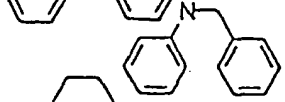
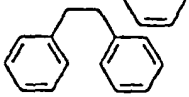
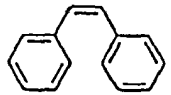
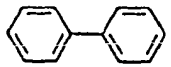
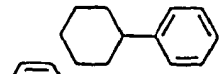
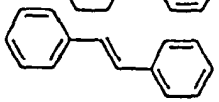
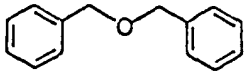
	Štandardný typ Δ Spin vysoký/ nízky	Vs DDT	Mutant Y96A Δ Spin vysoký/ nízky	Vs DDT	Štandardný typ Premena NADH ?	GC ?	Mutant Y96A Premena NADH ?	GC ?
 Benzén	-	-	-	-				
 Toluén	-	-	30	30				
 Etylbenzén	-	-	40	40				
 Styrén	-	-	30	30				
 Cyklohexén	-	5	40	40				
 1,3-cyklohexadién	nd	nd	nd	nd				
 1,4-cyklohexadién	-	5	15	20				
 Cyklohexán	-	-	60	60			+	
 Hexán	-	-	70	60			+	
 Metylcyklohexán	50	50	100	70				
 (S)-(+)-uhlík	10	60	10	80				

Tabuľka 2 (b)

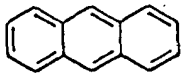
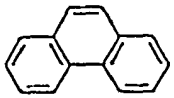
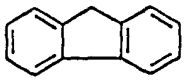
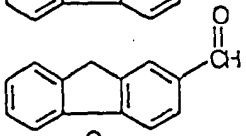
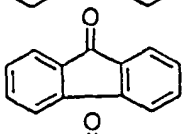
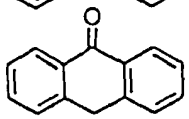
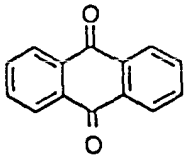
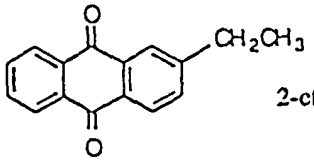
Interakcia P-450$_{cam}$ a substrátu Podskupina: 2-kruh, Naftalén	Štandardný typ Δ Spin vysoký/ nízky	Vs DDT	Mutant Y96A Δ Spin vysoký/ nízky	Vs DDT	Štandardný typ Premena NADH ?	GC ?	Mutant Y96A Premena NADH ?	GC ?
 Naftalén	-	-	15	20				
 1-etylnaftalén	-	-	5	20				
 2-etylnaftalén	-	-	10	20				
 2-naftylacetát	-	5	-	5				
 1-naftylacetát	-	5	-	5				
 1-naftylpropionát	-	20	0	20				
 1-naftylbutyrát	-	5	-	5				
 Naftylfenylketonp	-	5	-	5				
 1,2-dihydronaftalén	5	20	30	90				
 1,2,3,4-tetrahydro-naftalén								

Tabuľka 2 (c)

Interakcia P-450$_{cam}$ a substrátu
Podskupina: 2-kruh, DPM

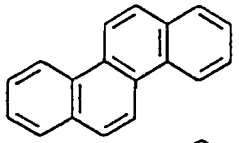
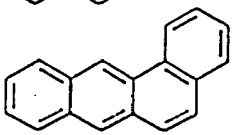
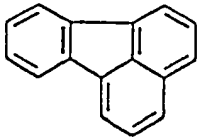
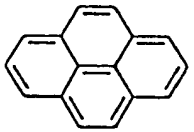
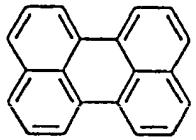
	Štandardný typ Δ Spin vysoký/ nízky	Vs DDT	Mutant Y96A Δ Spin vysoký/ nízky	Vs DDT	Štandardný typ Premena NADH ?	GC ?	Mutant Y96A Premena NADH ?	GC ?
 Difenylmetán	-	5	45	nd			+	+
 Difenyléter	10	5	20	50				
 Benzofenón	-	20	-	20				
 Cyklohexylfenylketón	-	30	60	nd				
 Fenylbenzoát	-	5	-	-				
 N-fenylbenzylamín	-	5	45	nd				
 Bibenzyl	-	-	55	55				
 cis-Stilben	-	20	40	50				
 Bifenyl	-	20	-	90				
 Cyklohexylbenzén	20	20	80	nd				
 trans-Stilben	-	-	-	-				
 Benzyléter	-	5	55	nd				

