



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 233 852 A1

4(51) C 12 N 15/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 267 921 3

(22) 03.10.84

(44) 12.03.86

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Steinborn, Gerhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Hofemeister, Jürgen, Dr. sc. Dipl.-Biol., DD

(54) Verfahren zur Produktsynthese mit Mikroorganismen unter Nutzung von rekombinanten Plasmiden

- (57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erzeugung von bakteriellen Produktionsstämmen unter Anwendung gentechnischer Methoden zur in-vitro-Rekombination von DNA. Ziel der Erfindung ist die Erzeugung von rekombinanten Plasmiden mit hoher genetischer Stabilität und hoher Produktsyntheseleistung sowie ihre praktische Nutzung zur Steigerung von bakteriellen Produktionssynthesen. Das Wesen der Erfindung besteht in
- der Entwicklung einer neuartigen, als „Puzzle-Methode“ bezeichneten Variante der bekannten „shot gun“-Klonierung, die das Zufallsprinzip auf die Erzeugung eines breiten Spektrums von verschiedenartigen rekombinanten Plasmiden anwendet und zur Isolierung von hoch exprimierenden, genetisch stabilen rekombinanten Plasmiden genutzt wird.
 - der Steigerung von Produktsynthesen durch Duplikation von rekombinanten Produktgenen und dadurch bedingten Gen-Dosis-Effekt unter Anwendung von natürlicherweise stabilen Vektorplasmiden mit invertiert repetitiven Sequenzen.

Anwendungsgebiete der Erfindung sind alle Verfahren zur Steigerung der Produktbildung unter Einsatz gentechnisch erzeugter Bakterien in der industriellen Mikrobiologie.

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 233 852 A1

4(51) C 12 N 15/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WPC 12 N / 267 921 3 (22) 03.10.84 (44) 12.03.86

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD
(72) Steinborn, Gerhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Hofemeister, Jürgen, Dr. sc. Dipl.-Biol., DD

(54) Verfahren zur Produktsynthese mit Mikroorganismen unter Nutzung von rekombinanten Plasmiden

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erzeugung von bakteriellen Produktionsstämmen unter Anwendung gentechnischer Methoden zur in-vitro-Rekombination von DNA. Ziel der Erfindung ist die Erzeugung von rekombinanten Plasmiden mit hoher genetischer Stabilität und hoher Produktsyntheseleistung sowie ihre praktische Nutzung zur Steigerung von bakteriellen Produktionssynthesen. Das Wesen der Erfindung besteht in

- der Entwicklung einer neuartigen, als „Puzzle-Methode“ bezeichneten Variante der bekannten „shotgun“-Klonierung, die das Zufallsprinzip auf die Erzeugung eines breiten Spektrums von verschiedenartigen rekombinanten Plasmiden anwendet und zur Isolierung von hoch exprimierenden, genetisch stabilen rekombinanten Plasmiden genutzt wird.
- der Steigerung von Produktsynthesen durch Duplikation von rekombinanten Produktgenen und dadurch bedingten Gen-Dosis-Effekt unter Anwendung von natürlicherweise stabilen Vektorplasmiden mit invertiert repetitiven Sequenzen.

Anwendungsgebiete der Erfindung sind alle Verfahren zur Steigerung der Produktbildung unter Einsatz gentechnisch erzeugter Bakterien in der industriellen Mikrobiologie.

ISSN 0433-6461

14 Seiten

Zur PS Nr. 233.852
ist eine Zweitschrift erschienen.
(Teilweise bestätigt gem. § 18 Abs.1 d.Änd.Ges.z.Pat.Ges.)

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Produktsynthese mit Mikroorganismen unter Nutzung von Vektorplasmiden mit invertiert repetitiver Sequenz zur stabilen Genklonierung und erhöhten funktionellen Expression von Genen, die in solche Plasmide mit Methoden der Gentechnik (durch in-vitro-Rekombination) übertragen werden, **dadurch gekennzeichnet**, daß durch Klonierung oder Reklonierung in solche Vektorplasmide stabile rekombinante Plasmide erhalten werden, die das klonierte Gen als Duplikat in der invertiert repetitiven Sequenz enthalten und, bedingt durch den Gen-Dosis-Effekt, eine verstärkte Synthese des Genproduktes in Mikroorganismen verursachen, indem das zu klonierende Gen

— **bei Variante I**

nach der an sich bekannten „shot gun“-Methode mittels großschneidender Restriktasen (z. B. BamHI, BclI, BglII, EcoRI, HindIII; bei vollständiger Verdauung der Donor-DNA und Linearisierung des Vektorplasmids durch die gleiche Restriktase) innerhalb eines destinkten Donor-DNA-Fragments in nur eine von zwei homologen Spaltstellen der invertiert repetitiven Sequenz des Vektorplasmids kloniert wird (wobei auch ein rekombinanter Vektor als Gendonor genutzt werden kann) und von den so erhaltenen rekombinanten Plasmiden solche stabilen und hoch exprimierenden Plasmide selektiert werden, bei denen das klonierte Gen bereits spontan dupliziert worden ist oder solche, zunächst instabilen Plasmide selektiert werden, bei denen das klonierte Gen nur in einer Sequenz der invertiert repetitiven Sequenz inseriert ist und eine spontane Duplikation des klonierten Gens erst danach erfolgt und dadurch eine Stabilisierung und zugleich höhere Expressions des klonierten Gens erreicht wird,

— **Variante II**

nach einer neuen Variante der „shot-gun“-Methode („Puzzle“-Variante) mittels kleinschneidender Restriktasen (z. B. HhaI, HpaII, MboI, MspI, Sau3A; bei partieller Verdauung der Donor-DNA und Linearisierung des Vektorplasmids durch die gleiche oder eine isoschizomere Restriktase) innerhalb von Donor-DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe und Zusammensetzung in eine von mehreren möglichen Spaltstellen des Vektorplasmids kloniert wird (wobei auch ein rekombinanter Vektor als Gendonor genutzt werden kann), wodurch eine vielfache Kombination von unterschiedlichen Donor-DNA-Fragmenten mit verschiedenen Insertionsarten im Vektorplasmid möglich ist und dabei u. a. auch neuartige Kombinationen des klonierten Gens mit solchen DNA-Sequenzen (z. B. mit einem starken Promotor, starken Terminator oder mit einem Partition-Lokus) entstehen, die die Stabilität und Expression des rekombinanten Plasmids bzw. des klonierten Gens erhöhen, und nach Klonierung mittels kleinschneidender Restriktasen in ein Vektorplasmid mit invertiert repetitiver Sequenz ein Spektrum von rekombinanten Plasmiden erhalten wird, aus dem u. a.

- stabile rekombinante Plasmide mit inserierter Donor-DNA in einer unikaligen Region des Vektorplasmids selektiert werden, Duplikat von inserierter Donor-DNA in der invertiert repetitiven Region des Vektorplasmids selektiert werden,
- und instabile rekombinante Plasmide mit einem Donor-DNA-Insert in nur einer Sequenz der invertiert repetitiven Region des Vektorplasmids selektiert werden, die (wie bei Variante I) erst nach Klonierung spontan dupliziert werden.

— **bei Variante III**

aus einem rekombinanten Vektor durch Reklonierung mittels großschneidender Restriktasen (bei vollständiger Verdauung der Donor-DNA und Linearisierung des Vektorplasmids durch die gleiche Restriktase) innerhalb von identischen homologen Donor-DNA-Fragmenten nacheinander in zwei homologe Restriktase-Spaltstellen der invertiert repetitiven Sequenz des Vektorplasmids invertiert eingebaut wird und so ausschließlich und gezielt durch Reklonierung eine stabile Duplikation des klonierten Gens erreicht wird und solcherart erhaltene stabile und hochexprimierende rekombinante Plasmide in geeignete Mikroorganismen transformiert werden und diese Transformanten für Fermentationen eingesetzt werden.

2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Streptococcus-Plasmid pDB101 oder Derivate dieses Plasmids als Vektorplasmide mit invertiert repetitiver Sequenz eingesetzt werden
3. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß chromosomale DNA oder rekombinante Vektoren als Gendonoren verwendet werden
4. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß Klonierungen und Reklonierungen in Vektorplasmide mit invertiert repetitiver Sequenz mittels großschneidender oder aber kleinschneidender Restriktasen ausgeführt werden
5. Verfahren nach den Punkten 1, 2 und 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das funktionsfähige Gen mesophile alpha-Amylase von *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC23844 in pDB101 rekloniert wird
6. Verfahren nach den Punkten 1 und 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß das instabile rekombinante Plasmid pSB6 als Donor für die Reklonierung des Gens für mesophile alpha-Amylase genutzt wird
7. Verfahren nach den Punkten 1, 5 und 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Reklonierung mittels einer kleinschneidenden Restriktase ausgeführt wird, wobei der Gendonor pSB6 partiell verdaut und das Vektorplasmid pDB101 in einer von mehreren Spaltstellen linearisiert wird
8. Verfahren nach den Punkten 1, 5 und 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die kleinschneidenden Restriktasen Sau3A zur Reklonierung eingesetzt werden und solcherart ein Spektrum von rekombinanten Plasmiden erhalten wird, die im Amylase-defekten Wirtstamm GSB26 amyE aus der Stammlinie *B. subtilis* 168 ein unterschiedliches Niveau der Stabilität und der Plasmid-kodierten Bildung von mesophiler alpha-Amylase aufweisen
9. Verfahren nach den Punkten 1 und 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß aus dem so erhaltenen Spektrum von rekombinanten Plasmiden das stabile Plasmid pSB20 selektiert wird, bei dem das klonierte Donor-DNA-Fragment mit alpha-Amylase-Gen in der invertiert repetitiven Sequenz (je ein Amylasegen in den HindIII-Fragmenten B und B') dupliziert ist und ein entsprechender Gen-Dosis-Effekt in der Plasmid-kodierten Amylasebildung erreicht wird.
10. Verfahren nach den Punkten 1 und 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß aus dem so erhaltenen Spektrum von rekombinanten Plasmiden das instabile Plasmid pSB16 selektiert wird, bei dem nur ein Donor-DNA-Fragment mit Amylasegen in einer Sequenz der invertiert repetitiven Sequenz inseriert ist und dieses unikale Amylasegen erst nachfolgend spontan dupliziert wird, so daß das stabile und hochexprimierende rekombinante Plasmid pSB21 erhalten wird.
11. Verfahren nach den Punkten 1 und 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß aus dem so erhaltenen Spektrum von rekombinanten Plasmiden das stabile Plasmid pSB17 selektiert wird, bei dem ein Donor-DNA-Fragment mit alpha-Amylase-Gen in der unikaligen Region US₁ von pDB101 inseriert ist.

