



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2020 00420**

(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) **TRANSAMINAZA DIN HALOLAMINA SEDIMINIS (HsTA)
PENTRU OBTINEREA AMINELOR OPTIC PURE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a ω -transaminazei izolată din *Halolamina sediminis* (HsTA) cu utilizare în sinteza aminelor optic pure. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de introducere a genei hstA în vectorul de expresie pET-19b,

exprimarea și purificarea enzimei HsTA, determinarea stabilității termice, folosind nano-DSF, analiza funcțională și substraturi cuplate pentru ω -transaminaze.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



Transaminaza din *Halolamina sediminis* (HsTA) pentru obținerea aminelor optic pure

Invenția se referă la obținerea R-1-feniletilaminei cu ajutorul ω-transaminazei izolată din *Halolamina sediminis* (HsTA).

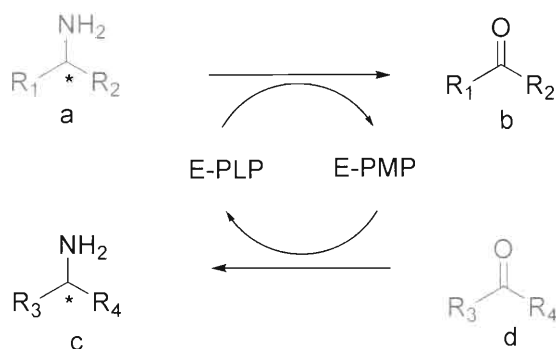
Transaminazele aparțin celui mai mare grup de enzime dependente de piridoxal-5-fosfat (PLP) și catalizează transferul unei grupări amino de la o amină donoare către atomul de carbon din gruparea carbonil al unui α-cetoacid, al unei cetone sau al unei aldehide [1]. În ultimul deceniu, interesul pentru transaminaze a crescut puternic. Multe noi transaminaze au fost descoperite și aplicate în sinteze organice pentru obținerea de amine și aminoacizi nenaturali optic puri, care sunt precursori extrem de utili în industria chimică și farmaceutică [2,3,4].

Problema tehnică pe care o rezolvă această invenție constă în identificarea, izolarea și caracterizarea unei noi transaminaze izolate din bacterii extreme halofile *Halolamina sediminis*.

