



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00419

(22) Data de depozit: 17/07/2020

(41) Data publicării cererii:
28/01/2022 BOPI nr. 1/2022

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA "BABEȘ BOLYAI" DIN
CLUJ-NAPOCA,
STR.MIHAIL KOGĂLNICEANU NR.1,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• POPPE LASZLO, STR.LĂZĂR DEĂK,
NR.4/1, BUDAPESTA, HU;

• IRIMIE FLORIN DAN,
STR.JANOS ZSIGMOND, NR.16,
CLUJ - NAPOCA, CJ, RO;
• PAIZS CSABA, STR.LIVEZII, NR.22,
CLUJ - NAPOCA, CJ, RO;
• KATONA GABRIEL, NR.62, CRASNA, SJ,
RO;
• TOSA MONICA, STR.MARAMUREȘULUI,
NR.36, AP.20, CLUJ - NAPOCA, CJ, RO;
• VARGA ANDREA, STR.DEALUL DE JOS,
NR.11A, AP.14, FLOREȘTI, CJ, RO

(54) FENILALANIN AMONIAZ LIAZA (PAL) DIN PSEUDOZYMA
ANTARCTICA, CONȚINÂND MUTAȚIA I472V

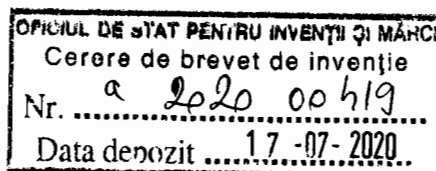
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de obținere a enzimei mutant, fenilalanin amoniac lipaza (PAL) din *Pseudozyma antarctica*, conținând mutația I472V, având capacități catalitice pentru obținerea D-amino-acizilor. Metoda, conform invenției, constă în mutagenizația situs-direcționată prin etapele de proiectare a primerilor, reacția PCR, analiza datelor de secvențiere, exprimarea și purificarea enzimei mutant PzaPAL-I472I

și determinarea stabilității termice folosind nano-DSF, rezultând enzima mutantă care prezintă activitate catalitică și selectivitate superioare față de enzima nativă PzaPAL pe substraturile nenaturale: *orto-*, *meta-* și *para-bromo-* fenilalanină.

Revendicări: 1





Fenilalanin amoniac liaza (PAL) din *Pseudozyma antarctica*, conținând mutația I472V

Invenția se referă la obținerea mutantului I472V al fenilalanin amoniac liazei (PAL) din *Pseudozyma antarctica*, eficientă pentru obținerea D-arilalaninelor substituți în pozițiile orto, meta și ipara.

Fenilalanin amoniac liazele (PAL; EC 4.1.3.24) catalizează în natură reacția de eliminare non-oxidativă a amoniacului din L-fenilalanină pentru a obține acidul *trans*-cinamic, dar și reacția inversă în prezența amoniacului în concentrații ridicate. Fenilalanin amoniac liaza se găsește pe scară largă în plante, precum și în unele bacterii, drojdii și ciuperci, cu izoenzime prezente în multe specii diferite [1,2].

Enzimele PAL prezintă o deosebită importanță sintetică, fiind utilizate ca și biocatalizatori pentru sinteza L- α -amino acizilor din acizii *trans*-cinamic corespunzători (Schema 1a) sau în procese de rezoluție cinetică cu formarea D- α -aminoacizilor din racemați (Schema 1b), precursori extrem de utili pentru industria farmaceutică [3].

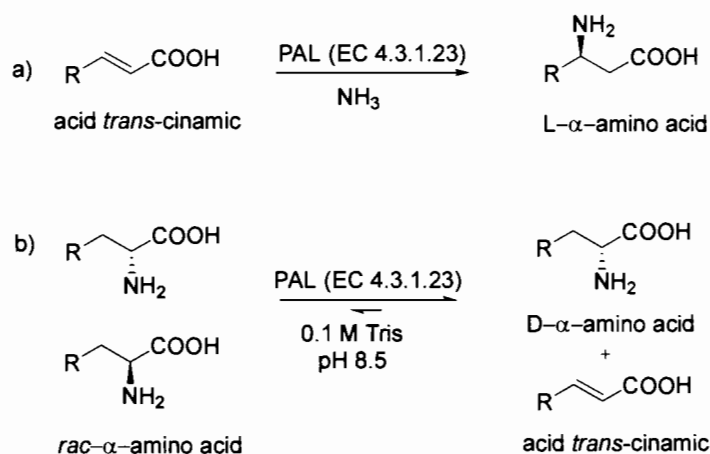


Figura 1. (a) Sinteza L- α -amino acizilor din acizii *trans*-cinamici (b) Sinteza D-aminoacizilor prin procese stereodistructive

