

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

308 223

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)
C07K 14/375 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-43**
(22) Přihlášeno: **28.01.2016**
(40) Zveřejněno: **09.08.2017**
(Věstník č. 32/2017)
(47) Uděleno: **29.01.2020**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **11.03.2020**
(Věstník č. 11/2020)

(56) Relevantní dokumenty:

GenBank BAD51402 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/bad51402> photo-regulated tyrosinase [Polyporus arcularius], 18.9.2004; Kanda Satoshi et al.: Photoregulated tyrosinase gene in Polyporus arcularius 2007 Mycoscience 48, 34–41; Yasuko Kawamura-Konishi et al.: C-terminal processing of tyrosinase is responsible for activation of Pholiota microspora proenzym 2011 Applied Microbiology and Biotechnology 90, 227–234; Du Guang-Yu et al.: Soluble expression and purification of recombinant human bone morphogenetic protein-2 gene in E. coli 2009 Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research 13, 1267-1270; Yanjun Tong et al.: Enhancement of soluble expression of codon-optimized Thermomicrobium roseum sarcosine oxidase in Escherichia coli via chaperone co-expression 2016, dostupné online 11/2015 Journal of Biotechnology 218, 75 – 84. JP 2004016147; WO 2015/179621; CN 102505023; US 6 159 708.

(73) Majitel patentu:

Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i., Praha 4, CZ

(72) Původce:

Mgr. Eva Marková, Liberec, CZ
Dr. Sc. nat. Michael Kotík, Ph.D., Praha 6, CZ
Ing. Ludmila Martínková, CSc., Praha 4, CZ

(74) Zástupce:

PatentCentrum Sedlák & Partners s.r.o., Okružní
2824, 370 01 České Budějovice, České Budějovice
3

(54) Název vynálezu:

Způsob přípravy rekombinantní tyrosinasy

(57) Anotace:

Způsob přípravy rekombinantní tyrosinasy, při kterém se transformují kompetentní buňky expresního kmene bakterie *Escherichia coli* BL21 (DE3). Star, se provádí kotransformací plasmidem pET28ParcP a zároveň plasmidem pGro7. Plasmid pET28ParcP se připraví ligací genu kódujícího protein dbj|BAD51402| pro latentní formu tyrosinasy izolovaného z bazidiomycety *Polyporus arcularius* do plasmidy pET 28a (+), a plasmid pGro7 obsahuje gen kódující chaperon groES-groEL. Kontransformace se po kultivaci bakterie projeví expresí genu kódujícího fúzní protein protyrosinasy s N-terminální His₆-tag sekvencí v heterologním systému a protyrosinasa se následně izoluje, purifikuje a aktivuje v tyrosinasy *in vitro*.

Způsob přípravy rekombinantní tyrosinasy

Oblast techniky

5

Vynález se týká oblasti genového inženýrství, konkrétně způsobu přípravy rekombinantní tyrosinasy využitelné v různých oblastech biotechnologií.

Dosavadní stav techniky

Tyrosinasy, enzymy patřící do klasifikační skupiny EC 1.14.18.1, jsou nehemové oxidasy přítomné v širokém spektru různých organismů. V aktivním centru obsahují dva atomy mědi a katalyzují monooxygenaci fenolů a oxidaci katecholů. Meziprodukty těchto reakcí jsou intermediáty syntézy melaninu a podobných pigmentů důležitých pro obranu a rezistenci buněk. Možná biotechnologická využití tyrosinasy zahrnují např. přípravu L-3,4-dihydroxy-L-fenylalaninu (L-DOPA) z tyrosinu, zlepšování konzistence potravin, imobilizaci enzymů, bioremediaci neboli degradaci fenolických polutantů a použití tyrosinasy jako eukaryotních modelů pro studium jejich inhibice.