Numele enzimei și gena	Secvența de aminoacizi a proteinei recombinante	Secvența nucleotidică
<i>Halolamina sediminis</i> ω-TA (Uniprot code: A0A1J0VCU3) Mutant C199S; C405S	MPPSLPALDRAHHLHPFTDFK ALGEEGRVITHAEGVYIHDA EGHRLLDGMAGLWCVNLGYGR RELVDAAAEQMLQLPYNTFF KTTTHPPAVGLAEKLCRLAPAH MNHVFFTGSGSEANDTVLRMV RRYWALRGKPKWQWIGRENG YHGSTLAGMSLGGMALMHEQG GPGVPCI THVRQPYWFGGRD QSPEAFGHA: AAAIEERILAL GEENVAAFIAEPVQAGGAIM PPASYWPAVKAVLARYDILLV VDEVICGFRLGEWFGSVLYD LAPDLMPIAKGLSSGYLPIGG VLVGDRAVDTLIEEGGEFFHG FTYSGHPVCAAVLRNLEIME EEGVVERVRDDLGPYLARRWS ELADHPLVGEARSLGLMGALE LVDPTTGGRFDRALAVGTLCR DISFA GLVMRSVGDMIISP PLVITHEQIDELVSLAREALD ETARRLSGDFAYTLYPQERYE	5' CATATG CCGCCATCCTTGCCTGCCTGGACCGCCGCATCACCTGCATCCTTTCACAGAC TTTAAAGCCCTTGGGGAAGAAGGAAGCCCGGTGATTACACATGCTGAAGGTGCTATATCCA CGATGCTGAGGCCATCGCTTGTAGACGGAATGGCTGGTGTGGTGTGAAATTTGGGTT ACGGCCGCCGTGAGCTGTTGGACGCTGCTGCTGAACAGATGCTGCAGTTACCCCTACTACAAT ACGTTTTTCAAGACTACCCATCCACCTGCCGTGGGGCTGGCGGAGAAGTTATCACGCCTGGC TCCTGCTCACATGAATCATGTTTTTTTACGGGGTCTGGGTGAGAGGCCAATGATACCGTCC TGCCATGGTCCGTGTTACTGGGCCCTGCGCGGTAAGCCGTGGAAGCAATGGGTAATCGGC CGTAAAAATGGTATCATGGAAGCACGTTGGCGGCATGTCCTGGCGGCATGGCTCTGAT GCACGAACAAGGAGGGCTGGAGTTCCAAGTATTACCCAGTTCGCAACCACTACTGGTTTG GTGAAGGTGCGGATCAGAGTCCAGAAGCATTGGCCACCGCTCCGCTGCTGCCATTGAGGAG CGTATCCTGGCACTGGGGGAAGAGAAGCTTGCAGCGTTTATCGCAGAGCCTGTTACGGGAGC TGGGGGCGCAATTATGCCTCCAGCATCCTATTGGCCCGGGTAAAGCCGTTACTGGCACCGT ATGACATTTTACTTGTGTTGATGAAGTATTGTTGGCTTTGGCCGTTTAGCCGAGTGGTTT GGCAGTGTGTTATATGACCTGGCCCTGACTTAATGCCAATCGCGAAGGGTTTAAAGTAGCGG CTATTTACCGATTGGAGGGCTCCTTGTAGGAGATCGCGTTGCTGATACCCCTTATCGAGGAAG GTGGAGAGTTCTTTCACGGCTTACATATCTGGCCATCCAGTCTGCGCTGCGGTGCGATTG CGCAACCTTGAATCATGGAGGAGGAGGGTGTGCTAGAGCGGTGACGTGACGATCTGGGGCC ATATCTTGCTCGCCGTTGGTCAAGTGGCTGATCATCCACTGGTTGGGAAGCCCGTTCCG TGGTCTTATGGTGCCTTGGAGTTGGTTGACCTACAACAGCGGAGCGCTTGGACCGCGCA TTAGCCGTTGGTACATTATGTGCGGACATTTCTTTCGAAGTGGACTTGAATGCGCAGCGT CGGAGACCATGATTATCTCCCCCATTAGTAATTACACAGCAACAAATCGATGAACCTTG TTTCCCTGGCTCGTAAGCCTTGGACGAAACGGCCCGCCCTTTCAGGGCACTTCGCATAC ACTCTGTACCCCCAGGAGGCTTACGAATAAGGATCC3'

Situsuri de tăiere ale enzimelor de restricție: *NdeI* :CATATG, *BamHI* :GGATCC
 Mutațiile Cys-Ser sunt marcate cu galben în secvența de aminoacizi a proteinelor.

Transaminazele prezintă o importanță sintetică pentru că ele pot fi folosite atât în rezoluția cinetică a aminelor chirale cât și în sinteză asimetrică [5,6].



- a. Amino donor
 b. Produs - amino donor
 c. Amino acceptor
 d. Produs - amino acceptor
 E-PLP, enzimă cu 5'-fosfat piridoxal legat covalent
 E-PMP, enzimă cu piridoxamină 5'-fosfat legată necovalent

Figura 1. Reacțiile catalizată de ω -TA

Aplicarea invenției aduce următoarele avantaje:

- metodă ieftină și ușor realizabilă
- utilizarea enzimei în condiții extreme
- obținerea aminelor în formă enantiopure

Procedeul de obținere a ω -transaminazei din *Halolamina sediminis* (HsTA) pentru obținerea aminelor optic pure are în vedere parcurgerea următorilor pași:

- Introducerea genei *hsTA* în vectorul de expresie pET-19b
- Exprimarea și purificarea enzimei HsTA
- Determinarea stabilității termice, folosind nano-DSF
- Analiza funcțională și substraturi cuplate pentru ω -transaminaze

În continuare se prezintă procedeul de obținere a ω -transaminazei din *Halolamina sediminis* (HsTA), conform invenției.

Exemplul 1.

Introducerea genei *hsTA* în vectorul de expresie pET-19b

Gena de transaminaza (*hsTA* conținând mutațiile Cys199Ser și Cys405Ser) sintetizată se introduce în vectorul de expresie pET-19b. Cisteinele din pozițiile 199 și 405 sunt plasate la suprafața proteinei, în consecință aceste cisteine se muta la serine, pentru a împiedica formarea de agregate interproteice.

La sfârșitul situsurilor de restricție al genei, au fost introduse enzime de restricție (*NdeI* și *BamHI*) în vederea introducerii în vectorul de expresie pET-19b, ce permite exprimarea proteinei recombinante cu enterokinază *N*-terminal His-tag scindabilă.