Tabuľka 2 (d)

Interakcia P-450$_{cam}$ a substrátu Podskupina: 3-kruh	Štandardný typ Δ Spin vysoký/ nízky	Vs DDT	Mutant Y96A Δ Spin vysoký/ nízky	Vs DDT	Štandardný typ Premena NADH ?	GC ?	Mutant Y96A Premena NADH ?	GC ?
 Antracén								
 Fenantrén	-	-	20	20			+	
 Fluorén	-	-	-	50				
 2-fluorénkarboxaldehyd	-	-	-	50				
 9-fluorenón	-	20	-	5				
 Antrón	-	5	-	5				
 Antrachinón								
 2-etylantrachinón								

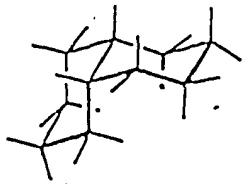
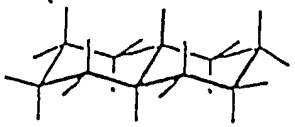
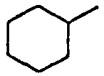
Tabuľka 2 (c)

Interakcia P-450$_{cam}$ a substrátu
Podskupina: 4,5-kruh

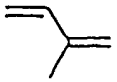
	Štandardný typ Δ Spin vysoký/ nízky	Vs DDT	Mutant Y96A Δ Spin vysoký/ nízky	Vs DDT	Štandardný typ Premena NADH ?	GC ?	Mutant Y96A Premena NADH ?	GC ?
 Chryzén	-	-	-	-				
 1,2-benzantracén	-	-	-	-				
 Fluórantén	-	5	20	10				
 Pyrén*	-	-	-	-				
 Perylén*	-	-	-	-				

Tabuľka 2 (f)

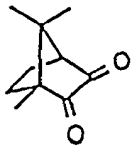
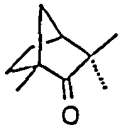
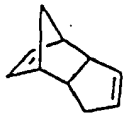
Interakcia P-450$_{cam}$ a substrátu
Podskupina: cyklické alkány

	Štandardný typ Δ Spin vysoký/ nízky	Vs DDT	Mutant Y96A Δ Spin vysoký/ nízky	Vs DDT	Štandardný typ Premena NADH ?	GC ?	Mutant Y96A Premena NADH ?	GC ?
 cis-Dekahydronaftalén	nd	nd	nd	nd				
 trans-Dekahydronaftalén	20	10	90	70				
 Cyklohexán	-	-	60	60			+	
 Metylcyklohexán	50	50	100	70				

Tabuľka 2 (g)

Interakcia P-450$_{cam}$ a substrátu Podskupina: n-alkány		Štandardný typ Δ Spin vysoký/ nizky	Vs DDT	Mutant Y96A Δ Spin vysoký/ nizky	Vs DDT	Štandardný typ Premena NADH ?	GC ?	Mutant Y96A Premena NADH ?	GC ?
	n-pentán	-	5	55	40			+	
	n-hexán	-	-	60	40			+	
	n-heptán	5	5	60	40			+	
	n-oktán	-	5	80	45			+	
	n-nonán	-	-	70	45			+	
	n-dekán	nd	nd	nd	nd				
	n-undekán	nd	nd	20	20				
	n-dodekán	nd	nd	5	5				
$CH_3(CH_2)_{14}CH_3$	n-hexadekán	-	-	-	-				
$CH_3(CH_2)_{15}CH_3$	n-heptadekán	-	-	-	-				
$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$	SDS	-	20	-	60				
$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7CO_2H$	Kyselina olejová*	-	10 ?	-	20 ?				
$[(CH_3)_2CH(CH_2)_3CH(CH_3)(CH_2)_3$- $CH(CH_3)_3CH_2CH_2]_2$	Skvalan	-	-	-	20				
	Izoprén	-	-	10	10				

Tabuľka 2 (h)