20

Nejběžnějším zdrojem tyrosinasy pro potenciální biotechnologická využití je v současné době izolace enzymu z žampionu dvouvýtrusého (*Agaricus bisporus*). Tato tyrosinasa se připravuje extrakcí z plodnic této houby, jak popisují ve své práci např. Zynek a sp. (J. Mol. Catal. B Enzym 2010, 66, 172). Nevýhodou je proměnlivé složení takto připraveného preparátu, který může obsahovat několik izoenzymů i další enzymové aktivity a kontaminující nízkomolekulární látky. Jiné houby jsou k izolaci tyrosinasy použity zřídka, a to zejména plodnice houby *Pholiota microspora* a mycelia hub *Neurospora crassa* a *Pycnoporus sanguineus* (pro přehled viz: Martinková a sp., Chemosphere 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.022>).

30

Geny kódující tyrosinasy se vyskytují také u mnoha dalších vláknitých hub, jak lze soudit z analýzy sekvencí uložených v databázích genů, avšak jen málo z příslušných proteinů bylo připraveno expresí genů v rekombinantních organismech a následně charakterizováno. Jedná se o tři enzymy z bazidiomycet: *A. bisporus*, *P. microspora* a *P. sanguineus* - a dva enzymy z askomycet: *Aspergillus oryzae* a *Trichoderma reesei*. Některé z těchto enzymů byly exprimovány v eukaryotních hostitelích (*Aspergillus niger*, *Pichia pastoris*, *T. reesei*). Tyrosinasa se tvoří v těchto hostitelích v aktivované formě, tedy ve formě, kdy je C-terminální doména proteolyticky odštěpena, což může být nevýhodou, protože aktivovaná tyrosinasa může působit v buňce hostitele toxicky v důsledku modifikace tyrosinových zbytků proteinů hostitele. Alternativním způsobem přípravy tyrosinasy je její produkce v neaktivní formě jako protytyrosinasa obsahující C-terminální doménu, která zřejmě chrání aktivní centrum, a následná aktivace protytyrosinasy na tyrosinasu *in vitro*. Tento způsob byl použit pro přípravu dvou tyrosinasy (z *P. microspora* a *A. oryzae*), které byly získány expresí příslušných genů v *Escherichia coli* a poté aktivovány *in vitro* částečným proteolytickým štěpením. Ani v jednom případě nebyl nicméně stanoven výtěžek enzymu (pro přehled: Martinková a sp., viz výše). Gen kódující protein dbj|BAD51402| byl sekvenován a následně byla studována jeho transkripce v nativním organismu - *Polyporus arcularius* (Kanda a sp., 2007), ale proteinový produkt transkripce genu nebyl zatím připraven v heterologním hostiteli a následně charakterizován (Kanda a sp., J Appl Microbiol 2007, 98, 332).

50

Množství sledovaného enzymu v roztoku lze určit kvantitativně prostřednictvím jeho katalytické aktivity. Aktivita enzymu se měří při jeho optimální hodnotě pH a při saturační koncentraci substrátu. Standardní jednotka enzymové aktivity je takové množství enzymu, které katalyzuje přeměnu 1 μmol substrátu za minutu při 25 °C a pH optimu. Označuje se U (z anglického unit). Koncentrace enzymu se pak vyjadřuje v jednotkách vztažených na jednotku objemu – UmL⁻¹.

Mírou čistoty enzymového preparátu je tzv. specifická aktivita enzymu vyjádřená v jednotkách aktivity vztažených na množství bílkovin v roztoku – Umg^{-1} .

- 5 Úkolem vynálezu je vytvoření způsobu přípravy rekombinantní tyrosinasy, který by odstraňoval výše uvedené nedostatky a který by poskytoval velké množství rekombinantní tyrosinasy transformované v heterologním hostiteli o velké enzymové specifické aktivitě.

10 Podstata vynálezu

- Výše uvedené nedostatky odstraňuje způsob přípravy rekombinantní tyrosinasy podle tohoto vynálezu. Při způsobu přípravy rekombinantní tyrosinasy se transformují kompetentní buňky expresního kmene bakterie *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star.