Pe lângă potențialul biocatalitic (sinteza de aminoacizi nenaturali optic puri), enzimele PAL sunt utilizate în tratamentul fenilcetonuriei, o boală genetică gravă determinată de acumularea fenilalaninei în sânge. Utilizarea enzimelor PAL, atât în biotehnologie cât și în

medicină, este limitată de stabilitatea termică și proteolitică scăzută a acestora. Tehnicile de evoluție direcționată permit modificarea proprietăților unei enzime (activitate, stabilitate, selectivitate) în scopul obținerii unor biocatalizatori cu eficiență ridicată [3].

Problema tehnică pe care o rezolvă această invenție

Dezvoltarea enzimei mutant I472V *Pza*PAL (izoleucina din poziția 472 schimbată cu valina) cu activitate catalitică superioară față de enzima nativă pe substraturile nenaturale *ortho*-, *meta*-, și *para*-bromo-fenilalanină.

S-a realizat identificarea, izolarea din drojdia extremofilă *Pseudozyma antarctica* și caracterizarea unei noi enzime de tipul fenilalanin amoniac liază. Performanța biocatalitică a enzimei *Pza*PAL a fost comparată cu mult studiată enzimă, *Pc*PAL (fenilalanin amoniac-liaza din *Petroselinum crispum*) în rezoluțiile cinetice ale derivaților de fenilalanină racemică, prin eliminarea amoniacului, dar și în reacțiile de adiție stereocontrolată a amoniacului la derivații acidului cinamic [4].

Tabelul 1 prezintă comparativ conversia și excesul enantiomeric al proceselor catalizate de enzima mutantă I472V față de enzima nativă *Pza*PAL pentru cele trei substraturi nenaturale.

Tabel 1. Conversia și excesul enantiomeric al mutantului I472V respectiv *Pza*PAL nativ

| Enzima | <i>o</i> -Br-fenilalanina (1a) | | <i>m</i> -Br-fenilalanina (1b) | | <i>p</i> -Br-fenilalanina (1c) | |
|----------------------|--------------------------------|---------------|--------------------------------|---------------|--------------------------------|---------------|
| | Conv. [%] | <i>ee</i> [%] | Conv. [%] | <i>ee</i> [%] | Conv. [%] | <i>ee</i> [%] |
| <i>wt Pza</i> PAL | 43 | 79 | 29 | 39 | 18 | 17 |
| I472V <i>Pza</i> PAL | 49 | 97 | 51 | 97 | 44 | 85 |

Metoda de proiectare a enzimei mutant *Pza*PAL-I472V prin mutageneză situs-direcționată

Mutageneza direcționată pe situs a fost realizată urmând protocolul descris de Naismith și Liu [5].

Metoda constă în următorii pași:

1. Proiectarea primerilor

În vederea realizării mutagenezei situs-direcționată au fost utilizați primerii prezentați în tabelul 2.

Tabel 2. Primerii utilizați pentru mutageneza situs-direcționată;

| Nume primeri | Secvență primeri | T _m _{pp} (°C) | T _m _{no} (°C) | bp (perechi de baze) | GC % |
|----------------|--|---|--------------------------------------|----------------------------|---------|
| 1472V-sens | 5'GTATCGACGTCGCTCTGGCTTCTGTTACCTCTGAACTG3' | 54 | 62 | 38 | 59 |
| 1472V-antisens | 5'AGAGCGACGTCGATACCTTTAGCGTGGAAGTTCAGAG3' | 54 | 61 | 37 | 59 |