Interakcia P-450$_{cam}$ a substrátu Podskupina: podobná gáfru		Štandardný typ Δ Spin vysoký/ nízky	Vs DDT	Mutant Y96A Δ Spin vysoký/ nízky	Vs DDT	Štandardný typ Premena NADH ?	GC ?	Mutant Y96A Premena NADH ?	GC ?
	(1R)-(-)-gáfrochinón	80	80	80	80				
	(1R)-(-)-fenchon	40	70	50	80				
	Dicyklopentadién	50	80	90	90				

Tabuľka 3

Premena malých alkénov pomocou mutantov P-450$_{cam}$

Všetky nižšie uvedené mutanty takisto obsahujú mutáciu C334A. Miera premeny sa merala ako spotreba NADH (nmol NADH/nmol P-450$_{cam}$/s).

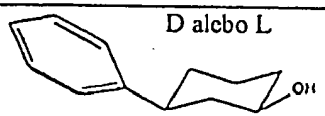
Alkánový substrát: Dĺžka hlavného reťazca	Názov	Štandardný typ	Y96A
C4	*n*-bután	-	-
C4	2-metylbután	pozadie	4, 6
C4	2, 3-dimetylbután	pozadie	16, 8
C4	2, 2-dimetylbután	pozadie	14, 0
C5	*n*-pentán	pozadie	5, 8
C5	2-metylpentán	3, 8	11, 7
C5	3-metylpentán	1, 3	14, 2
C5	2, 4-dimetylpentán	0, 2	12, 6
C5	2, 2-dimetylpentán	5, 2	12, 8
C5	2, 2, 4-trimetylpentán	0, 9	5, 3
C5	3-etylpentán	pozadie	16, 2
C6	*n*-hexán	pozadie	6, 0
C6	2-metylhexán	pozadie	10, 6
C7	*n*-heptán	pozadie	4, 4
C7	2-metylheptán	pozadie	2, 1
C7	4-metylheptán	1, 4	10, 2
C8	*n*-oktán	pozadie	5, 8
C7	Cykloheptán	4, 4	42, 5

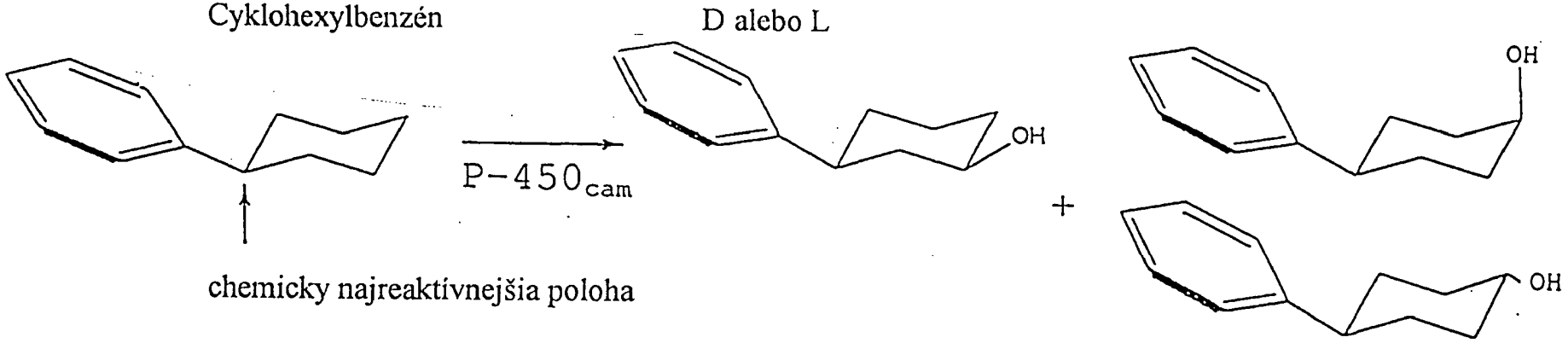
Štruktúry a distribúcie produktov nasledujúcej oxidácie substrátu s P-450$_{cam}$ mutantmi s aktívnymi miestami.

"Pozadie" - typickým pozadím NADH oxidácie je 0, 07 ,,ol NADH (nmol P-450$_{cam}$)$^{-1}$ s^{-1}.