2. Verfahren nach den Punkten 1, 9, 10 und 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß pSB17, pSB20 oder pSB21 in Produktionsstämme von *Bacillus*, besonders von *B. amyloliquefaciens*, transformiert werden, diese Transformanten einer an sich bekannten submersen Fermentation unterworfen werden und die gebildete mesophile alpha-Amylase aus der Kulturlösung isoliert wird.

hierzu 5 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung von stabilen rekombinanten Plasmiden mit Duplikation eines hoch exprimierenden rekombinanten Produktgens, die durch Gen-Dosis-Effekt in Bakterien eine erhöhte Produktsynthese bedingt. Solche Genduplikationen haben bei hoch exprimierenden Genen und Nutzung von geeigneten Wirtsstämmen ein beträchtliches ökonomisches Interesse, da in diesen Fällen eine Erhöhung bis maximal eine Verdopplung (im Vergleich zu rekombinanten Plasmiden mit gleicher Kopienzahl und unikalem Geninsert) der Produktbildung auf hohem Niveau erreicht wird. Außerdem wird durch die Bereitstellung von stabilen rekombinanten Plasmiden eine grundsätzliche und dringende Anforderung an die industrielle Fermentation bei Herstellung von Massenprodukten erfüllt, bei denen auf die Anwendung von Antibiotika zur Stabilisierung von rekombinanten Plasmiden verzichtet werden muß.

Anwendungsgebiete der Erfindung sind alle Verfahren zur Steigerung der Produktbildung unter Einsatz gentechnisch erzeugter Bakterien in der industriellen Mikrobiologie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösung

Seit einigen Jahren wird in zunehmendem Maße versucht, gentechnische Methoden (MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., SAMBROOK, J.: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory 1983; SILHAVY, T. J., BERMAN, M. L., ENQUIST, L. W.; Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory 1984) zur Züchtung von mikrobiellen Produktionsbildnern anzuwenden (INOUE, M.: Experimental manipulation of gene expression. Academic Press 1983; RUSSELL, G. E.: Biotechnology and genetic engineering reviews, Vol. 2. Intercept 1984). Gentechnische Methoden gestatten im Unterschied zu konventionellen Methoden (CALAM, C. T.: In „Methods in microbiology“, Vol. 3A, pp.435–459. Academic Press 1970; HOPWOOD, D. A.: In „Methods in microbiology“, Vol. 3A, pp.363–433. Academic Press 1970) gezielte Änderungen des genetischen Materials, so daß die Züchtung mittels gentechnischer Methoden in weit effektiver Weise möglich ist.

Üblicherweise wird bei Anwendung gentechnischer Methoden das gewünschte Gen durch in-vitro-Rekombination in einen Vektor mit nach Möglichkeit hoher Kopienzahl inseriert, so daß das klonierte Gen amplifiziert wird und durch Gen-Dosis-Effekt eine erhöhte Produktsynthese erreicht wird sowie eine effektive Isolierung des rekombinanten Vektors möglich ist. Im Interesse einer hohen Biosyntheseleistung werden hoch exprimierende Gene kloniert, und in Kombination mit einer Genamplifikation sowie bei hinreichender Stabilität des rekombinanten Vektors und Nutzung eines geeigneten Wirtsorganismus werden Stämme erhalten, die gegenüber herkömmlichen Produktionsstämmen eine mehrfache Produktbildung ermöglichen. Dieses Ziel konnte jedoch für industrielle Fermentation (d. h. zur Herstellung von Massenprodukten) bisher nur in wenigen Fällen erreicht werden. Ein erstes positives Beispiel wurde durch das Patent von T. PALVA (1981/82) „Kombinations-DNS-Moleküle und Verfahren für die Erzeugung von Proteinen“, Offenlegungsschrift DE 31 52 001 11, gegeben. Nach diesem Patent konnte für ein rekombinantes Plasmid mit hoher Kopienzahl und hoch exprimierendem Produktgen eine stabile Plasmidtransformante von *B. subtilis* isoliert werden, in der das rekombinante Plasmid auch ohne Selektionsdruck durch Antibiotika stabil erhalten bleibt. Durch diese genetische Stabilität in Abwesenheit von Selektionsdruck wird eine wesentliche Anforderung an Produktionsstämme erfüllt, da Antibiotika bei der Herstellung von Massenprodukten nicht genutzt werden dürfen. Die Bedeutung dieser Erfindung muß aber insofern eingeschränkt werden, als über die Ursache der hier erzielten Stabilität und über die Reproduzierbarkeit zur Herstellung einer solchen stabilen Plasmidtransformante keine Angaben gemacht werden.

Im Unterschied zum PALVA-Patent erweist sich die ungenügende genetische Stabilität von rekombinanten Plasmiden häufig als eine kritische Barriere für ihre praktische Nutzung. Diese Instabilität äußert sich in Plasmidsegregation aus der Wirtszelle oder in strukturellen Änderungen des rekombinanten Plasmids, die zum Verlust oder zur Inaktivierung des rekombinanten Gens führen. Wegen des selektiven Vorteils von plasmidfreien gegenüber plasmidhaltigen Zellen (besonders mit einem rekombinanten Plasmid, das ein hoch exprimierendes rekombinantes Gen enthält) bei Wachstum ohne Selektionsdruck zugunsten des rekombinanten Plasmids und auf Grund der häufig langzeitigen Kultivierung über viele Generationen bei industriellen Fermentationen kann die Instabilität von rekombinanten Plasmiden zu einer erheblichen Reduktion der plasmidkodierten Produktbildung führen. Daraus resultiert die Notwendigkeit zur Erzeugung von stabilen rekombinanten Plasmiden oder zur Stabilisierung von rekombinanten Plasmiden. Die Stabilität von rekombinanten Plasmiden wird durch plasmidale und zelluläre Funktionen der DNA-Replikation, der Zellteilung und der Plasmid-Partition sowie durch den Einfluß des rekombinanten Inserts bestimmt, deren Kenntnis zur Stabilisierung des rekombinanten Plasmids genutzt werden kann (DOI, R. H.; In RUSSELL, G. E.: Biotechnology and genetic engineering reviews, Vol. 2, pp.121–155. Intercept 1984). Es gibt folgende Möglichkeiten zur Stabilisierung von rekombinanten Plasmiden:

- Nutzung von Medien ohne limitierenden Einfluß auf die Plasmid-Replikation.
- Verwendung von nativen Plasmiden mit geeigneten Replikations- und Partitionseigenschaften, die mit dem Wirtsmikroorganismus verträglich sind und in diesem natürlicherweise auf Stabilität selektiert worden sind.
- Nutzung von Plasmiden mit nur mittlerer Kopienzahl zur Vermeidung einer übermäßigen Belastung des Zellstoffwechsels, so daß sowohl normales Wachstum der Wirtszelle als auch normale Plasmid-Replikation gewährleistet sind.
- Nutzung von starken Transkriptions-Terminatoren im rekombinanten Gen zur Vermeidung der Störung von normalen Funktionen der Plasmid-Replikation durch „read through“-Transkription, die von einem starken Promotor des rekombinanten Gens ausgeht.
- Nutzung von regulierbaren Promotoren für das rekombinante Gen, so daß seine Expression erst nach dem Wachstum bei hoher Zelldichte initiiert und vorher die Stabilität des rekombinanten Plasmids nicht durch hohe Expression des Gens beeinträchtigt wird.

Die Vielzahl und Vielfalt dieser Faktoren mit Einfluß auf die genetische Stabilität von rekombinanten Plasmiden läßt erkennen, daß ihre Stabilisierung unter Umständen einen erheblichen Aufwand erfordert.

Eine weniger aufwendige Methode zur Stabilisierung besteht in der Reklonierung des rekombinanten Gens aus einem instabilen rekombinanten Plasmid in ein anderes, besser geeignetes Plasmid, das empirisch zu ermitteln ist. Beispiele für die erfolgreiche Anwendung dieser Methode sind in den Erfindungsanmeldungen G. STEINBORN et al. (1983) „Verfahren zur Herstellung von hitzestabiler alpha-Amylase“ und R. BORRIS et al. (1983) „Verfahren zur Herstellung von Bacillus- β -Glukanase“ enthalten. Nach diesen Erfindungen wurden rekombinante Gene für alpha-Amylase bzw. β -Glukanase aus einem durch Primärklonierung erhaltenen instabilen rekombinanten Plasmid in andere Plasmidvektoren rekloniert. Bei Reklonierung in das Streptococcus-Plasmid pDB101 (BEHNKE, D., MAHLKE, M., HARTMANN, M., WALTER, F.: Plasmid 2, 605–616, 1979) konnten für beide Gene (im Falle der β -Glukanase für ein hochexprimierendes Produktgen) rekombinante Plasmide abgeleitet werden, die in Bacillus-Wirtsstämmen ohne Selektionsdruck stabil repliziert und exprimiert werden. Die Reklonierung erfolgte in üblicher Weise mittels einer groß schneidenden Restriktase, die kohäsive Enden erzeugt, hier in beiden Fällen mittels EcoRI in die unikale EcoRI-Spaltstelle von pDB101. Eine besondere Bedeutung der beiden Erfindungen liegt in dem Ergebnis, daß bei unabhängigen Reklonierungen von unterschiedlichen Donorfragmenten mit unterschiedlichen Produktgenen in die gleiche Spaltstelle des Vektorplasmids in beiden Fällen stabile rekombinante Plasmide erzeugt werden konnten. Dadurch wird für diese Erfindung im Unterschied zum PALVA-Patent eine Reproduzierbarkeit und Anwendbarkeit des Verfahrens für wenigstens zwei unterschiedliche Produktgene nachgewiesen. Die Bedeutung der Erfindungen wird aber vor allem dadurch begrenzt, daß

- nur Ergebnisse über die Nutzung einer speziellen Restriktase-Spaltstelle von pDB101 zur Reklonierung und Erzeugung von stabilen rekombinanten Plasmiden vorliegen,
- keine Ergebnisse zu den Ursachen der genetischen Stabilität von pDB101 und davon abgeleiteten Plasmiden enthalten sind sowie
- ihre Kopienzahl (5 Kopien/Zelle) nur auf niedrigem bis mittlerem Niveau liegt und dadurch ein entsprechend geringer Gen-Dosis-Effekt in der plasmidkodierten Produktbildung erreicht wird.