| Numele enzimei și gena | Secvența de aminoacizi a proteinei recombinante | Secvența nucleotidică |
|---|---|--|
| <i>Pseudozyma antarctica</i> mutant 1472V | <p>MAPTADVLPAAEASTRPGLLVQPS DTKLRKASSFRTEQVVIDGNLKI QGLVASARYGHPILDNSPAVRKRI DDSVNSLIAKLDREGESIYGINTGFG GSADSRANTRALQLALLQMOCQ GVLVPSTFPTGEPSSAPFALPLTD TETSLVMPAEAVRGAIVVRLSSL MRGHSGVRWEVLDKMQKLFQON NVTPVVPVRSISASGDLSPLSYVA GALAGRGIYCVVTDKKSQRVK VTADEACRMIHGIEPVL YEPKEALG LLNGTAFSASVAGLATYEAELKLA QLTQLTTAMAVEALKGTDASFAP FIHEVARPHPGQIKSARYIRALLSG SKLAEHLENEKHVLFSEDNGLRQ DRYTLRTASQWVGPGLIEDIENAK RSVDIEINSTDPNMPIDPYDADGRI HHGGNFQAMAMITNAVEKJRLALC AMGKMTFQQMTEL VNPAMNRGL PANLASTPDL S LNFHAKGID ALAS VTSEI.MFLGNPVSTHVQSAEMAN QAINSLALISGRQLQAVECLSMIQ AWSLYLLCQALDIRALQYKVAEQ LPAMVLASINSHFGEWMDEAKQA EIALLVFKSMKRLDE TSSKDLRD RLVET YQDASSVLVYFSELPSSG GADPLRNIVKWR AAGV AETEKIY RDVTVEFLDNPYASHASHLLGKT KRAYEVRKTLGVP MHGKENLYE FKGEFSQWNTGGYVSVIYASIRD GELYDMLAELEKEIY</p> | <p>5'AATACCATGGGCATGATGGCTCCGACCGCTGACGTTCTGCCGGTCTGTAAGCTAGCACCCG TCCGGGCTCGTGGTTCAGCCGCTGACACCAAACTGCGTAAAGCTAGCTCTTCCGTACCGAACA GGTTGTTATCGACGGT AAC AACCTGAAAATCCAGGGTCTGGTTGCTTCTGCTCGTTACGGTACATC CCGATCCTGGACAACCTCCGGCTGTTCGTAACGTAATCGACACTCTGTTAACTCTCTGATCGCTA AACTGGACCGTGGTGAATCTATCACGGTATCAACACCGGTTCCGGTGGTCTGCTGACTCTCGTAC CGCTAACACCCGTGCTCTGCAGCTGGCTCTGCTGCAGATGCAGCAGTGGGFGTTCGCCGGTTC GTCTACCTCCCGACCGGTGAACCGTCTTCTGCTCCGTTCCGCTCTGCCGCTGACCGACCCGAAACC TCTCTGGTATGCGGGAAGC GTGGGTTCTGGTGTCTATCGTTGTTCTGCTCTGTTCTCTGATCGCTG GTCACTCTGGTGTTCGTTGGGAAGTTCTGGACAAAATGCAAGAACTGTTCTCTGCAGAACACGTTA CCCCGGTGTTCGGTTCGTTCTATCTCTGCTTCTGGTGACCTGTCTCCGCTGTCTACGGTTGCT GGTCTCTGGCTGGTCAAGCTGGTATCTACTGCTGGGTTACCGACAAAAAATCTGGTACGCTGTT AAAGTTACCGCTGACGAAGC GTCCGCTATGACCGGATCGAACCGGTTCTGTACGAACCGAAAGA AGCTCTGGGTTCTGTAACCGTACCGCTTTCTGCTTCTGTTCTGCTGCTGGCTACCTACGAAGCT GAAAAACTGGCTAGCTGACCCAGCTGACCCAGCTATGGCTGTTGAAAGCTCTGAAAGGTACCGA CGCTTCTTCTCGCTCCGTTCTCCACGAAGTGTCTGCTCCGACCCGGGTCAGATCAAACTGCTCGT TACATCCGCTGCTGCTGCTGCTGTTCTAACTGGCTGAACACCTGGAAAAACGAAAAACGTTCTG TTCTGTAAGACAACGGTACGCTGCGTCAAGGACCGTTACACCTGCGTACCGCTTCTAGTGGGTT GGTCCGGGTCTGGAAGACATCGAAACGCTAAACGTTCTGTTGACATCGAAATCAACTCTACCACC GAC AACCCGATGATCGACCCGTACGACGTGACCGGTCGATCCACCAGGTGGTAACTTCCAGGCT ATGGCTATGACCAACCGTGTGAAAAAATCCGCTGCGCTCTGTGCGCTATGGGTAATGACCTTC CAGCAGATGACCGAAGCTGTTAACC CGGCTATGAACCGTGGTCTGCCGGTAACTGGCTTCTACC CCGGACCTGTCTGAACTTCCACGCTAAAGGTATCGACTGCTGGCTGGCTTCTGTTACCTCTGAAC TGATGTTCTGGGTAACCGGTTCTACCCACGTTCACTGCTGAAATGGCTAACCCAGGCTATCAA CTCTGCTGCTGATCTCGGTCAGACCTGCAGGCTGTTAATGCCTGTCTATGATCCAGGCT TGGTCTGTACTGCTGTGCCAGGCTCTGGACATCCGCTGCTGCAAGTACAAAGTCTGCTGACACAG TGCCGGCTATGGTCTGGCTTCTATCAACTCTCACTTCCGTAATGGATGGACGAAGCTAAACAGG CTGAAATCGCTCTGCTGGTTTCAAATCTATGTCTAAACGCTGGACGAAACCTCTCTAAAGACCT CGGTGACCGTCTGGTGAACCTACAGGACGCTTCTCTGTTCTGGTAAATCTCTGAACTG CCGCTGGTGGTGGTCTGACCCGCTGCGTAACATCGTTAAATGGGCTGCTGCTGGTGTGCTGAA ACCGAAAAATCTACCGTACGTTACC GTTGAATTTCTGGACAACCCGTACCGTCTCACGCTTCT ACCTGCTGGTAAAACCAACGTGCTTACGAATTTGTTCTGTAACACCTGGGTTCCGATGCACG GTAAAGAAACCTGTACGAATTTAAAGGTGAATTTCTCAGTGGAACACCACCGGTGGTACGTTT CTGTTATCTACGCTTCTATCCGTGACCGTGAACGTACGACATGCTGGCTGAACTGGAAAAAGAAA TCTACTAAGGATCATA</p> |