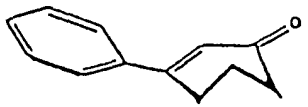
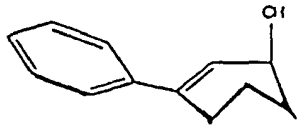
Tabuľka 4 (a)

Štruktúra a distribúcia produktov oxidácie nasledujúcich substrátov p-450$_{cam}$ mutantmi s aktívnymi miestami. Všetky nižšie uvedené mutanty takisto obsahujú C334A mutáciu.

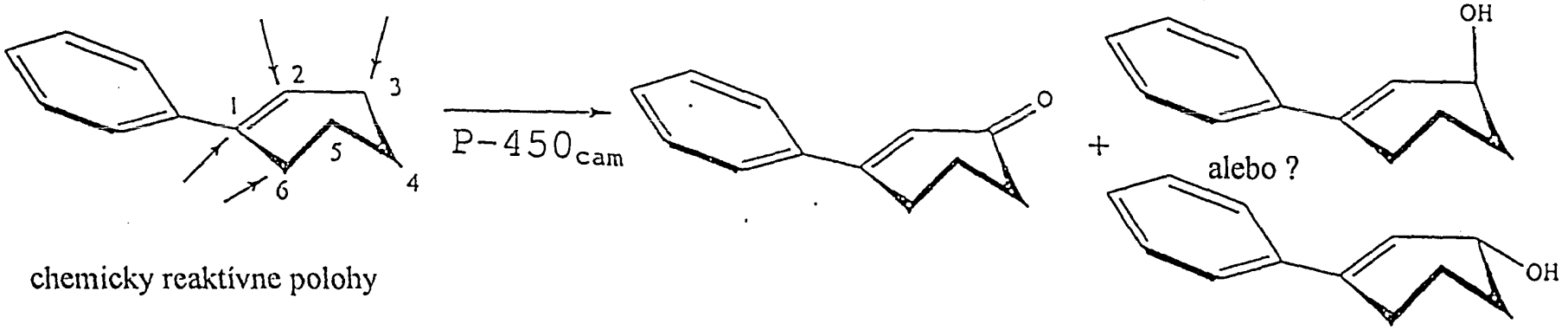
Cyklohexylbenzénové produkty		(%) produkty pre mutanty WT	Y96A	Y96F	Y96L	Y96V
 D alebo L	3-ol	43	20	54	38	28
L alebo D	3-ol	20	20	27	23	39
	Trans-4-ol	25	15	6	23	10
	Cis-4-ol	12	45	13	16	23
Celkovo produktov (plocha/10^5)		0,8	7,4	1,1	10,4	12,5



Tabuľka 4(b)

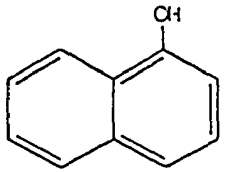
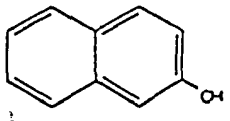
Fenylcyklohexénové produkty		(%) produkty pre mutanty WT	Y96A
	3-ón (A)	24	25
	3-ol (B)	76	75
Celkovo produktov (plocha/10^6)		42	36

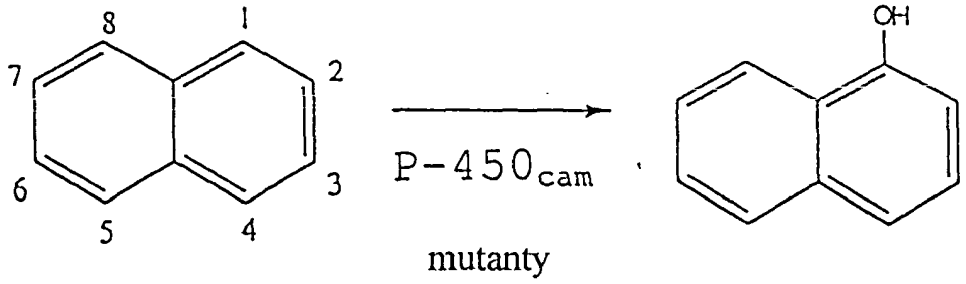
chemicky reaktívne polohy



chemicky reaktívne polohy

Tabuľka 4 (c)