Wegen seiner erfolgreichen Anwendung für eine reproduzierbare Erzeugung von stabilen rekombinanten Plasmiden (s. o.) verdient pDB101 größtes Interesse; vergleichbare Plasmidvektoren für industriell genutzte Bakterien sind nicht bekannt. Die ersten positiven Ergebnisse zur Nutzung von pDB101 berechtigten jedoch noch nicht zu der Schlußfolgerung, daß sich dieser Vektor allgemein für viele verschiedene Produktgene, in unterschiedlichen Insertionsorten und in verschiedenen Wirtsstämmen nutzen läßt. Neben weiteren praktischen Erfahrungen sind dafür vor allem Ergebnisse zu solchen plasmidalen Funktionen und strukturellen Besonderheit notwendig, die in pDB101 und abgeleiteten rekombinanten Plasmiden für die genetische Stabilität verantwortlich sind.

Als strukturelle Besonderheit sind in pDB101 und verwandten Streptococcus-Plasmiden lange, invertiert repetitive Sequenzen (d. h. zwei homologe, entgegengesetzt orientierte DNA-Sequenzen) enthalten, die bei pDB101 ca. 75% des Plasmidmoleküls einnehmen. Diese invertierten Repeats ermöglichen die Transformation von Plasmidmonomeren in kompetente Zellen von *B. subtilis* und haben dadurch für die Etablierung von *B. subtilis* als Klonierungswirt Bedeutung erlangt (DOI, R. H.: In RUSSEL, G. E.: Biotechnology and genetic engineering reviews, Vol. 2, pp. 121–155. Intercept 1984). Weitere biologische Funktionen der invertierten Repeats, u. a. für die Stabilisierung von Plasmiden, sind nicht bekannt.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht in der Erzeugung von rekombinanten Plasmiden, die bei hoher genetischer Stabilität und Expression in geeigneten bakteriellen Wirtsstämmen unter Fermentationsbedingungen eine reproduzierbare im Vergleich zu herkömmlichen Produktionsstämmen erhöhte Produktbildung gewährleisten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Entwicklung und Erprobung von neuartigen Verfahren zur Erzeugung von rekombinanten Plasmiden, die in geeigneten Wirtsstämmen bei hoher genetischer Stabilität eine hohe Produktbildung ermöglichen. Dazu werden folgende Prinziplösungen angestrebt:

- Klonierung oder Reklonierung von Produktgenen in genetisch stabilen Plasmidvektoren unter Anwendung des Zufallsprinzips auf die Erzeugung von Donorfragmenten und Insertionsorten sowie auf ihre Kombination bei der Ligation, so daß ein breites Spektrum unterschiedlicher rekombinanter Plasmide erhalten wird und stabile, hoch exprimierende rekombinante Plasmide als positive Kombinationen ausgelesen werden.
- Steigerung der Produktbildung durch Erhöhung der Gen-Dosis von rekombinanten Produktgenen.
- Ermittlung von geeigneten Bakterienstämmen als Wirtstämme, die unter geeigneten Fermentationsbedingungen alle Voraussetzungen für eine hohe Stabilität des rekombinanten Plasmids und hohe Expression des rekombinanten Gens sowie für eine effektive Exkretion und hohe Stabilität des Genproduktes erfüllen.

Entsprechend umfaßt die Erfindung drei Teile, deren wesentlicher Inhalt im folgenden dargestellt wird.

1. Entwicklung und Nutzung der „Puzzle-Methode“ als eine neue Variante des „shot gun“-Verfahrens

Die Entwicklung dieser Methode geht davon aus, daß erfahrungsgemäß nach Klonierung oder Reklonierung die Spezifität des Donorfragmentes und des Insertionsortes im Vektorplasmid einen wesentlichen Einfluß auf die Stabilität und Expression eines rekombinanten Plasmids haben kann. Dieser Einfluß ergibt sich aus der Wechselwirkung von Genfunktionen des Donorfragmentes (bes. von starken Promotoren und Terminatoren) mit benachbarten Genfunktionen des Vektorplasmids (bes. der Plasmid-Replikation und -Partition). Entsprechend sind bei verschiedenen Kombinationen von unterschiedlichen Donorfragmenten mit unterschiedlichen Insertionsorten verschiedene rekombinante Plasmide zu erwarten, die sich hinsichtlich Stabilität und Expression unterscheiden. Unter anderem sind auch hoch stabile und zugleich hoch exprimierende rekombinante Plasmide zu erwarten, die erfahrungsgemäß für industrielle Fermentationen genutzt werden sollen. Davon ausgehend wird die „Puzzle-Methode“ (Abb. 1) entwickelt, die eine neue Variante des üblichen „shot gun“-Verfahrens darstellt. Erfindungsgemäß werden sowohl die Donor- als auch die Vektor-DNA durch die gleiche oder eine isoschizomere, kleinschneidende Restriktase (z. B. HhaI, HpaII, MboI, MspI, Sau3A) behandelt, wobei die Restriktasebehandlung für Donor- und Vektor-DNA in unterschiedlichem Maße erfolgt. Die Donor-DNA wird partiell verdaut, so daß verschiedene Donorfragmente von überwiegend 2 bis 6 kb entstehen, die das zu klonierende Gen mit hoher Wahrscheinlichkeit in aktiver (d. h. ungeschnittener) Form enthalten. Dagegen wird das Vektorplasmid nur in geringem Maße behandelt, so daß mit

statistischer Wahrscheinlichkeit pro Plasmidmolekül nur in einer von vielen möglichen Spaltstellen geschnitten wird und so eine Population von unterschiedlich linearisierten Molekülen des Vektorplasids entsteht. Bei anschließender Ligation entstehen dann unterschiedliche rekombinante Plasmide, die sich hinsichtlich Größe und Spezifität des Donorfragments, Orientierung seiner Insertion und hinsichtlich des Insertionsortes im Vektorplasmid unterscheiden. Nach Transformation des Ligationsgemisches in einen geeigneten Wirtstamm sind schließlich Plasmidtransformanten mit solchen rekombinanten Plasmiden zu selektieren, bei denen Donorfragment und Insertionsort nach der Art eines Puzzlespiels für hohe Stabilität und Expression des rekombinanten Plasids kombiniert worden sind.

Steigerung des Gen-Dosis-Effektes durch Duplikation von rekombinanten Genen nach Insertion in eine invertiert repetitive Sequenz von Vektorplasmen

Dieser Teil der Erfindung geht von dem bekannten Ergebnis aus, daß bei Reklonierung in die unikale EcoRI-Schnittstelle des Streptococcus-Plasids pDB101 extrem stabile rekombinante Plasmide (u. a. auch für ein hoch exprimierendes β -Glukanase-Gen) in Bacillus-Wirtstämmen erhalten wurden. Aus dieser positiven Erfahrung ergibt sich die Fragestellung, ob sich pDB101 grundsätzlich (d. h. nicht nur für spezielle rekombinante Gene und bei Insertion in seine unikale EcoRI-Schnittstelle) für die Erzeugung von stabilen rekombinanten Plasmiden in Bacillus nutzen läßt. Die Bearbeitung dieser Fragestellung erfolgt zunächst am Beispiel des hoch exprimierenden Gens für mesophile alpha-Amylase von *B. amyloliquefaciens* und unter Anwendung der erfindungsgemäßen „Puzzle-Methode“ (Abb. 1). Für die Anwendung der „Puzzle-Methode“ bietet pDB101 gute Voraussetzungen, da es auf Grund seiner Größe viele Schnittstellen für kleinschneidende Restriktasen enthält und dadurch viele verschiedene Insertionsorte für die Klonierung in pDB101 genutzt werden können. In diesem Teil der Erfindung werden alle Untersuchungen unter Laborbedingungen und im Wirtstamm *B. subtilis* GSB26¹⁾ ausgeführt, der auf Grund seines Defektes in der chromosomal kodierten Amylasebildung eine Plasmidkodierte Amylasebildung sensibel nachweisen läßt.

Ausgangspunkt für die experimentelle Bearbeitung der Fragestellung ist die Primärklonierung des Gens für mesophile alpha-Amylase, die nach dem üblichen „shot gun“-Verfahren erfolgt und zur Isolierung des hoch exprimierenden, aber instabilen rekombinanten Plasids pSB6 führt (Abb. 2).

¹⁾ Zur Herkunft der Stämme s. Ausführungsbeispiel I.1.

Als Gendonor wird *B. Amylolyquefaciens* ATCC23844¹⁾ verwendet, da sich dieser Stamm durch eine extrem hohe chromosomal kodierte Amylasebildung auszeichnet. Aus dem instabilen Plasmid pSB6 wird das rekombinante Amylasegen nach der erfindungsgemäßen „Puzzle-Methode“ in das Vektorplasmid pDB101 rekloniert. Wie zu erwarten, wird durch diese Reklonierung ein Spektrum von verschiedenen rekombinanten Plasmiden erhalten, die sich nach dem Grad der Plasmidstabilität und dem Expressionsniveau der plasmidkodierten Amylasebildung vier Gruppen zuordnen lassen (instabil-niedrig exprimierend, stabil-niedrig exprimierend; instabil-hoch exprimierend; stabil-hoch exprimierend).

Unter einer Vielzahl von rekombinanten Plasmiden werden nur zwei stabile, hoch exprimierende Plasmide (pSB17, pSB20) gefunden, die unter der Zielstellung ihrer praktischen Nutzung eingehend untersucht werden. Ihre Restriktionsanalyse ergibt, daß bei pSB17 der rekombinative Einbau des Amylasegens in der nicht repetitiven Sequenz US1 von pDB101 erfolgt ist. Die Isolierung von pSB17 beweist, daß in pDB101 neben der unikalen EcoRI-Spaltstelle auch andere unikale Insertionsorte in der nichtrepetitiven Sequenz US1 für die Erzeugung von stabilen, hoch exprimierenden rekombinanten Plasmiden geeignet sind. Von besonderer Bedeutung für die Erfindung erweist sich das rekombinante Plasmid pSB20, bei dem im Unterschied zu pSB17 das rekombinante Amylasegen in duplizierter Form vorliegt (Abb. 3). Entsprechend dieser Duplikation kodiert pSB20 im Vergleich zu pSB17 (mit nur einem rekombinanten Amylasegen pro Plasmidmolekül) bei gleicher Kopienzahl eine bis zu zweifache Amylasebildung. Dieser Gen-Dosis-Effekt wird bei relativ hoher Amylasebildung ausgeprägt, die hier jedoch wegen Nutzung von Labormedien und des Wirtssystems *B. subtilis* 168 noch kein ökonomisch bedeutendes Niveau erreicht.