Situsuri de tăiere ale enzimelor de restricție: *NcoI*: CCATGG, *NdeI*: CATATG, *BamHI*: GGATCC

Mutațiile Cys-Ser sunt marcate cu galben în secvența de aminoacizi a proteinelor.

2. Reacția PCR

Amestecul pentru etapa de PCR conține 10 µL soluție tampon 10x HF Buffer, 2 ng de ADN-matriță (plasmidă recombinată care codifică *PzaPAL*), 1 µM soluție de pereche de primeri (Tabelul 1), 200 µM dNTP și 2 unități de polimerază *Phu*, adus la volumul total de 50 µL cu apă distilată. Reacția PCR a fost inițiată la 95 °C timp de 3 min, urmând 15 cicluri de amplificare. Fiecare ciclu de amplificare s-a realizat în următoarele etape: denaturarea la 95 °C timp de 1 min, atașarea primerilor la temperatura de T_m-5 °C timp de 1 min și elongarea la 72 °C timp de 15

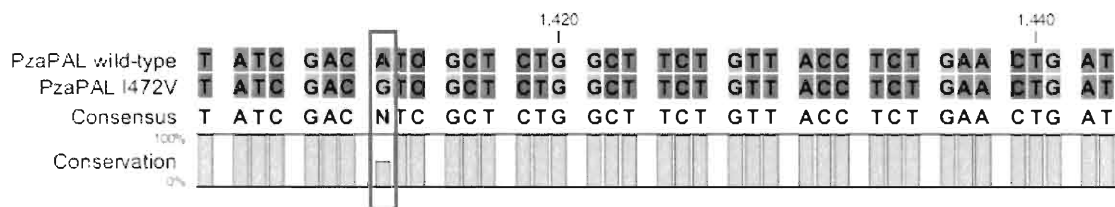
min. Ciclurile PCR s-au finalizat cu o etapă de atașare finală la $T_{m\ pp-5}$ °C timp de 1 min și etapa de elongare finală la 72 °C timp de 30 de minute. Produșii PCR au fost supuși digestiei cu 5 unități de *DpnI* la 37 °C timp de 2 ore, apoi 10 μL din fiecare reacție PCR s-au analizat prin electroforeză în gel de agaroză.