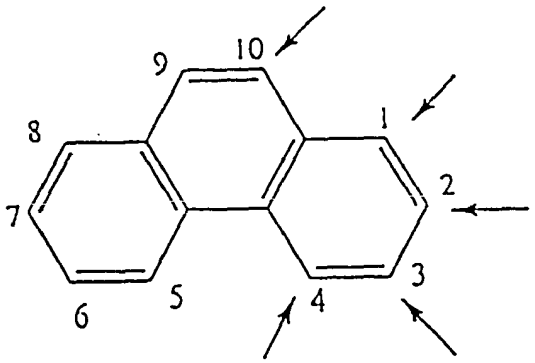
Naftalénové produkty		(%) produkty pre mutanty WT	Y96A	Y96F	Y96L	Y96V	F87A-F96G-F193A
	1-ol	100	100	100	100	100	100
	2-ol	0	0	0	0	0	0
Celkovo produktov (plocha/10^5)		(0,016)	1,1	2,4	0,7	1,4	0,1



Tabuľka 4 (d)

Fenantrénové produkty	(%) produkty pre mutanty					
	WT	Y96A	Y96F	Y96L	Y96V	F87A-F96G-F193A
A	28	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
Celkovo produktov (plocha/10^6)	0,075	7,0	4,5	2,8	1,6	0,065

Fenantrén



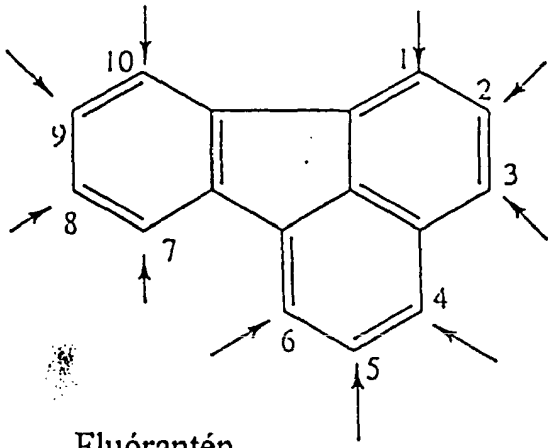
$P-450_{cam}$

mutanty

4-hydroxylované produkty

Tabuľka 4 (c)

Fluóranténové produkty	(%) produkty pre mutanty					
	WT	Y96A	Y96F	Y96L	Y96V	F87A-F96G-F193A
A	0	84	-	-	-	0
B	0	16	-	-	-	100
Celkovo produktov (plocha/10^6)	0	2,7	-	-	-	0,2



Fluórantén

$P-450_{cam}$

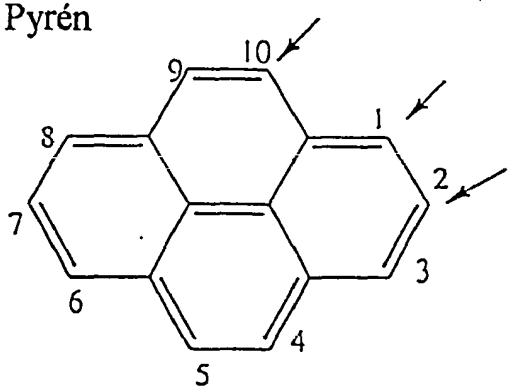
mutanty

2-hydroxylované produkty

Tabuľka 4 (f)

Pyrénové produkty	WT	(%) produkty pre mutanty 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
Celkovo produktov (plocha/10^6)	0	1,2	0,5	1,5	1,6	0,02

Pyrén



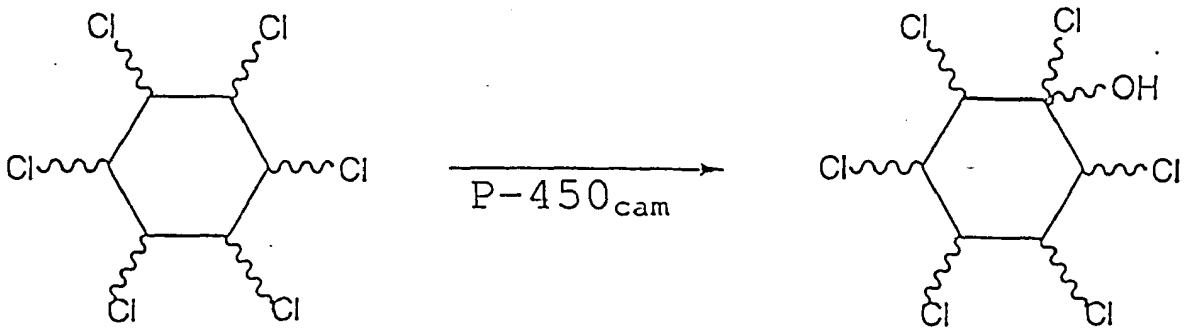
P-450$_{cam}$

mutanty

4-hydroxylované produkty

Tabuľka 4 (g)