In pSB20 sind die beiden Duplikate des rekombinanten Amylasegens in zwei getrennten, identischen Donorfragmenten enthalten, die an homologen Stellen der beiden Sequenzen des invertierten Repeats von pDB101 und ebenfalls invertiert inseriert sind.

¹⁾ Zur Herkunft der Stämme s. Ausführungsbeispiel I.1.

Diese Identität beweist, daß solche Genduplikationen in zwei Schritten entstehen:

1. Insertion eines Donorfragmentes mit einem Amylasegen in nur eine Sequenz des invertierten Repeats
2. Duplikation des inserierten Donorfragmentes durch homologe Rekombination.

Zusätzliche Beweise werden durch die Charakterisierung der hoch exprimierenden, im Unterschied zu pSB20 aber instabilen rekombinanten Plasmide pSB16 und pSB18 erhalten, die ebenfalls nach der „Puzzle-Methode“ erzeugt worden sind. Aus diesen instabilen rekombinanten Plasmiden entstehen spontan stabile rekombinante Plasmide mit dupliziertem Amylasegen, u. a. das Plasmid pSB21, das in seiner Struktur mit pSB20 übereinstimmt. Daraus folgt, daß nach Klonierung in das invertierte Repeat von pDB101 erst die identische Duplikation des rekombinanten Inserts zur genetischen Stabilität des rekombinanten Plasids führt. Da die instabilen Plasmide pSB16 und pSB18 unabhängig voneinander erzeugt wurden und von diesen stabile Plasmide mit dupliziertem Produktgen wiederholt und in verschiedenen Wirtstämmen abgeleitet werden können, stellt die erfindungsgemäße Erzeugung von stabilen, hoch exprimierenden rekombinanten Plasmiden einen reproduzierbaren Prozeß dar.

Die bisherige Darstellung des Wesens der Erfindung beschränkt sich im 2. Teil auf ein Gen für mesophile alpha-Amylase, auf das Vektorplasmid pDB101, auf die „Puzzle-Methode“ zur Reklonierung des rekombinanten Produktgens und den Wirtstamm *B. subtilis* GSB26. Diese Art der Darstellung erfolgt im Interesse einer besseren Anschaulichkeit, soll die Erfindung aber nicht auf einen speziellen Fall der Erzeugung eines stabilen, hoch exprimierenden rekombinanten Plasids beschränken. Die erfindungsgemäße „Puzzle-Methode“ ist nicht nur zur Reklonierung aus einem rekombinanten Vektor, sondern auch zur Klonierung aus einem komplexen Genträger (chromosomaler DNA) anwendbar und ist nicht auf die Nutzung von Plasmidvektoren mit invertiertem Repeat beschränkt, sofern durch Klonierung oder Reklonierung in

üblicherweise verwendete Plasmide mit unikaler Sequenz auf Grund eines Puzzle-Effektes stabile, hoch exprimierende rekombinante Plasmide erzeugt werden können. Ebenso ist die erfindungsgemäße Nutzung von Plasmidvektoren mit invertiertem Repeat zur Erzeugung von Genduplikationen nicht auf das spezielle Plasmid pDB101 und auf die Anwendung der „Puzzle-Methode“ beschränkt; alternativ kann die Klonierung oder Reklonierung in invertierte Repeats nach dem an sich bekannten „shot gun“-Verfahren mittels großschneidender Restriktasen (z. B. BamHI, BclI, BglII, EcoRI, HindIII) erfolgen, sofern in dem betreffenden invertierten Repeat entsprechende unikale Spaltstellen enthalten sind. Entsprechend ist die Erfindung allgemein anwendbar auf:

- beliebige homologe oder heterologe Produktgene, die keine für die Wirtszelle toxischen Produkte kodieren
- beliebige Bakterien als Wirtszellen, sofern sie sich für eine hohe genetische Stabilität des rekombinanten Plasmids und hohe Expression des rekombinanten Produktgens sowie effektive Exkretion und hohe Stabilität des Genproduktes eignen
- vorzugsweise, aber nicht ausschließlich, solche stabilen Vektorplasmide mit invertiertem Repeat, das sich zur Duplikation von rekombinanten Produktgenen nutzen läßt
- verschiedene Wege zur Erzeugung von solchen Genduplikationen.

Neben der „Puzzle-Methode“ sind u. a. folgende alternative Verfahren zur Duplikation von Produktgenen in Vektorplasmiden mit invertiertem Repeat anwendbar:

- Einmalige Klonierung oder Reklonierung nach dem üblichen „shot gun“-Verfahren mittels großschneidender Restriktasen in eine Sequenz des invertierten Repeats mit nachfolgender spontaner Genduplikation
- zweifache, schrittweise Klonierung oder Reklonierung von zwei identischen Donorfragmenten nach dem üblichen „shot gun“-Verfahren mittels großschneidender Restriktasen in eine Sequenz des invertierten Repeats mit nachfolgender spontaner Genduplikation
- zweifache, schrittweise Klonierung oder Reklonierung von zwei identischen Donorfragmenten nach dem üblichen „shot gun“-Verfahren mittels großschneidender Restriktasen in zwei homologe Schnittstellen des invertierten Repeats.

3. Ermittlung von Wirtsstämmen für eine praktische Nutzung von hochexprimierenden rekombinanten Plasmiden

Während im 2. Teil der Erfindung die Erzeugung und Untersuchung von stabilen, hoch exprimierenden rekombinanten Plasmiden unter Nutzung von Laborstämmen gut charakterisierter Wirtsstämme (z. B. B. subtilis 168) erfolgt, werden im 3. Teil der Erfindung geeignete Bakterien als Wirtsstämme für eine praktische Nutzung dieser rekombinanten Plasmide ermittelt. Als Kriterien für ihre Eignung werden die Stabilität des rekombinanten Plasmids in Abwesenheit von Selektionsdruck sowie eine möglichst hohe und reproduzierbare plasmidkodierte Produktbildung gewertet, die die Produktbildung durch herkömmliche Produktionsstämme mehrfach übertrifft. Dabei wird der Gen-Dosis-Effekt durch die erfindungsgemäße Genduplikation (s. Teil 2 der Erfindung) auf hohem Niveau der Produktbildung ausgeprägt, so daß dieser Gen-Dosis-Effekt zu einer ökonomisch bedeutenden Steigerung der Produktbildung führt (Abb. 4, Abb. 5).

Die Ermittlung von geeigneten Wirtsstämmen erfolgt auf empirische Weise nach Transformation von hoch exprimierenden Plasmiden in verschiedene Bakterien, da ihre Eignung in komplexer Weise von Eigenschaften des rekombinanten Plasmids und der Wirtszelle sowie von exogenen Faktoren abhängt. Getestet werden vorzugsweise solche Bacillus-Stämme, die für das entsprechende Genprodukt eine hohe chromosomal kodierte Syntheseleistung aufweisen und nach Möglichkeit auch schon als industriell genutzte Produktbildner etabliert sind. Die Testung konzentriert sich besonders auf B. amyloliquefaciens, da sich Stämme von B. amyloliquefaciens (ohne rekombinantes Plasmid) bereits international bei industriellen Fermentationen für Massenenzyme vielfach bewährt haben.

Geeignete Bakterienstämme mit einem stabilen, hoch exprimierenden rekombinanten Plasmid werden als potentielle Produktionsstämme einer an sich bekannten submersen Fermentation unterworfen, die Produktbildung wird im Vergleich zum Donor- und Rezipientenstamm sowie zu herkömmlichen Produktionsstämmen bestimmt, und das plasmidkodierte Produkt wird aus der Kulturlösung isoliert.

Auswirkung der Erfindung

Durch die erfindungsgemäßen Verfahren (Puzzle-Methode“, Genduplikation) werden gentechnisch veränderte Mikroorganismen als potentielle Produktionsstämme gewonnen, die die Produktbildung herkömmlicher Produktionsstämme mehrfach übertreffen. Diese Steigerung der Produktbildung wird bei gleichem Energie-, Material- und Zeitaufwand sowie bei gleicher Fermentationskapazität erreicht, so daß sich die Erfindung in einer mehrfachen Steigerung der Produktivität bei Fermentationen auswirkt.

Die erfindungsgemäßen Verfahren sind für verschiedene Produktsynthesen nutzbar und können bei verschiedenen Mikroorganismen angewendet werden, sofern stabile Plasmidvektoren zur Verfügung stehen. Die Anwendung der „Puzzle-Methode“ beschränkt sich nicht auf die Klonierung in ein invertiertes Repeat zur Erzeugung von Genduplikationen, sondern ist grundsätzlich für Klonierungen geeignet. Vorteilhaft ist ihre Anwendung zur Erzielung von bestimmten Puzzle-Effekten (Plasmidstabilität, hohe Expression von rekombinanten Genen), für die Nutzung von wenig charakterisierten Vektorplasmiden und für Reklonierungen, bei denen auf die Nutzung von Linkern oder Adaptoren verzichtet wird.

Ausführungsbeispiele

- I. Erzeugung von stabilen, hoch exprimierenden rekombinanten Plasmiden für mesophile alpha-Amylase unter Nutzung der „Puzzle-Methode“ und des Vektorplasmids pDB101
Die experimentelle Bearbeitung erfolgt nach Abb. 1 in mehreren Schritten und wird entsprechend in den folgenden Kapiteln I.1 bis I.5 dargestellt.
- I.1. Primärklonierung des Gens für mesophile alpha-Amylase nach dem „shot gun“-Verfahren
 - Restriktaseverdauung: Chromosomale DNA des Gendonors B. amyloliquefaciens ATCC23844 (INGLE, M. B., BOYER, E. W.: In „Microbiology 1976“, pp. 420–426. Washington 1976), isoliert nach der Methode von SAITO und MIURA (SAITO, H., MIURA, K.-I.: Biochim. Biophys. Acta **72**, 619–629, 1963), und Plasmid-DNA des Vektors pGB354 (BEHNKE, D., GILMORE, M. S., FERRETTI, J. J.: In „Microbiology 1982“, pp. 239–242. Washington 1982), isoliert nach der Methode von CRYCZAN et al. (GRYCZAN, T. J., CONTENTE, S., DUBNAU, D.: J. Bacteriol. **134**, 318–329. 1978), werden mittels BclI in getrennten Ansätzen verdaut. In 100 ml Verdauungsgemisch sind enthalten: 10 bis 20 µg DNA, 1 Enzymeinheit BclI pro 3 bis 4 µg DNA, 10 µg 10fach konzentrierter BclI-Puffer (Zusammensetzung nach Katalog der Bethesda Research

Laboratories 1981/82). Nach 4. Std. Inkubation bei 45°C wird die BclI-Verdauung durch Behandlung mit Phenol-Chloroform (1:1) beendet. Phenol wird durch Schütteln (4x) mit Äther extrahiert, die geschnittene DNA in 0,3M Na-Acetat — 80% Äthanol gefällt, 3x mit Äthanol (80%) gewaschen und mit gleichem Volumen TE-Puffer (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH 7,5) gelöst.