- 15 Podstata vynálezu spočívá v tom, že se způsob přípravy rekombinantní tyrosinasy provádí kotransformací plasmidem pET28ParcP a zároveň plasmidem pGro7. Plasmid pET28ParcP se připraví ligací genu kódujícího protein dbj|BAD51402| pro latentní formu tyrosinasy izolovaného z bazidiomycety *Polyporus arcularius* do plasmidu pET 28a (+) a plasmid pGro7 obsahuje gen kódující chaperon groES-groEL. Chaperon groES-groEL má vliv na skládání proteinů do
20 správného prostorového uspořádání. Kotransformace se po kultivaci bakterie projeví vysokou hladinou exprese genu kódujícího fúzní protein protyrosinasy s N-terminální His₆-tag sekvencí v heterologním systému. Protyrosinasa se následně izoluje, purifikuje a aktivuje v tyrosinase *in vitro*.

- 25 Ve výhodném provedení se kultivace transformovaných buněk provádí při 37 °C, po přidání induktoru se provádí při 20 °C. Jako induktor se s výhodou využívá isopropyl- β -D-1 thiogalaktopyranosid (IPTG) a L-arabinsosa.

- 30 Ve výhodném provedení se kultivace při 37 °C provádí po dobu 3 hodin v tekutém živném LB médiu, které se připraví z 1 % hmotn. peptonu, z 0,5 % hmotn. kvasničného extraktu a z 0,5 % hmotn. NaCl, s přidaným 1 % hmotn. glukózy a 0,2mM CuSO₄ a kultivace při 20 °C se s výhodou provádí po dobu 24 hodin s přidaným 0,02mM IPTG a 11,3mM arabinosy. Tyto speciální kultivační podmínky vedou k vysoké hladině exprese fúzního proteinu, a to protyrosinasy s N-terminální His₆-tag sekvencí.

- 35 Izolace a purifikace protyrosinasy se s výhodou provádí lyzí buněk působením enzymu lysozymu v kombinaci se sonikací za vzniku extraktu, a následnou afinitní chromatografií na koloně s náplní Ni Sepharose.

- 40 Ve výhodném provedení se aktivace tyrosinasy provádí inkubací s trypsinem nebo hovčím pankreatickým α -chymotrypsinem. Trypsin nebo hovčí pankreatický α -chymotrypsin se s výhodou používá v 100mM Tris/HCl pufru s upraveným pH na 7,5 a 10mM CaCl₂ při 30 °C. Aplikace těchto látek způsobuje štěpení C-koncové domény a sekvence His₆-tag z protyrosinasy a vzniku tyrosinasy.

- 45 Purifikace tyrosinasy se s výhodou provádí gelovou filtrací na koloně Superdex 200.

- Předmětem vynálezu je i rekombinantní tyrosinasa, která vykazuje specifickou aktivitu vztaženou na objem kultury o minimální hodnotě 3 000 UL^{-1} pro substrát L-DOPA, s molekulovou hmotností 43 kDa a se specifickou aktivitou vztaženou na hmotnost proteinu o minimální hodnotě 100 Umg^{-1} pro substrát L-DOPA.

- 55 Výhody způsobu přípravy rekombinantní tyrosinasy podle tohoto vynálezu spočívají zejména ve vysokém výtěžku rekombinantní tyrosinasy transformované v heterologním hostiteli o velké enzymové specifické aktivitě.

Příklady uskutečnění vynálezu

5 Rozumí se, že dále popsané a zobrazené konkrétní případy uskutečnění vynálezu jsou představovány pro ilustraci, nikoliv jako omezení vynálezu na uvedené příklady. Odborníci znalí stavu techniky najdou nebo budou schopni zajistit za použití rutinního experimentování větší či menší počet ekvivalentů ke specifickým uskutečněním vynálezu, která jsou zde popsána. I tyto ekvivalenty budou zahrnuty v rozsahu následujících patentových nároků.