Pentru amplificarea genei *hsTA*, aflat în vectorul pMA-T acesta s-a transformat în celule competente *Escherichia coli*. 2 μ L din plamid a fost transformat prin șoc termic în celule competente *E. coli* XL-1 Blue, apoi însămânțat pe plăci de agar Luria Bertani (LB) conținând antibiotice și incubat la 37 °C 12h. După aceasta, de pe mediul LB-agar (la 37°C) s-au ales două colonii cu scopul de a izola plasmidele folosind kit-ul *GenElute HP Plasmid Miniprep*, Sigma Aldrich, respectându-se instrucțiunile din protocol.

Plasmidele izolate și vectorul circular pET-19b au fost digestate cu enzimele de restricție *NdeI* și *BamHI*, la temperatura de 37 °C timp de 1 oră. 40 μ L din fiecare probă de ADN digestat au fost analizate prin electroforeză în gel de agaroză (Figura 2), din care au fost tăiate benzile de ADN. Vectorul pET-19b și insertul în raport masic de 1:3 au fost extrași din gel, folosind kitul *Gen Elute Gel Extraction Kit* și apoi legați în prezența ligazei T4 la 22 °C timp de 1 oră, pentru a forma o singură moleculă circulară care include atât vectorul cât și gena.

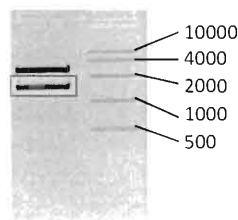


Figura 2. Electroforeză în gel de agaroză. Plasmida *hsTA* aflat în vectorul pMA-T digestat cu enzimele de restricție *NdeI* și *BamHI*, (1361 bp gena *hsTA* + 2383 bp vector pMA-T)

Genă introdusă în vectorul de expresie pET-19b a fost transferată în celule competente *Escherichia coli* XL1-Blue. Coloniile crescute au fost verificate prin procedeul *colony* PCR, care este o metodă high-throughput convenabilă pentru determinarea prezenței sau absenței ADN-ului inserat în plasmide. Reacția *colony* PCR este aproape identică cu reacția standard PCR, diferența fiind aceea că matrița de ADN este o singură colonie.

Reacțiile PCR au fost realizate utilizând un volum total de 20 μ L și au constat din 10 μ L *Dream Tag Green Master Mix*, 1 μ M pereche de primeri (**Tabel 1**), o colonie de ADN matriță și 8 μ L de ddH₂O. Ciclurile PCR au fost inițiate la 95 °C timp de 3 minute pentru denaturarea ADN-ului matriță, urmând 40 de cicluri de amplificare. Fiecare ciclu de amplificare s-a realizat la 95 °C timp de 3 minute, *T_m* - 5 °C timp de 30 de secunde și 72 °C timp de 1 minut/bp. Ciclurile PCR s-au terminat cu o etapă de extensie finală la 72 °C timp de 15 minute.

Tabel 1. Amorsele folosite pentru amplificarea genelor

Primeri	Secvența	<i>T_m</i> (°C)
---------	----------	---------------------------

T7PROMOTER/FP	5'AATACGACTCACTATAGGGGAATTG 3'	54
T7TERMINATOR/RP	5'TGCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'	55

Reacțiile PCR au fost analizate prin electroforeză în gel de agaroză (Figura 3).

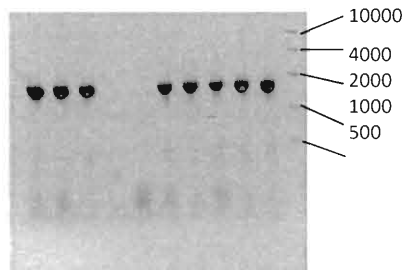


Figura 3. Electroforeză în gel de agaroză a produșilor de PCR. *HsTA* ligat în pET-19b, 10 colonii au fost alese – în afară de coloniile 4,5 inseratul este prezent în vectorul pET-19b

În **Figura 4** este prezentat gena *hsTA* inserat în vectorul pET-19b. Harta vectorială a fost generată folosind programul *Snapgene*.