Lindanové produkty (hexachlórcyklohexán)	(%) produkty pre mutanty WT	Y96A
A	100	100
Stupeň premeny nmol NADH (nmol P-450)$^{-1}$s^{-1}	7,5	43,5



Hexachlórcyklohexán

Tabuľka 4 (h)

Hexánové produkty	(%) produkty pre mutanty	
	Y96F	Y96A
2-hexanón	10	15
3-hexanón	16	28
2-hexanol	24	26
3-hexanol	50	32
Relatívna účinnosť (WT=1)	18,2	25,

2-metylhexánové produkty	(%) produkty pre mutanty	
	Y96F	Y96A
2-metyl-2-hexanol	72	74
5-metyl-2-hexanón	16	14
2-metyl-3-hexanol	7	4
5-metyl-2-hexanol	5	8
Relatívna účinnosť (WT=1)	2,3	2,6

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Mutant monooxygenázového cytochrómu P-450$_{cam}$, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa tyrozínový zvyšok v polohe 96 a/alebo cysteínový zvyšok v polohe 334 nahradí zvyškom ľubovoľnej aminokyseliny s výnimkou fenylalanínu.

2. Mutant monooxygenázového cytochrómu P-450$_{cam}$, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa tyrozínový zvyšok v polohe 96 a/alebo cysteínový zvyšok v polohe 334 nahradí iným aminokyselinovým zvyškom, pričom tento mutant má schopnosť katalyzovať oxidáciu ľubovoľnej z nasledujúcich zlúčenín: polycyklické aromatické uhľovodíky, lineárne alebo rozvetvené alkány, difenylové a bifenylové zlúčeniny zahrnujúce halogénované varianty týchto zlúčenín a halogénované uhľovodíky.

3. Mutant podľa nároku 1 alebo 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa aminokyselina zvolí z týchto aminokyselín: alanín, arginín, asparagín, kyselina asparágová, cysteín, kyselina glutámová, glutamín, glycín, histidín, izoleucín, leucín, lyzín, metionín, prolín, serín, treonín, tryptofán, tyrozín a valín s tou výnimkou, že v prípade tyrozínového zvyšku v polohe 96 sa nepoužije pre mutáciu tyrozín v prípade cysteínového zvyšku v polohe 334 nebude použitou aminokyselinou cysteín.

4. Mutant podľa niektorého z nárokov 1 až 3, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa aminokyselinový zvyšok v jednej alebo niekoľkých polohách, zahrnujúcich polohy 87, 98, 185, 244, 247, 295 a 297, nahradí iným aminokyselinovým zvyškom.

5. Spôsob oxidácie zlúčeniny zvolenej zo skupiny zahrnujúcej polycyklické aromatické uhľovodíky, lineárne alebo rozvetvené alkány, difenylové a bifenylové zlúčeniny zahrnujúce halogénované varianty týchto zlúčenín a halogénované uhľovodíky, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje uvedenie zvolenej zlúčeniny

pri oxidačných podmienkach do kontaktu s monooxygenázovým cytochrómom P-450$_{cam}$, v ktorom je tyrozínový zvyšok v polohe 96 a/alebo cysteínový zvyšok v polohe 334 nahradený iným aminokyselinovým zvyškom.