- Ligation: Restriktase — behandelte DNA des Gendonors und des Vektorplasmids werden 12 Std. bei 12°C in folgendem Gemisch (Gesamtvolumen 100 µl) ligiert: 8 µg Donor-DNA; 2 µg Vektor-DNA; 100 mM Tris-HCl (pH 7,5); 5 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 1 Enzymeinheit Ligase pro 1 µg DNA; 0,4 mM ATP. Die Ligation wird durch 10 min Hitzebehandlung bei 65°C beendet.
- Plasmidtransformation und Selektion: Das Ligationsgemisch wird nach der Methode von CHANG und COHEN (CHANG, S., COHEN, S. N.: *Molec. gen. Genet.* **168**, 111–115. 1979) in Protoplasten des Amylase-defekten Wirtsstammes *B. subtilis* GSB26/1/ transformiert. Zur Stabilisierung der Protoplasten wird dem Medium SMMP 0,4% Serumalbumin zugesetzt. Das Transformationsgemisch wird auf DM3-Regenerationsmedium — 5 µg Cm/ml — 1% unlösliche Stärke plattiert, und die Selektionsplatten werden 3 Tage bei 37°C inkubiert. Cm^R-Plasmidtransformanten werden mit einer Häufigkeit von $\frac{1}{2} \times 10^{-4}$ pro regenerierte Protoplasten und davon 10^{-4} Amy⁺Cm^r-Transformanten erhalten. Eine Amy⁺Cm^r-Transformante mit hoher Amylasebildung und hinreichender Stabilität wird für die weitere Bearbeitung ausgewählt. Aus dieser Transformante wird nach der Methode von GRYCZAN et al. (GRYCZAN, T. J., CONTENTE, S., DUBNAU, D.: *J. Bacteriol.* **134**, 318–329. 1978) ein rekombinantes Plasmid isoliert, das sich vom Vektorplasmid pGB354 durch ein zusätzliches 5,4 kb (BclI)-Insert unterscheidet (Abb. 2). Das so erzeugte rekombinante Plasmid wird mit „pSB6“ bezeichnet, die Plasmidtransformante erhält die Stammbezeichnung „*B. subtilis* GSB26 (pSB6)“. Die Plasmidtransformante *B. subtilis* GSB26 (pSB6) wurde am 21. 9. 84 im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der AdW der DDR, 6900 Jena, Beutenbergstr. 11, hinterlegt.

GSB26 ist eine Streptomycin-resistente Mutante des Ausgangsstammes QB1133 sacA321 aro1906 metB5 amyE (STEINMETZ, M., KUNST, F., DEDONDER, R.: *Molec. gen. Genet.* **148**, 281–285. 1976)

2. Charakterisierung des durch Primärklonierung erhaltenen instabilen rekombinanten Plasmids pSB6

- Restriktionsanalyse von pSB6: Zur Charakterisierung von pSB6 mittels Restriktasen werden die gleichen Methoden der Restriktasebehandlung und Gelelektrophorese wie in STEINBORN et al. (Erfindungsanmeldung 1983), angewendet. Durch Einfach-, Zweifach- und Dreifachverdauungen mit verschiedenen Restriktasen und Auftrennung in Agarose- und Polyacrylamidgelen wird für pSB6 die Restriktionskarte nach Abb. 2 ermittelt. Das durch Primärklonierung inserierte BclI-Fragment hat eine Größe von 5,4 kb und zeigt auf der Seite der EcoRI-Schnittstelle eine weitgehende Übereinstimmung mit dem von PALVA (PALVA, I.: *Gene* **19**, 81–87. 1982) aus einem anderen Donorstamm von *B. amyloliquefaciens* klonierten Fragment. Nach den Ergebnissen von PALVA befindet sich das funktionsfähige Amylasegen im PvuII–PvuII bzw. BclI–BamHI-Subfragment von pSB6.
- Nachweis der Plasmid-kodierten Bildung von mesophiler alpha-Amylase durch *B. subtilis* GSB26(pSB6): Bei Retransformation von pSB6 in den Plasmid-freien, Amylase-defekten Wirtsstamm GSB26 ist in allen Fällen, korreliert mit dem gelelektrophoretischen Nachweis von pSB6, ein gekoppelter Transfer des Phänotyps Amy⁺Cm^r nachweisbar. Da die Transformation nach der für Plasmid-DNA spezifischen PEG-Protoplasten-Methode nach CHANG und COHEN (CHANG, S., COHEN, S. N.: *Molec. gen. Genet.* **168**, 111–115. 1979) erfolgt, kann chromosomale Transformation als Ursache für diesen Cotransfer ausgeschlossen werden. Ein zusätzlicher Nachweis für die Plasmid-kodierte Amylasebildung ergibt sich aus der spontanen Segregation von pSB6 aus GSB26 (s.u.), bei der in allen Fällen mit dem Plasmidverlust auch Cm^r und Amy⁺ eliminiert werden. Hinsichtlich des Grades der Hitzestabilität stimmt die von pSB6 in *B. subtilis* GSB26 kodierte Amylase mit der chromosomal kodierten mesophilen alpha-Amylase des Donorstammes *B. amyloliquefaciens* ATCC23844 überein (Inaktivierung auf 0,1% Restaktivität nach 60 min bei 85°C). Zur Charakterisierung der Plasmid-kodierten Amylasebildung wird die alpha-Amylase-Aktivität in Überständen von Flüssigkulturen in TBV-Vollmedium (1% bactotryptone, Difco — 0,5% yeast extract, Difco — 0,5% NaCl; pH 7,0) — 5% lösliche Stärke — 10 µg Cm/ml nach 48 Std. Kulturdauer bei 37°C bestimmt. Zur Ermittlung der Hitzestabilität wird die Hitzebehandlung des Kulturüberstandes in Anwesenheit von 2 mM CaCl₂ ausgeführt. Die quantitative Bestimmung der alpha-Amylase-Aktivität erfolgt mittels Spofa-alpha-Amylase-Testtabletten.
- Einfluß von Selektionsdruck auf die genetische Stabilität und Plasmid-kodierte Amylasebildung von pSB6: Unter Selektionsdruck (10 µg Cm/ml) ist für GSB26 (pSB6) nach Langzeitkultivierung (>30 Generationen) in TBV-Vollmedium-5% lösliche Stärke keine Plasmidsegregation nachweisbar. Die Plasmid-kodierte Amylasebildung erreicht ein 2- bis 3faches Niveau über dem bereits hohen Ausgangsniveau des Donorstammes ATCC23844, und die Kopienzahl (bestimmt nach WEISBLUM, G., GRAHAM, M. Y., GRYCZAN, T., DUBNAU, D.: *J. Bacteriol.* **137**, 635–643. 1979) von pSB6 beträgt 20/Zelle. Dagegen ist bei Langzeitkultivierung ohne Selektionsdruck ein Plasmidverlust bei 20 bis 80% der Zellen feststellbar, und die Amylasebildung führt zu entsprechend reduzierten Aktivitäten. Die genetische Instabilität von pSB6 beschränkt sich nicht auf *B. subtilis* GSB26, sondern ist auch für andere *Bacillus*-Wirtsstämme feststellbar. Hinsichtlich der hohen Expression des rekombinanten Amylasegens erfüllt pSB6 eine wesentliche Anforderung für seine Nutzung in Produktionsstämmen, ist jedoch wegen seiner genetischen Instabilität in Abwesenheit vom Selektionsdruck dafür nicht geeignet.

1.3. Reklonierung des rekombinanten Gens für mesophile alpha-Amylase nach der „Puzzle-Methode“

- Restriktaseverdauung: DNA des rekombinanten Donorplasmids pSB6 und des Vektorplasmids pDB101 (BEHNKE, D., MAHLKE, M., HARTMANN, M., WALTER, F.: *Plasmid* **2**, 605–616. 1979) werden in getrennten Ansätzen mit der kleinschneidenden Restriktase Sau3A behandelt. In 100 µl Verdauungsgemisch sind enthalten: 10 bis 20 µg Plasmid-DNA, 0,5 µl Sau3A unbekannter Aktivität, 10 µl 10fach konzentrierter Sau3A-Puffer (Zusammensetzung nach Katalog der New England Bio Labs 1983/84). Bei Variation der Behandlungszeit erfolgt die Sau3A-Behandlung für beide Plasmide in unterschiedlichem Maße: Das Donorplasmid wird partiell gespalten, so daß überwiegend Fragmente von 2 bis 6 kb entstehen (gemessen an einem λ HindIII-Standard). Das Vektorplasmid wird dagegen nur so kurzzeitig behandelt, daß überwiegend nur eine Linearisierung, nicht aber eine Fragmentierung resultiert. Als Standard für die Linearisierung von pDB101 dient EcoRI-verdaute DNA von pDB101 (pDB101 hat nur eine unikale EcoRI-Spaltstelle).

- Ligation: Ausführung wie unter I.1. beschrieben
 - Transformation und Selektion: Das Ligationsgemisch wird wie unter I.1. nach der Methode von CHANG und COHEN (1979) in Protoplasten von *B. subtilis* GSB26 amyE transformiert. Es werden Em^r-Plasmidtransformanten mit einer Häufigkeit von 10⁻³ pro regenerierte Protoplasten erhalten, von denen 10⁻² zugleich Amy⁺ sind. Aus drei unabhängigen Versuchen werden 150 repräsentative Amy⁺ Cm^r-Plasmidtransformanten isoliert und charakterisiert. Erwartungsgemäß (s. Darlegung des Wesens der Erfindung, Teil 1) führt die Reklonierung nach der „Puzzle-Methode“ zu einem Spektrum unterschiedlicher rekombinanter Plasmide, so daß die 150 Plasmidtransformanten hinsichtlich des Niveaus der Amylasebildung und des Grades der Plasmidstabilität im wesentlichen vier Gruppen zuzuordnen sind:
- | Amylasebildung | Plasmidstabilität | rekombinante Plasmide |
|----------------|-------------------|-----------------------|
| — gering | instabil | |
| — gering | stabil | |
| — hoch | instabil | pSB9, 15, 16, 18 |
| — hoch | stabil | pSB17, 20 |

Die überwiegende Mehrheit dieser Plasmidtransformanten ist durch ein niedriges Niveau der Plasmid-kodierten Amylasebildung charakterisiert. Von der Plasmidtransformanten mit hoher Amylasebildung (ca. 10fach im Vergleich zur ersten Gruppe) enthalten vier Transformanten ein instabiles und zwei Transformanten ein stabiles rekombinantes Plasmid. Unter der Zielstellung ihrer praktischen Nutzung konzentriert sich die weitere Charakterisierung zunächst (s. I.4) auf diese beiden stabilen, hochexprimierenden rekombinanten Plasmide, die mit „pSB17“ und „pSB20“ bezeichnet werden; die entsprechenden Plasmidtransformanten erhalten die Stammbezeichnung *B. subtilis* GSB26 (pSB17) bzw. GSB26 (pSB20).