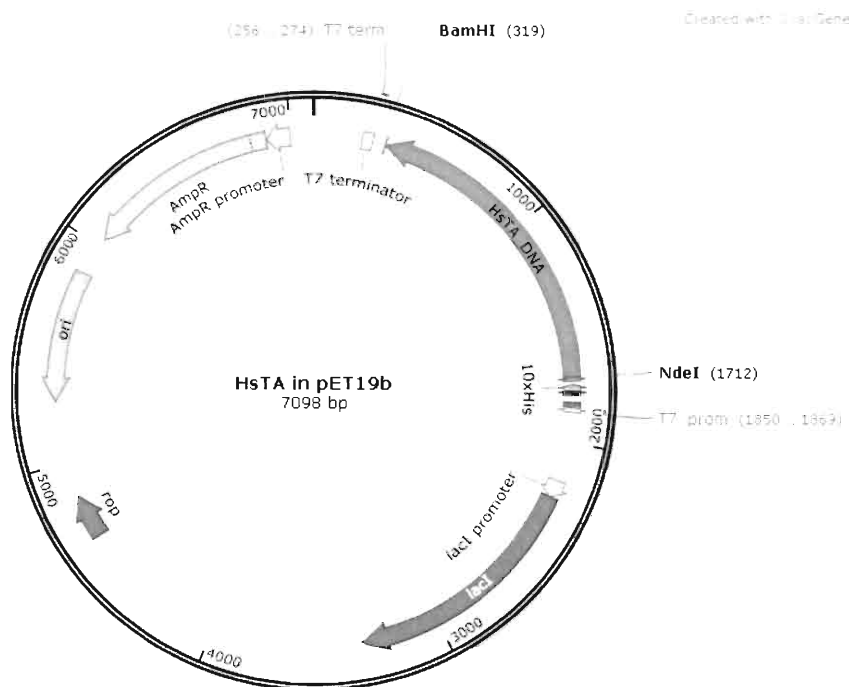


Figura 4. Harta plasmidică, *HsTA* în pET-19b

Exprimarea și purificarea enzimei *HsTA*

În vederea exprimării enzimei *HsTA*, o colonie de pe placă care conține celule Rosetta (DE3)pLys transformate cu plasmida de interes, a fost inoculată în 10 mL de mediu LB lichid continand carbenicilină (34 $\mu\text{g/mL}$) și cloramfenicol (50 $\mu\text{g/mL}$) și ulterior incubată peste noapte la temperatura de 37 °C sub agitare continuă (220 rpm). 1% din precultura obținută a s-a transferat în LB steril (0.5 L) și agitat continuu la 37 °C până când valoare DO_{600} ajunge la 0.6-0.7. Exprimarea proteinei se realizeaza prin inducție cu o concentrație de 0.1 mM IPTG, la 25 °C timp de 20 ore.

În urma etapei de centrifugare, masa celulară obținută se resuspenda în soluție de liză (50 mM HEPES, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH-ul a fost ajustat la 7.5). Se adaugă înainte de purificare o tabletă de cocktail inhibitor de protează, 1 mM PMSF, 0.1 mg/mL lizozimă, 0.1 mg/mL ADN-ază, 0.01 mg/mL ARN-ază și 0.1 mM PLP (cofactorul enzimei). Distrugerea peretelui celular se realizeaza cu ajutorul ultrasunetelor, pe baie de gheață. După separarea supernatantului de resturile celulare, urmeaza etapa de purificare propriu-zisă a enzimei folosind cromatografia de afinitate Ni-NTA.

Enzima *HsTA* a fost marcată cu 10 resturi de histidină (10xHis) la capătul *N*-terminal. În acest fel purificare enzimei s-a realizat cu ajutorul cromatografiei de afinitate folosind nichel-acid nitrilotriacetic cuplat cu sefaroză (Ni-NTA sefaroză).

După aplicarea supernatantului pe coloană, cu un debit redus, suportul cromatografic se spală cu o serie de soluții tampon (soluție de liză, 20 mM imidazol, 300 mM imidazol conținând și 0.1 mM PLP, și ulterior cu 1 M imidazol). Datorită faptului că imidazolul este în competiție cu proteina marcată cu histidină, eluarea acesteia de pe coloana de afinitate se realizeaza prin utilizarea de soluții cu concentrații tot mai mari de imidazol.

În ultima etapă se îndepărteaza imidazolul din fracția obținută la eluare cu o soluția de imidazol 300 mM care conține proteina de interes, prin dializă în tampon PBS (5.79 mM NH_4Cl , 17.77 mM NaH_2PO_4 , 32.33 mM Na_2HPO_4 , 1.73 mM KCl, 92.47 mM NaCl, pH=7.5) peste noapte la 4 °C.