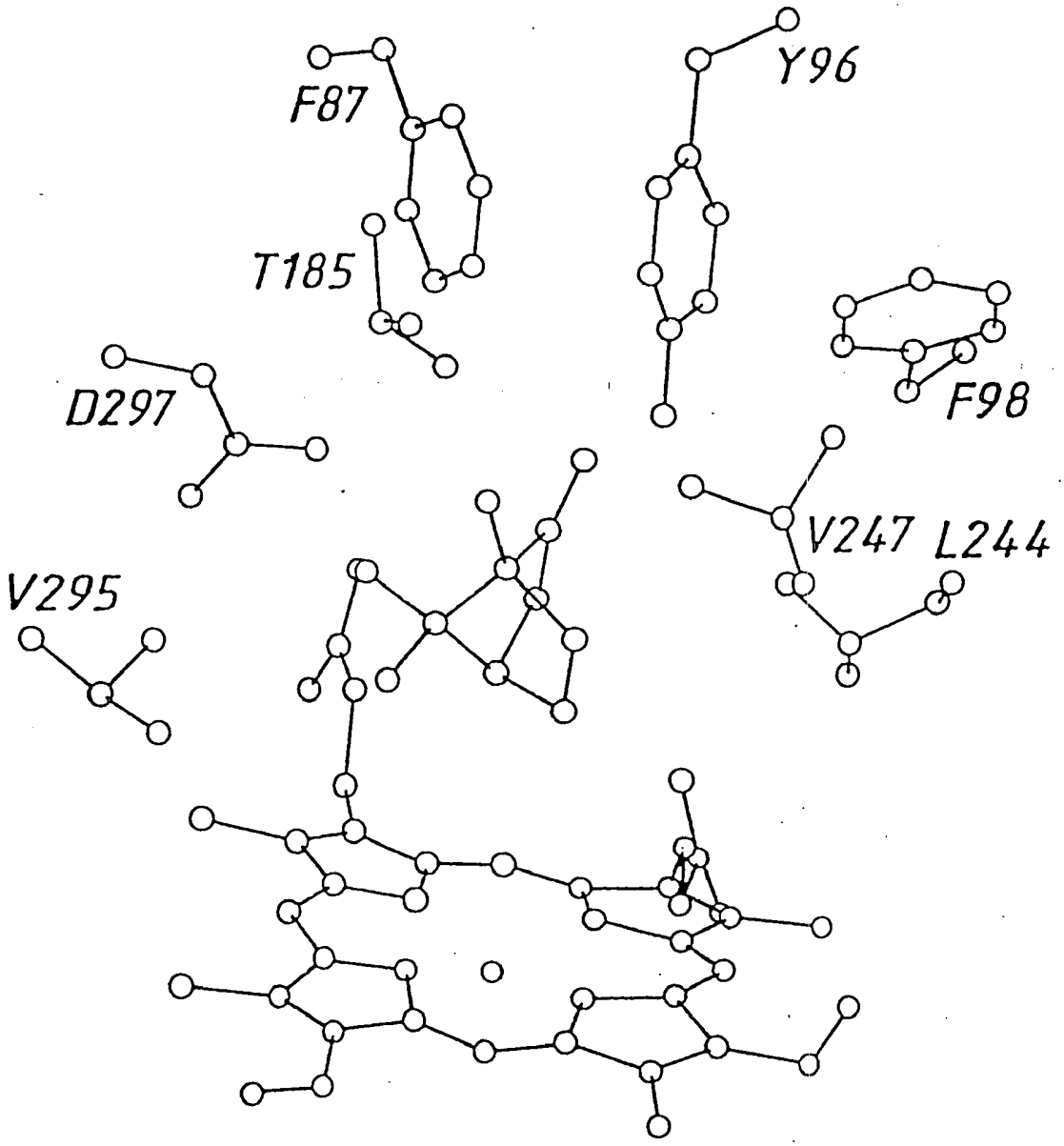
6. Spôsob podľa nároku 5, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa aminokyselina zvolí z nasledujúcich aminokyselín: alanín, arginín, asparagín, kyselina asparágová, cysteín, kyselina glutámová, glutamín, glycín, histidín, izoleucín, leucín, lyzín, metionín, prolín, serín, treonín, tryptofán, tyrozín a valín s tou výnimkou, že v prípade tyrozínového zvyšku v polohe 96 sa nepoužije pre mutáciu tyrozín v prípade cysteínového zvyšku v polohe 334 nebude použitou aminokyselinou cysteín.

7. Spôsob podľa nároku 5 alebo 6, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa aminokyselinový zvyšok v jednej alebo niekoľkých polohách zahrnujúcich polohy 87, 98, 185, 244, 247, 295 a 297 nahradí iným aminokyselinovým zvyškom.