Die Plasmidtransformanten *B. subtilis* GSB26 (pSB17) und GSB26 (pSB20) wurden am 21.9.84 im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der AdW der DDR, 6900 Jena, Beutenbergstr. 11, hinterlegt.

I.4. Charakterisierung der durch Reklonierung nach der „Puzzle-Methode“ erhaltenen stabilen rekombinanten Plasmide pSB17 und pSB20

- Charakterisierung der Plasmid-kodierten Bildung von mesophiler alpha-Amylase durch GSB26(pSB17) und GSB26(pSB20): Der Nachweis der Plasmid-kodierten Bildung von mesophiler alpha-Amylase erfolgt hier nach den gleichen Kriterien wie unter I.2. Spontane Plasmidsegregation kann bei pSB17 und pSB20 nicht als Kriterium genutzt werden, da beide rekombinanten Plasmide in GSB26 extrem stabil sind: Nach Langzeitkultivierung (>30 bis 50 Generationen) in TBV-5%-lösliche Stärke ist für pSB17 und pSB20 sowohl mit als auch ohne Selektionsdruck (10 µg Em/ml) keine strukturelle Änderung oder Segregation dieser rekombinanten Plasmide feststellbar. Entsprechend hat Selektionsdruck durch Em auch keinen Einfluß auf das Niveau der Plasmid-kodierten Amylasebildung. Sie erreicht bei GSB26 (pSB17) etwa das Niveau des Plasmid-freien Donorstammes ATCC23844, während GSB26 (pSB20) eine 2fach höhere Amylasebildung erreicht (Abb. 3). Diese 2fache Amylasebildung kodiert pSB20 im Vergleich zu pSB17 bei gleicher Kopienzahl, worin beide rekombinanten Plasmide mit dem Vektorplasmid pDB101 (5 Kopien pro Zelle; bestimmt nach WEISBLUM, B., GRAHAM, M. Y., GRYZAN, T., DUBNAU, D.: J. Bacteriol. 137, 635–643. 1979) übereinstimmen.
- Restriktionsanalyse von pSB17 und pSB20: Dazu werden die gleichen Methoden der Restriktasebehandlung und Gelelektrophorese wie in STEINBORN et al. (Erfindungsanmeldung 1983) angewendet. Nach Restriktasebehandlung wird gelelektrophoretisch nachgewiesen, daß bei pSB17 (21,7 kb) das rekombinante Amylasegen in der nicht repetitiven Sequenz US1 von pDB101 (17,85 kb) inseriert ist. Daraus kann geschlossen werden, daß neben der EcoRI-Spaltstelle auch andere Insertionsorte in der unikalen Sequenz US1 von pDB101 für die Erzeugung von stabilen rekombinanten Plasmiden geeignet sind.
Zu einem besonders interessanten und originellen Ergebnis führt die Restriktionsanalyse von pSB20. Wie aus der Restriktionskarte in Abb. 4 ersichtlich, enthält pSB20 eine Duplikation des rekombinanten Amylasegens, wobei die beiden Amylasegene in je einem Donorfragment gleicher Größe, invertiert und an gleichen Orten der beiden homologen Sequenzen des invertierten Repeats von pDB101 inseriert sind. Der Nachweis dieser Genduplikation führt zu der Schlußfolgerung, daß die durch pSB20 im Vergleich zu pSB17 kodierte zweifache Amylasebildung (s. o.) durch Gendosis-Effekt bedingt ist.

I.5. Entstehung der Genduplikation im pSB20

Die Identität der Duplikation in pSB20 ist dadurch erklärbar, daß solche Duplikationen unter Anwendung der „Puzzle-Methode“ und Nutzung eines Vektorplasmids mit invertiertem Repeat in zwei aufeinanderfolgenden Schritten entstehen: Primär wird durch Reklonierung ein Donorfragment in eine Sequenz des invertierten Repeats inseriert, sekundär wird dieses Insert spontan durch homologe Rekombination dupliziert. Neben der Identität der Duplikation in pSB20 ergeben sich dafür weitere Hinweise durch die Charakterisierung der hochexprimierenden, im Unterschied zu pSB20 aber instabilen rekombinanten Plasmide pSB18 und pSB19, die ebenfalls durch Reklonierung nach der „Puzzle-Methode“ erhalten wurden (s. I.3.). Nach Kultivierung von Plasmidtransformanten mit diesen instabilen rekombinanten Plasmiden lassen sich folgende Derivate nachweisen:

- mit stabilem, nicht rekombinantem Plasmid, nach Restriktionsanalyse identisch mit dem Vektorplasmid pDB101
- mit stabilem, rekombinantem Plasmid, identisch mit pSB20, also mit Duplikation des rekombinanten Amylasegens
- Plasmidfreie Segreganten.

Das gleiche Spektrum von Derivaten ist auch für eine repräsentative Anzahl von Transformanten nachweisbar, die durch Retransformation von pSB16 oder pSB18 bei niedriger Plasmidkonzentration (die eine Cotransformation von verschiedenen Plasmiden ausschließt) in andere Wirtsstämme von *B. subtilis*, u. a. auch in eine recE-Mutanten, erhalten werden. Diese Ergebnisse führen zu folgenden Schlußfolgerungen:

- Die beiden homologen Sequenzen des invertierten Repeats stabilisieren in unbekannter Weise das Vektorplasmid pDB101
- Durch Insertion in nur eine der beiden homologen Sequenzen wird ihre Homologie gestört und dadurch das Plasmid destabilisiert.

- Eine Restabilisierung des Plasmids ist durch Deletion oder aber identische Duplikation des störenden Inserts möglich, die durch *recE*-unabhängige interplasmidale oder intraplasmidale Rekombination erfolgt
- Das Entstehen von Plasmid-freien Derivaten kann auf die Segregation von instabilen Plasmiden (der Ausgangsplasmide pSB16 bzw. pSB18 oder von Derivaten, bei denen die Rekombination keine homologen Sequenzen des invertierten Repeats ergeben hat) zurückgeführt werden.

6. Ermittlung von geeigneten Wirtsstämmen für die praktische Nutzung von pSB17 und pSB20

Es werden solche *Bacillus*-Stämme als Wirtsstämme erprobt, die selbst eine hohe chromosomal kodierte Amylasebildung aufweisen und auch unter Fermentationsbedingungen eine hohe chromosomal und Plasmid-kodierte Amylasebildung erwarten lassen:

- *B. amyloliquefaciens* ATCC23844 (Donorstamm für die Primärklonierung, s. I.1.)
- *B. amyloliquefaciens* 10A4 (Herkunft: D. M. ELLIS, Columbus)
- *B. subtilis* ZF178, *B. subtilis* CM4: Hochleistungsstämme für chromosomal kodierte α -Amylase, entwickelt bzw. unter industriellen Bedingungen erprobt vom ITM Berlin.

In diese *Bacillus*-Stämme werden die rekombinanten Plasmide pSB17 und pSB20 nach der PEG-Protoplasten-Methode (CHANG, S., COHEN, S. N.: *Molec. gen. Genet.* **168**, 111–115, 1979) transformiert und pro Wirtsstamm wenigstens drei der so erhaltenen Plasmidtransformanten charakterisiert. Die Charakterisierung erfolgt zunächst in TBY-5% lösliche Stärke und ergibt, daß die getesteten Stämme in unterschiedlichem Maße als Wirtsstämme für eine praktische Nutzung von pSB17 und pSB20 geeignet sind. *B. subtilis* CM4 und *B. amyloliquefaciens* 10A4 werden von der weiteren Bearbeitung ausgeschlossen, da bei CM4 häufig Wirtszellderivate mit geringer Amylasebildung auftreten und bei 10A4 eine beträchtliche Plasmidinstabilität (bis 80% Plasmidverlust nach >30 Generationen) beobachtet wird. Besonders kritisch wird die Plasmidstabilität für den Wirts- und zugleich Donorstamm ATCC23844 untersucht, da die Homologie der chromosomalen Inserte von pSB17 und pSB20 mit dem bakteriellen Chromosom von ATCC23844 eine Destabilisierung der rekombinanten Plasmide erwarten läßt. Eine solche Destabilisierung wird widerlegt: Aus 12 Subkulturen von vereinzelt Kolonien, erhalten nach Langzeitkultivierung (>50 Generationen) in TBY-5% lösliche Stärke, kann in jedem Falle das Plasmid pSB20 in unveränderter Form reisoliert werden. Alle Plasmidpräparate ergeben im Vergleich zum Ausgangsplasmid gleiche Restriktase-Verdauungsmuster und bei Retransformation in Protoplasten von GSB26 wieder Plasmidtransformanten mit dem gleich hohen Niveau der Plasmid-kodierten Amylasebildung wie beim Ausgangsstamm GSB26 (pSB20). Zur Charakterisierung der Plasmid-kodierten Amylasebildung in Abhängigkeit vom Wirtsstamm werden bei Kultivierung in TBY-5% lösliche Stärke die Ergebnisse nach Abb. 4 erhalten:

- pSB17 und pSB20 exprimieren in ZF178 und ATCC23844 eine mehrfach höhere Amylasebildung als in GSB26
- Wie die chromosomal kodierte Amylasebildung erreicht auch die Plasmid-kodierte Amylasebildung in ATCC23844 ein bis zu 2fach höheres Niveau als in ZF178
- Im Vergleich zu pSB17 exprimiert pSB20 in ATCC23844 (ebenso wie in GSB26) ein annähernd 2faches Niveau der Amylasebildung, während diese unterschiedliche Expression in ZF178 nicht erfolgt.