2 μL de plasmidă conținând insertul mutant de *pzapal*, obținută în urma reacției de PCR, au fost transformați prin șoc termic în celule competente *Escherichia coli*, tulpina XL-1 Blue.

Celulele transformate au fost crescute în mediu Luria-Bertani (LB) timp de 1 h la 37 °C și apoi însămânțate pe plăci de LB-agar conținând carbenicilină (34 μg/mL) și tetraciclină (80 μg/mL) și incubate la 37 °C peste noapte. Două colonii au fost crescute peste noapte în mediu LB din care s-a izolat ADN-ul plasmidic.

3. Analiza datelor de secvențiere

Plasmidele izolate au fost trimise serviciilor de secvențiere (Compania Cemias (Larissa, Grecia)) pentru confirmarea prezenței mutației dorite. Rezultatele secvențierii sunt redată în alinierea de secvență de mai jos. Folosind programul *CLC Sequence Viewer 6.4* s-a realizat compararea între secvența de nucleotide a formei native *PzaPAL* și secvența ce aparține formei mutant, *PzaPAL-I472V*.



4. Exprimarea și purificarea enzimei mutant *PzaPAL-I472V*

În vederea exprimării enzimei *PzaPAL-I472V*, o colonie de pe placă care conține celulele Rosetta(DE3)pLys transformate cu plasmida de interes a fost inoculată în 10 mL de mediu LB lichid care conține antibioticele carbenicilină (34 μg/mL) și cloramfenicol (50 μg/mL) și ulterior, incubată peste noapte la 37 °C cu agitare continuă (220 rpm). 1% din precultura obținută a fost transferat în LB steril (1 L) și agitat continuu la 37 °C până când valoare de DO_{600} ajunge la 0.6-0.7. Exprimarea proteinei a fost realizată prin inducție cu o concentrație de 0.1 mM IPTG, la 25 °C timp de 20 ore.

În urma etapei de centrifugare, după ce supernatantul a fost îndepărtat, masa celulară obținută a fost resuspendată în soluție de liză (0.5 mM EDTA, 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH-ul a fost ajustat la 8.0; Se adaugă doar înainte de purificare o tabletă de cocktail inhibitor de

protează, 1 mM PMSF, 0.1 mg/mL lizozom, 0.1 mg/mL ADN-ază, 0.01 mg/mL ARN-ază). Distrugerea peretelui celular s-a efectuat cu ajutorul ultrasunetelor, această operație a avut loc pe baie de gheață. După ce supernatantul a fost separat de resturile celulare, a urmat etapa de purificare propriu-zisă a enzimei folosind cromatografia de afinitate.

Enzima *Pza*PAL-I472V a fost marcată cu 10 resturi de histidină (10xHis) la capătul *N*-terminal. În acest fel purificarea enzimei s-a realizat cu ajutorul cromatografiei de afinitate folosind nichel-acid nitrilotriacetic cuplat cu sefaroză (Ni-NTA sefaroză). Această metodă de separare este intens utilizată datorită faptului că purificarea biomoleculilor etichetate cu histidine este eficientă și implică un număr de etape relativ mic.

După aplicarea supernatantului pe coloană cu un debit redus suportul cromatografic este spălat cu o serie de soluții tampon (LS: 30 mM KCl, 50 mM HEPES – pH-ul a fost ajustat la 8.0; HS: 300 mM KCl, 50 mM HEPES – pH-ul a fost ajustat la 8.0; soluții de imidazol de 0.02 și 0.35 M) pentru a îndepărta proteinele legate nespecific. Datorită faptului că imidazolul este în competiție cu proteina marcată cu histidină, eluarea acesteia de pe coloana de afinitate s-a efectuat prin utilizarea de soluții cu concentrații tot mai mari de imidazol.