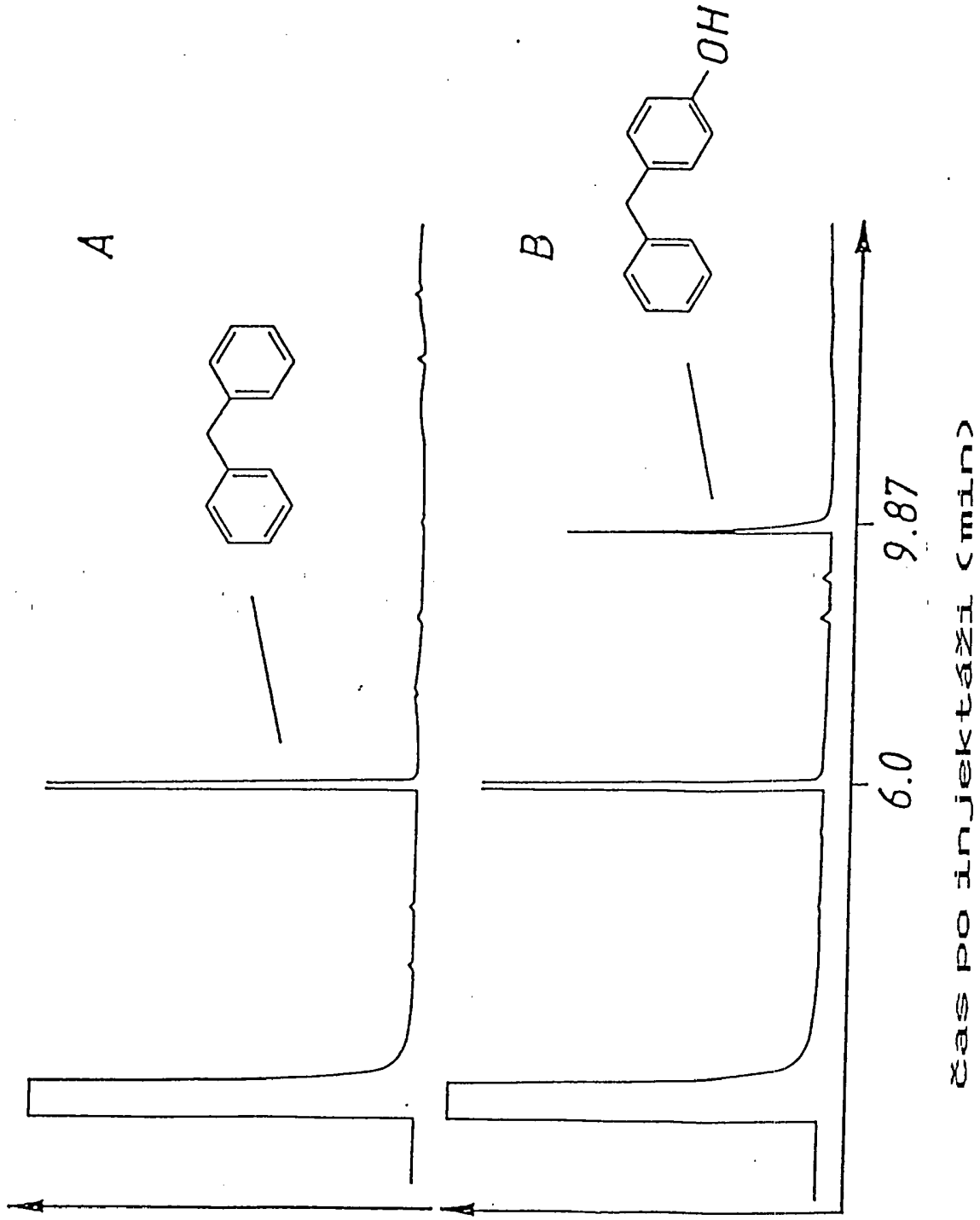
8. Mutant monoxygenázového cytochrómu P-450$_{cam}$, v podstate ako je to popísané, s odkazmi na sprievodné obrázky a/alebo príklady.

9. Spôsob oxidácie zlúčeniny zvolenej zo skupiny zahrnujúcej polycyklické aromatické uhľovodíky, lineárne alebo rozvetvené alkány, difenylové a bifenylové zlúčeniny zahrnujúce halogénované varianty týchto zlúčenín a halogénované uhľovodíky, v podstate ako je tu popísané, s odkazmi na sprievodné obrázky a/alebo príklady.

Obr. 1



PV 795-97



Obr. 2