Cu scopul de a determina gradul de puritate al enzimei obținute și pentru a monitoriza procesul de purificare, toate probele colectate în timpul procesului au fost analizate cu ajutorul electroforezei denaturante SDS-PAGE (Figura 5).

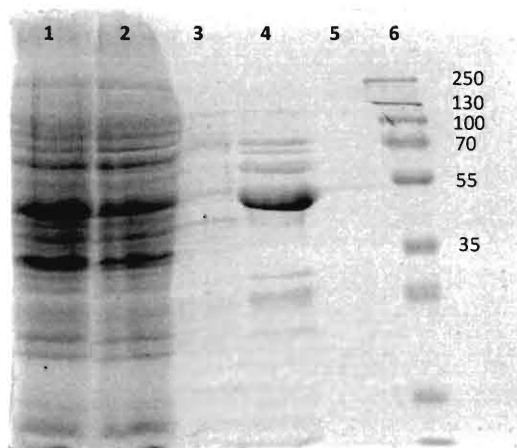


Figura 5. Gel denaturant SDS-PAGE realizat în vederea analizării etapelor de purificare a proteinei *HsTA*. **1** – supernatant, **2** - rest după trecerea prin coloană, **3** - 20 mM imidazol, **4** -

300 mM imidazol care conține proteina de interes *HsTA* cu masa de 50 kDa, **5** - 1 M imidazol
6 - marker de masă moleculară.

Determinarea stabilității termice, folosind nano-DSF

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

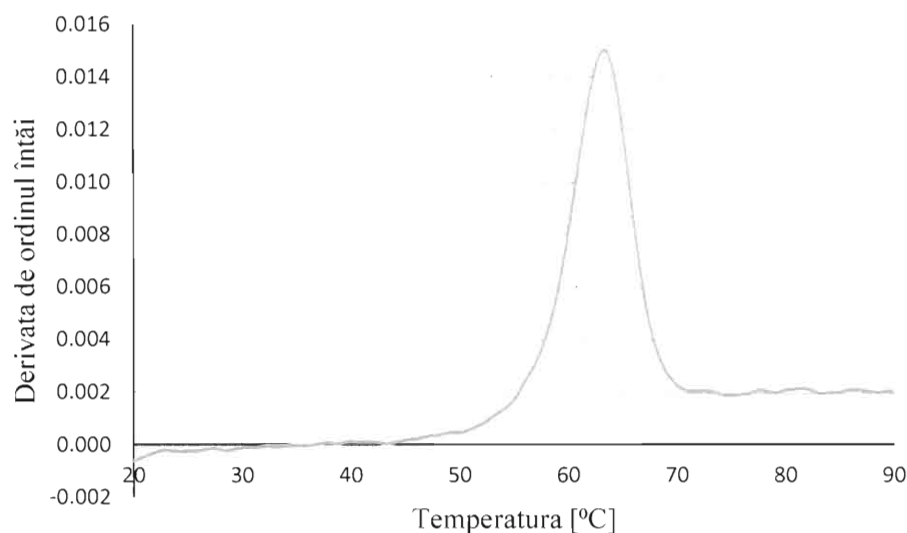


Figura 6. Stabilitatea termică a enzimei mutant *HsTA* (C199S, C405S), având T_m maxim la 63.3 °C

Analiza funcțională și substraturi cuplate pentru ω -transaminaze

În vederea realizării rezoluției cinetice a 1-feniletilaminei cu ω -*HsTA* s-a folosit un volum final de reacție de 1 mL, 20 mM piruvat, 5 mM 1-feniletilamină, 0.1 mM PLP. Se observă că, după 7 ore conversia este de 38 %, iar după 15 ore de 50 % (Figura 8, 9).