În ultima etapă s-a realizat îndepărtarea imidazolului din fracția obținută la eluarea cu soluția de imidazol 0.35 M care conține proteina de interes, prin dializă în tampon Tris 0.1 M peste noapte la 4 °C.

Cu scopul de a determina gradul de puritate al enzimei obținută și pentru a monitoriza procesul de purificare, toate probele colectate în timpul procesului au fost analizate cu ajutorul electroforezei denaturante SDS-PAGE.

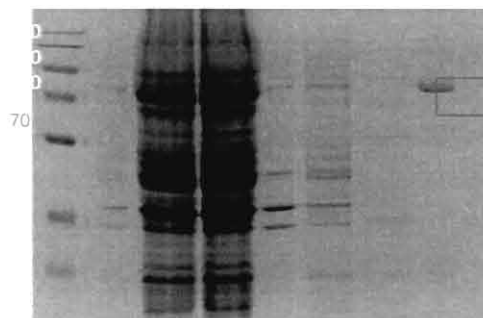


Figura 1. Gel denaturant SDS-PAGE realizat în vederea analizării etapelor de purificare a proteinei *Pza*PAL I472V.

1 - marker de masă moleculară, 2 - celulele după inducere, 3 - supernatant, 4 - rest după trecerea prin coloană, 5 - sediment, 6 - LS, 7 - fracția 0.02 M Imidazol, 8 - fracția 0.35 M Imidazol care conține proteina *PzaPAL-I472V*, cu masa de 80 kDa.

5. Determinarea stabilității termice-folosind nano-DSF

Capilarele au fost umplute cu enzima (1 mg/mL) în 50 mM soluție tampon Tris și plasate pe tava capilară a *Prometheus NT.48*. Temperaturile inițiale și finale precum și viteza de încălzire au fost definite (1 °C / min, la 20 °C la 90 °C).

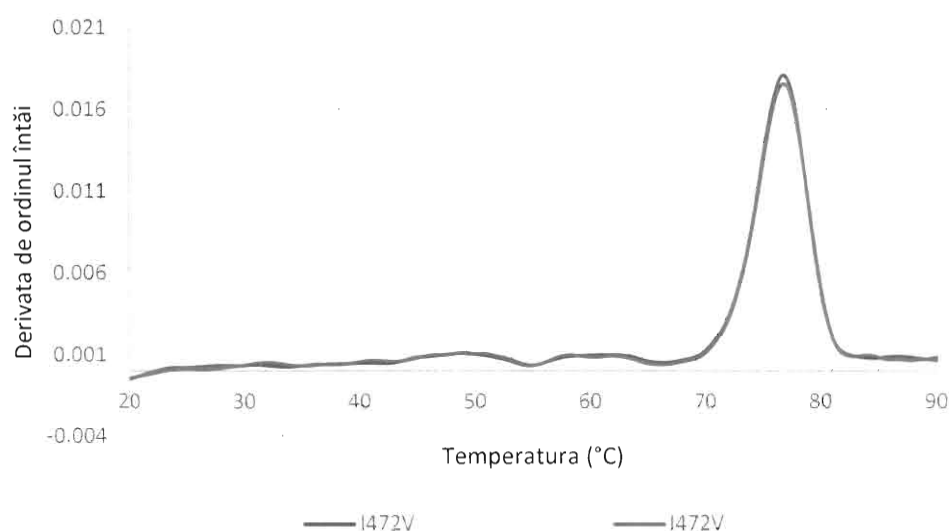


Figura 2. Stabilitatea termică a enzimei mutant *PzaPAL-I472V*, având T_m maxim la 76.7 °C.

Exemplul 1.

Investigarea reacțiilor de eliminare catalizate de enzima PzaPAL-I472V din orto-(1a), meta-(1b), și para-bromo-fenilalanină (1c) racemică.