10

Příprava protyrosinasy

Synteticky připravený gen pro tyrosinasu izolovaný z bazidiomycety *Polyporus arcularius* kódující protein dbj|BAD51402| je ligován do plasmidu pET 28a (+), čímž se připraví plasmid pET28ParcP, kterým jsou transformovány kompetentní buňky expresního kmene *E. coli* BL21 (DE3) Star. Kmen *E. coli* BL21 (DE3) Star je zároveň transformován plasmidem pGro7 obsahujícím gen pro chaperon groES-groEL.

15

Ke kultivaci buněk je použito 100 ml media LB s 0,2 mM CuSO₄, 50 µg kanamycinu·ml⁻¹ a 20 µg chloramfenikolu·ml⁻¹. Inkubace probíhá v 500-mL Erlenmeyerových baňkách po dobu 3 hodin při 37 °C a třepání 220 ot./min. Indukce je provedena přidáním 11,3mM arabinosy a 0,02mM IPTG a teplota je poté snížena na 20 °C. Inkubace pokračuje dalších 24 hodin při 20 °C a třepání 220 ot./min. Buňky jsou poté odděleny centrifugací po dobu 30 min, při 4 °C a skladovány při -80 °C.

20

Purifikace protyrosinasy

Biomasa získaná výše popsaným postupem z 800 ml media je resuspendována ve 17,5 ml 20 mM fosfátového pufru s upraveným pH 7,4 pomocí 500 mM NaCl a 20mM imidazolu, následně enzymaticky lyzována pomocí 0,2 mg lysozymu·ml⁻¹, 20 µg DNAsy·ml⁻¹, 1 mM MgCl₂ a 1 mM fenylmethansulfonylfluoridu (PMSF) při 4 °C a poté mechanicky sonikací 15 x 1 min purifikována. Zbytky buněk jsou odstraněny centrifugací při 4 °C po dobu 30 min. Po lyzi a centrifugaci je supernatant nanesen na Ni Sepharose™ 6 Fast Flow kolonu (HisTrap FF crude, GE Healthcare Life Sciences) ekvilibrovanou 20 mM fosfátovým pufrům s upraveným pH 7,4 pomocí 500 mM NaCl a 20 mM imidazolu. Kolona je poté promyta tímto pufrům a navázaný protein je eluován 500mM imidazolem ve 20mM fosfátovém pufru s upraveným pH 7,4 pomocí 500 mM NaCl s gradientem po dobu 30 min s průtokem 4 ml/min, kde jsou frakce eluátu odebrány po cca 15 ml. Aktivní frakce jsou následně spojeny a zakoncentrovány.

25

30

40 Aktivace tyrosinasy

Aktivace tyrosinasy je provedena v elučním pufru s upraveným pH 7,4 pomocí 500 mM NaCl a 500 mM imidazolu obsahujícím 1 mg protyrosinasy mL⁻¹ a 0,1 mg trypsinu (Sigma) mL⁻¹. Reakce probíhá při 25 °C a třepání 800 ot./min a následně je ukončena po 15 min přidáním 2mM PMSF. Vzorek je přečištěn gelovou filtrací na koloně Superdex 200 10/300 GL, kde eluce probíhá pomocí 50mM Tris/HCl pufru s upraveným pH 7,2, pomocí 150 mM NaCl s průtokem 0,4 ml/min, kde jsou frakce eluátu odebrány po 2 ml. Aktivní frakce jsou následně spojeny a zakoncentrovány.

45

50 Aktivita takto získané tyrosinasy je stanovena spektrofotometricky pro substráty L-tyrosin, L-DOPA, *tert*-butylcatechol (TBC) a *p*-kresol a pomocí HPLC-kolona Chromolith Speedrod RP18 (Merck) s mobilní fází 20% acetonitril s 0,1 % H₃PO₄ o průtoku 2 mL·min⁻¹ pro substráty fenol a *p*-kresol. Získaný enzym vykazuje tyto relativní aktivity: TBC 100 % (303 U mg⁻¹ proteinu), L-DOPA 42 %, *p*-kresol 37 %, fenol 4 %, L-tyrosin 1 %. Hodnoty *K_m* and *k_{cat}* pro L-DOPA byly cca 1,0 mM a 237 s⁻¹. Enzym je aktivní mezi pH 4 a 9 a vykazuje maximum aktivity při pH 5,5.