Vergleichbare Ergebnisse zur Plasmid-kodierten Amylasebildung werden für den Wirtsstamm ATCC23844 auch in industriell genutzten Fermentermedien erhalten, wie in Abb. 5 am Beispiel des Fermentermediums FMM5 (1% Maisstärke; 1% Weizenfeinschrot; 1,25% Sojaschrot; 1,5% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0,075% KCl; 0,025% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 0,01% CaCl_2 ; 9% Stärkehydrolysat; 0,7% Lactose; 0,75% Harnstoff; Zusammensetzung nach Angaben des ITM Berlin) dargestellt. Die Amylasebildung der Plasmidtransformanten ATCC3844 (pSB17) und ATCC23844 (pSB20) übertrifft die Amylasebildung des Plasmidfreien Wirtsstammes etwa 2- bzw. 4fach. Daraus folgt, daß die Duplikation des rekombinanten Amylasegens in pSB20 auch bei Kultivierung in Fermentermedium einen entsprechenden Gen-Dosis-Effekt bedingt. Dieser Gen-Dosis-Effekt ist hier auf hohem Niveau der Amylasebildung (vgl. Abb. 5 u. Abb. 4) wirksam und gewinnt dadurch eine erhebliche ökonomische Bedeutung.

Die Plasmidtransformanten *B. amyloliquefaciens* ATCC23844 (pSB17) und ATCC23844 (pSB20) wurden am 21.9.84 im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der AdW der DDR, 6900 Jena, Beutenbergstr. 11, hinterlegt.

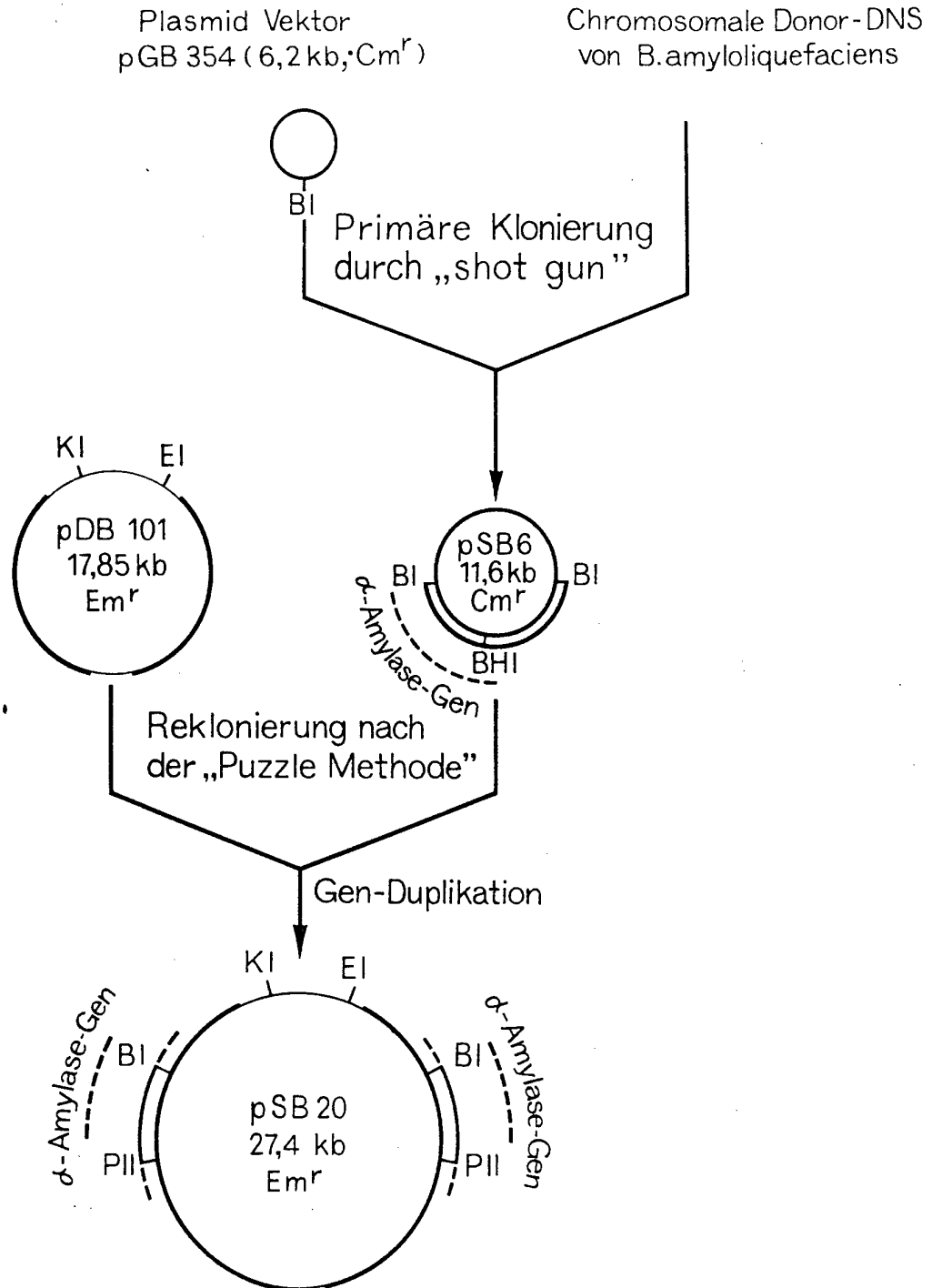


Abb. 1: Schema zur Klonierung des Gens für mesophile alpha-Amylase von *B. amyloliquefaciens* nach dem üblichen "shot gun"-Verfahren und zu seiner Reklonierung nach der erfindungsgemäßen "Puzzle-Methode" in das Vektorplasmid pDB101 mit invertiertem Repeat. Abkürzungen: kb = Kilobase; Cm^r = Chloramphenicol-Resistenz; Em^r = Erytromycin-Resistenz; BI = BclI; BHI = BamHI; EI = EcoRI; KI = KpnI; PII = PvuII

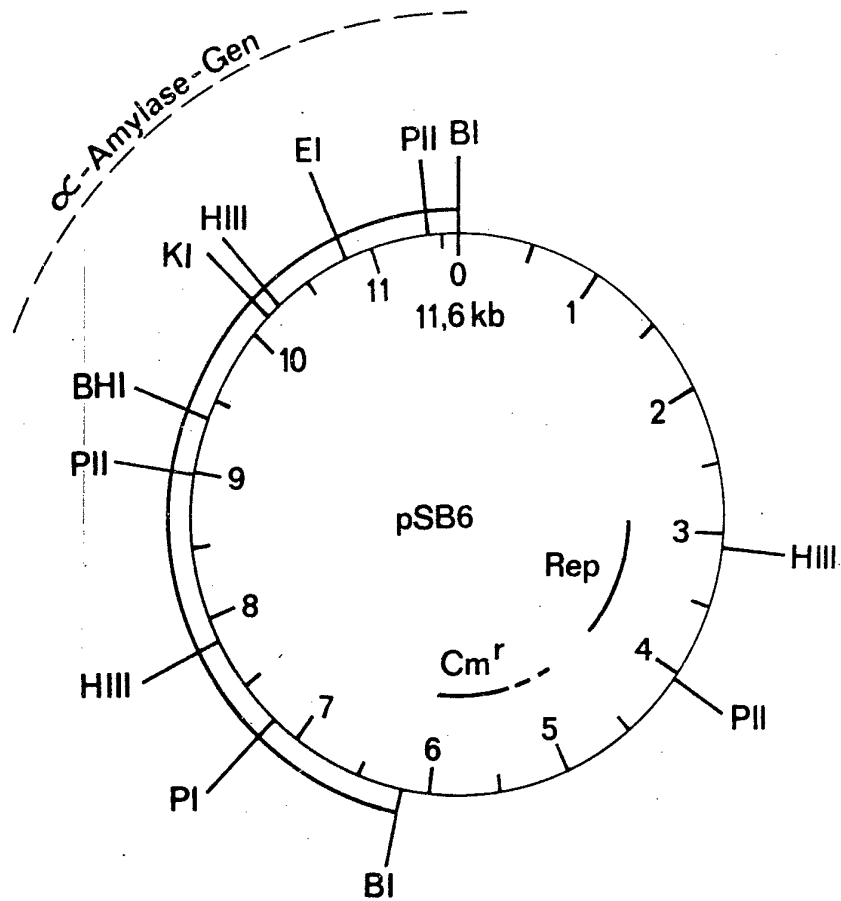


Abb. 2: Restriktionskarte für das durch Primärklonierung erhaltene instabile rekombinante Plasmid pSB6.

Abkürzungen: Rep = Replikationsregion; HIII = HindIII; PI = PstI; ansonsten wie in Abb. 1