Amestecurile de reacție care conțin 5 mM de substrat în tampon de 0.1 M Tris, pH 8.5 și 50 μg de enzimă au fost incubate sub agitare la 30 °C. Reacțiile au fost monitorizate în timp, cu ajutorul cromatografiei de lichide de înaltă performanță (HPLC). Conversiile obținute precum și excesele enantiomerice sunt prezentate în tabelul 1.

Conversiile au fost determinate prin HPLC cu ajutorul aparatului 1200 HPLC (Agilent, Santa Clara, CA, SUA), folosind coloana Gemini NX-C-18 (150 mm × 4,6 mm × 5 μm;

Phenomenex, Torrance, CA, SUA). Faza mobilă: A: NH₄OH (0,1 M, pH 9.0)/B: MeOH. Debit: 1 mL/min. Lungimea de undă folosită la detecție și timpii de retenție sunt prezentate în tabelul 3.

Tabel 3. Condiții HPLC și timpii de retenție pentru determinarea conversiei

| Substrat | Eluent ^[a] [% B] | Temp. [°C] | Lungime de undă [nm] | Timpii de retenție [min] | | Factor de corecție |
|-----------|--------------------------------|---------------|----------------------------|--------------------------------|-----|--------------------|
| | | | | 1 | 2 | |
| 1a | 28 la 50 în 8 min | 30 | 220 | 4.5 | 7.4 | 0.36 |
| 1b | 28 la 50 în 8 min | 30 | 220 | 5.5 | 8.6 | 0.30 |
| 1c | 28 la 50 în 8 min | 30 | 220 | 5.8 | 8.8 | 0.78 |

[a] Componentele eluentului: A: NH₄OH (0.1 M, pH 9.0); B: MeOH.

Separarea cromatografică a enantiomerilor s-a realizat prin HPLC cu ajutorul aparatului 1200 HPLC (Agilent, Santa Clara, CA, SUA) pe coloana chirală Crownpak CR-I (+) (150 × 3 mm, 5 μm; Illkirch, Cedex, Franța) cu un amestec de A: HClO₄ (pH 1,5) și B: acetonitril ca eluant la debitul de 0,4 mL min⁻¹. (Tabel 4)

Tabel 4. Condiții HPLC și timpii de retenție pe faza chirală pentru determinarea excesului enantiomeric

| Substrat | Eluent ^[a] [A:B%] | Temp. [°C] | Lungime de undă [nm] | Timpii de retenție [min] | |
|-----------|---------------------------------|---------------|----------------------------|-----------------------------|----------|
| | | | | (R)-1a-c | (S)-1a-c |
| 1a | 70:30 | 25 | 220 | 3.3 | 5.6 |
| 1b | 70:30 | 25 | 220 | 3.6 | 7.6 |
| 1c | 80:20 | 25 | 220 | 3.5 | 6.2 |

[a] Componentele eluentului: A: acetonitril; B: apă (cu HClO₄, pH 1.5).

Bibliografie

- [1] F. Parmeggiani, N. J. Weise, S. T. Ahmed, N. J. Turner, *Chem. Rev.*, **2018**, *11*, 73-118.
- [2] M.M. Heberling, B. Wu, S. Bartschand, B.D. Janssen, *Current Opinion in Chemical Biology* **2013**, *17*, 250–260.
- [3] N. J. Weise, S. T. Ahmed, F.Parmeggiani, J. L. Galman, M. S. Dunstan, S. J. Charnock, D. Leys, N. J. Turner, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13691
- [4] A. Varga, P. Csuka, O. Sonesouphap, G. Bánoczi, M.I. Toşa, G. Katona, Z. Molnár, L.C. Bencze, L. Poppe, C. Paizs, *Catalysis Today* **2020**
- [5] Huanting Liu, James H Naismith, *BMC Biotechnology*, **8**, 91, 2008

REVENDICARE

Enzima mutanta, fenilalanin amoniac liaza (PAL) din *Pseudozyma antarctica*, conținând mutația I472V, obținută prin mutageneză situs-direcționată, având capacități catalitice pentru obținerea D-aminoacizilor. Enzima mutantă revendicată prezintă activitate catalitică și selectivitate superioare față de enzima nativă *PzaPAL* pe substraturile nenaturale: *orto-*, *meta-*, și *para-*bromo-fenilalanină.