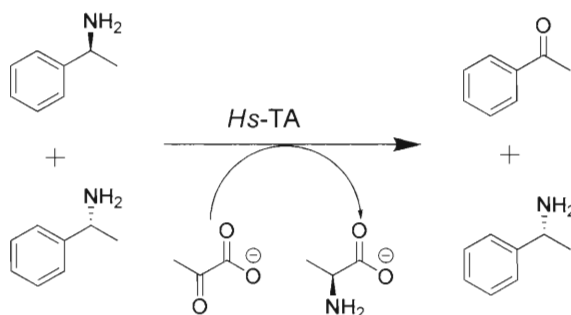


Figura 7. Transaminarea enzimatică

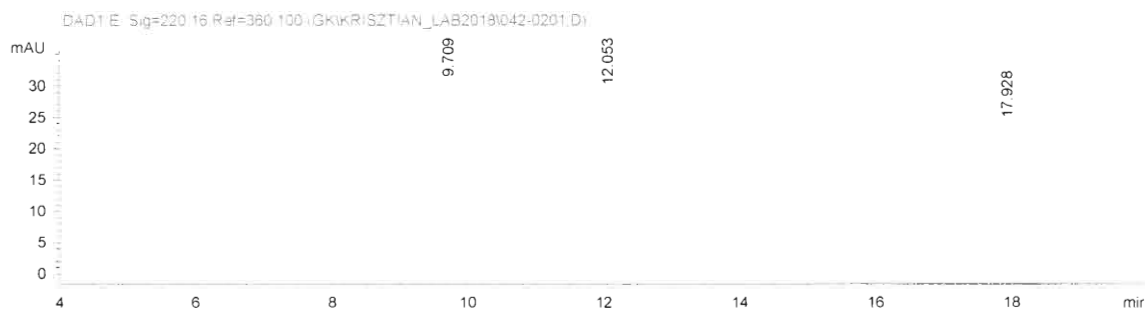


Figura 8. Gradul de conversie măsurată pe HPLC după 7 ore

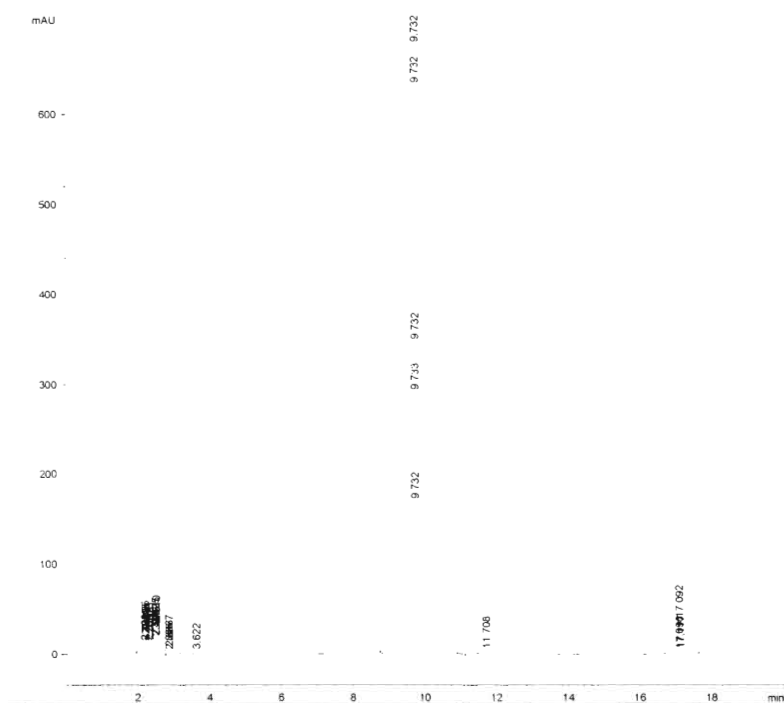


Figura 9. Gradul de conversie măsurată pe HPLC după 15 ore

Bibliografie

- [1] Percudani, R.; Peracchi, A. *EMBO Rep.* **2003**, *4*, 850.
- [2] Kohls, H.; Steffen-Munsberg, F.; Höhne, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 180.
- [3] Höhne, M.; Bornscheuer, U. T. *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42.
- [4] H. Kagamiyama, H. Hayashi, *Methods in Enzymology*, **2000**
- [5] D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber and W. Kroutil, *Trends Biotechnol.*, 2010, **28**, 324-332.
- [6] D. Ghislieri and N. J. Turner, *Top. Catal.*, 2014, **57**, 284-300.

REVENDICARE

Se revendică obținerea *R*-1-feniletilaminei cu ajutorul ω -transaminazei izolată din *Halolamina sediminis* (*HsTA*), precum și procedeul de obținere a acestuia.

Procedeul de obținere a ω -transaminazei din *Halolamina sediminis* (*HsTA*) pentru obținerea aminelor optic pure are în vedere parcurgerea următorilor pași:

- Introducerea genei *hsTA* în vectorul de expresie pET-19b
- Exprimarea și purificarea enzimei *HsTA*
- Determinarea stabilității termice, folosind nano-DSF
- Analiza funcțională și substraturi cuplate pentru ω -transaminaze