55

Teplotní optimum enzymu je 50 °C a 65 % aktivity je zachováno při 70 °C. Enzym vykazuje molekulovou hmotnost podjednotky 43 kDa podle SDS-PAGE a nativní molekulovou hmotnost 79 kDa podle gelové filtrace.

5

Průmyslová využitelnost

Způsob přípravy rekombinantní tyrosinasy podle tohoto vynálezu lze využít jako biokatalyzátor pro různé oblasti biotechnologických aplikací, jako je biokatalýza, enzymové modifikace proteinů s potravinářským a medicínským využitím či jako model pro studium látek pro léčení poruch pigmentace.

15

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob přípravy rekombinantní tyrosinasy, při kterém se transformují kompetentní buňky expresního kmene bakterie *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star, **vyznačující se tím**, že se provádí kotransformací plasmidem pET28ParcP a zároveň plasmidem pGro7, kde plasmid pET28ParcP se připraví ligací genu kódujícího protein dbj|BAD51402| pro latentní formu tyrosinasy izolovaného z bazidiomycety *Polyporus arcularius* do plasmidu pET 28a (+), a plasmid pGro7 obsahuje gen kódující chaperon groES-groEL, přičemž kotransformace se po kultivaci bakterie projeví expresí genu kódujícího fúzní protein protyrosinasy s N-terminální His₆-tag sekvencí v heterologním systému a protyrosinasa se následně izoluje, purifikuje a aktivuje v tyrosinase *in vitro*.
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že kultivace transformovaných buněk se provádí při 37 °C, po přidání induktoru se provádí při 20 °C.
3. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že jako induktor se využívá isopropyl- β -D-1 thio galaktopyranosid (IPTG) a L-arabinoza.
4. Způsob podle některého z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že kultivace při 37 °C se provádí po dobu 3 hodin v LB médiu, které se připraví z 1 % hmotn. peptonu, 0,5 % hmotn. kvasničného extraktu a 0,5 % hmotn. NaCl, s přidáním 1 % hmotn. glukózy a 0,2mM CuSO₄.
5. Způsob podle některého z nároků 2 až 4, **vyznačující se tím**, že kultivace při 20 °C se provádí po dobu 24 hodin s přidáním 0,02mM IPTG a 11,3mM arabinosy.
6. Způsob podle některého z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že izolace a purifikace protyrosinasy se provádí lyzí buněk působením enzymu lysozymu v kombinaci se sonikací za vzniku extraktu, a afinitní chromatografií.
7. Způsob podle některého z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že aktivace tyrosinasy se provádí inkubací s trypsinem nebo hovězím pankreatickým α -chymotrypsinem.
8. Způsob podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že trypsin nebo hovězí pankreatický α -chymotrypsin se používá v 100mM Tris/HCl pufru s upraveným pH na 7,5 a 10mM CaCl₂ při 30 °C.

50

9. Způsob podle některého z nároků 1 až 8, **vyznačující se tím**, že purifikace tyrosinasy se provádí gelovou filtrací.
10. Rekombinantní tyrosinasa připravená způsobem podle některého z nároků 1 až 9,
5 **vyznačující se tím**, že vykazuje specifickou aktivitu vztaženou na objem kultury o minimální hodnotě 3000 UL⁻¹ pro substrát L-DOPA.
11. Rekombinantní tyrosinasa připravená způsobem podle některého z nároků 1 až 9,
10 **vyznačující se tím**, že má molekulovou hmotnost 43 kDa a vykazuje specifickou aktivitu vztaženou na hmotnost proteinu o minimální hodnotě 100 U_{mg}⁻¹ pro substrát L-DOPA.