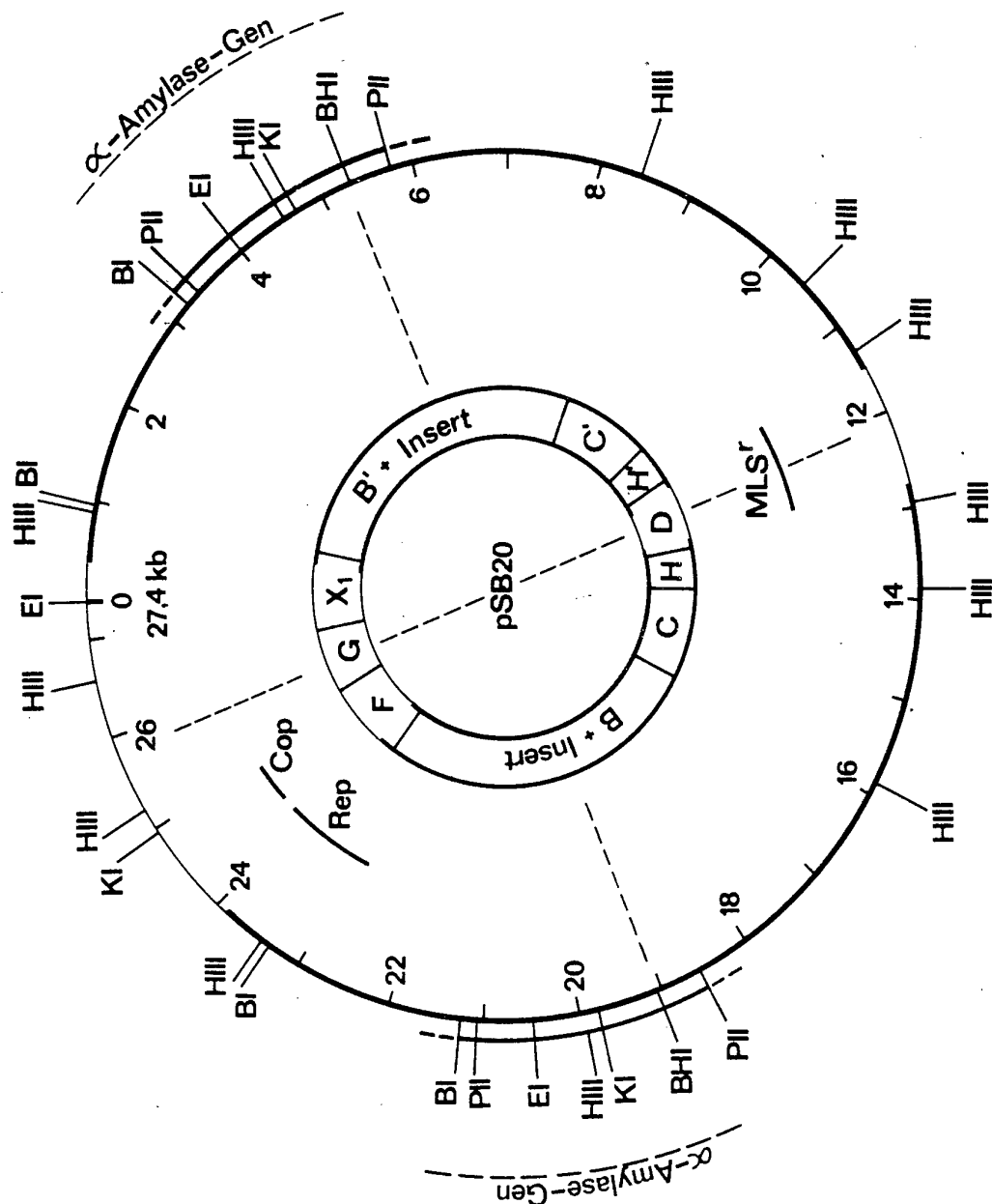


Abb. 3: Restriktionskarte für das durch Reklonierung nach der "Puzzle-Methode" erhaltene stabile rekombinante Plasmid pSB20 mit Duplikation des rekombinanten Amylasegens.

Abkürzungen: B+Insert, B'+Insert, C,C', D, H, H', F, G, X₁ = HindIII-Fragmente; MLS^r = Resistenz gegen Makrolide, Linkomycine, Streptogramin B; Cop = Kontrollregion für die Kopienzahl; ansonsten wie in Abb. 1 u. Abb. 2

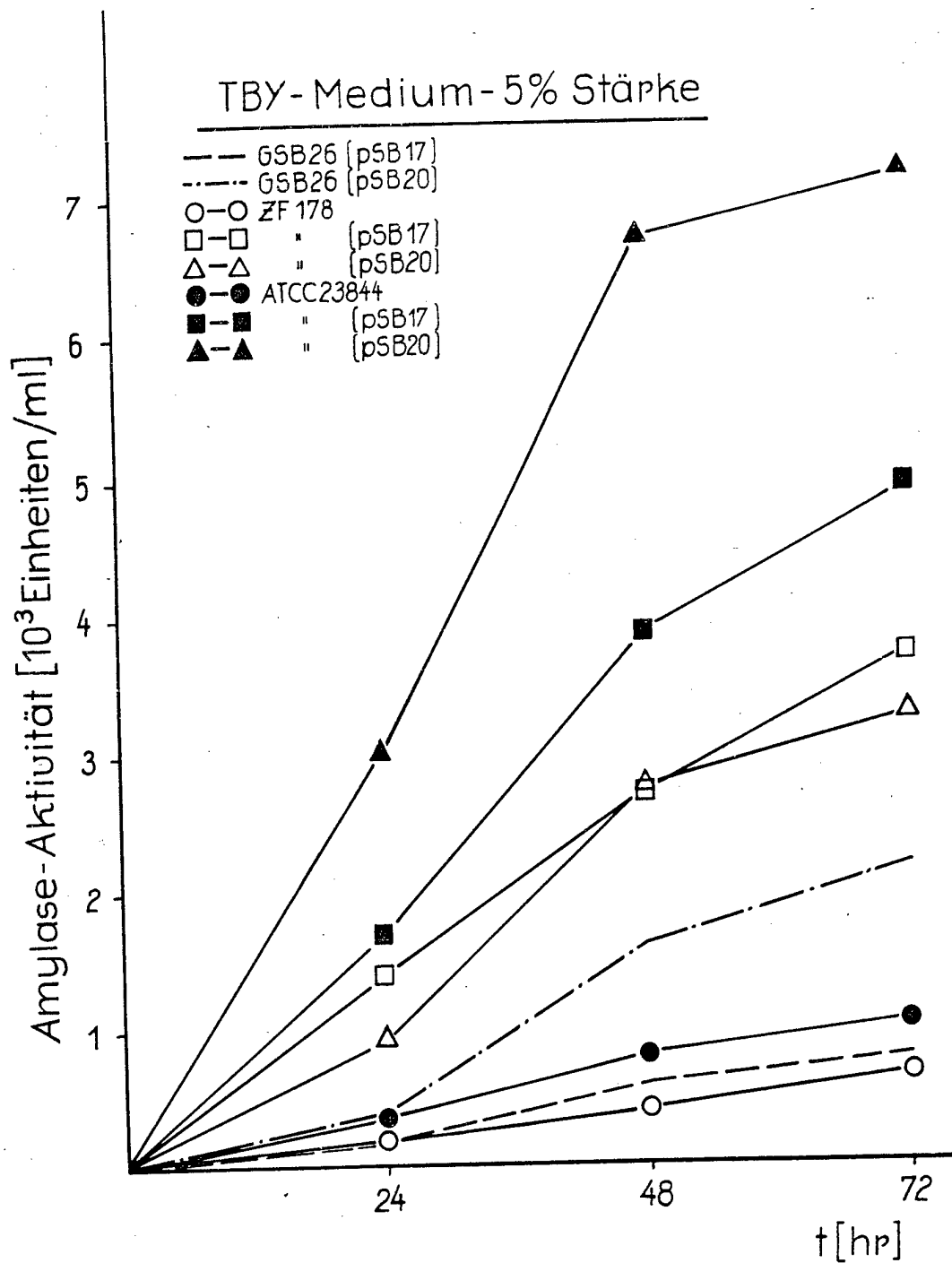


Abb. 4: Amylasebildung durch pSB17- und pSB20-Plasmidtransformanten im Vergleich zum Wirtsstamm ZF178 sowie zum Wirts- und Donorstamm ATCC23844. Schüttelkulturen in TBY - 5 % lösliche Stärke bei 37° C

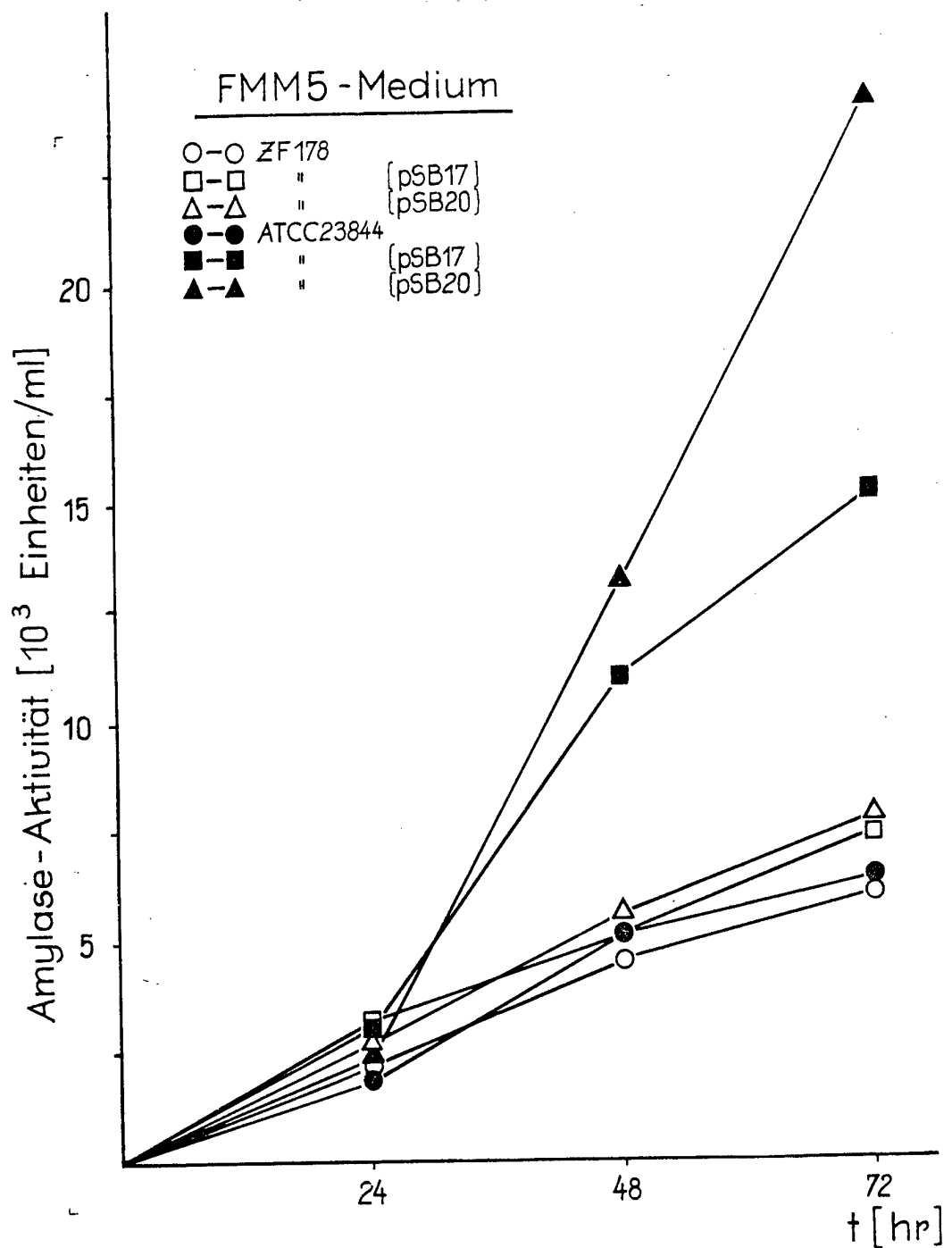


Abb. 5: Amylasebildung durch pSB17- und pSB20-Plasmidtransformanten im Vergleich zum Wirtsstamm ZF178 sowie zum Wirts- und Donorstamm ATCC23844. Schüttelkulturen im Fermentermedium FMM5 bei 30°