(19) Országkód:

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

214 244 B

(21) A bejelentés ügyszáma: 4104/89
(22) A bejelentés napja: 1989. 08. 10.
(30) Elsőbbségi adatok:
88201714.8 1988. 08. 11. EP
89201044.8 1989. 04. 21. EP

(51) Int. Cl.[6]

C 12 N 15/67
C 12 N 15/52
C 12 N 15/80
C 12 P 37/00
C 12 N 1/15

40) A közzététel napja: 1990. 04. 30.
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 1998. 03. 02.

(72) Feltalálók:
Alvarez, Emilio, Sevilla (ES)
Barredo, José Luis, Trespaderne/Burgos (ES)
Diez, Bruno, San Sebastian (ES)
Esmahan, Christina, Bilbao (ES)
Groenen, Martinus Antonius Mathilda, Zetten (NL)
Gutierrez, Santiago, Leon (ES)
Koekman, Bertus Pieter, Schipluiden (NL)
Martin, Juan Francisco, Leon (ES)
van Solingen, Pieter, Naaldwijk (NL)
Veenstra, Annemarie Eveline, Nieuw Venepep (NL)
van der Voort, Lucia Helena Maria, Delft (NL)

(73) Szabadalmas:
Gist-Brocades N.V., Delft (NL)

(74) Képviselő:
S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi Iroda, Budapest

(54) Eljárás másodlagos metabolitok termelésének fokozására bioszintetikus géncsoporttal

(57) KIVONAT

Csoportosított antibiotikum bioszintetikus géneket alkalmaznak mikroorganizmusokban az antibiotikum termelésének javítására és más olyan gének izolálására, amelyek az antibiotikum bioszintézisében résztvesznek. A találmányban példaként írják le a penicillintermelés javulását a Penicillium chrysogenumban, továbbá más csoportosított bioszintetikus gének izolálását és a penicillin bioszintetikus gének expresszióját Acremonium chrysogenumban.

HU 214 244 B

A leírás terjedelme: 27 oldal (ezen belül 11 lap ábra)

A találmány bioszintetikus géncsoportok izolálására vonatkozik és felhasználásukra másodlagos metabolitok termelésénél.

A klasszikus törzsfejlesztő eljárások eredményeként az utóbbi négy évtizedben rendkívül megnövekedett a penicillintermelés. E klasszikus törzsfejlesztő eljárások elsősorban a Penicillium chrysogenum rendszertelen mutagén kezelésén, s ezután a több penicillint termelő mutánsok kiválasztásán alapultak. A klónozó technikák kifejlesztése azonban egy potenciálisan új eszközzel járult ahhoz, hogy e gombában a penicillin termelését tovább javítsuk.

A penicillint a P. chrysogenum fonalas gomba termeli, néhány enzimatikus lépésen keresztül [például: E. Alvarez és mtsai, Antimicrob. Agents Chemother. m. *31*, 1675–1682 (1987)]. Ezeket a lépéseket az 1. ábra mutatja be. A szabadalmi leírásban végig azokról a génekről van szó, amelyek közvetlenül résztvesznek a bioszintetikus folyamatban, tehát olyan génekről, amelyek egy másodlagos metabolit képződéséhez vezető több lépéses folyamatban az aktív enzimeket kódolják, tehát a penicillin G vagy V termelése esetében az 1. ábrán bemutatott enzimeket kódoló génekről van szó. Az első reakció a δ-(L-α-aminoadipil)-L-ciszteinil-D-valin tripeptid képződése α-amino-adipinsavból, ciszteinből és valinból. A reakcióért felelős enzim az ACV szintetáz (a továbbiakban ACVS), amely egy nagymolekulájú, többfunkciós enzim. A tripeptid gyűrűbe zárását az izopenicillin N szintetáz (a továbbiakban IPNS) vagy cikláz végzi. A reakciótermék az izopenicillin N. Ez egy olyan vegyület, amely a tipikus gyűrűs ß-laktám szerkezetet tartalmazza és antibakteriális hatást fejt ki. A penicillin képződésének utolsó lépésében az izopenicillin N α-amino-adipinsav oldallánca hidrofób oldalláncra cserélődik ki. Az ipari termelésben az általánosan használt hidrofób oldallánc vagy a fenil--ecetsav, ennek eredménye a penicillin G. vagy a fenoxiecetsav, melynek eredménye a penicillin V. Felvetették, hogy az oldallánc kicserélődési reakciót egyetlen enzim katalizálja [A.L. Demain és N. A. Solomon (szerkesztők): Antibiotics containing the ß-lactam structure I. Springer Verlag, Berlin (1983); A.L. Demain közlése a 189–228. oldalon]. Mindazonáltal a kétlépéses reakció lehetősége is fennáll, melynek közti terméke a 6-APA (E. Alvarez és mtsai, lásd fent). A végső reakcióban résztvevő enzimet, az acilkoA:6-APA aciltranszferázt (a továbbiakban AT) azonosították és homogenitásig tisztították (E. Alvarez és mtsai, lásd fent). Egy második olyan enzim részvételét, amely az IPN-6-APA reakciót katalizálná, eddig sem meg nem erősítették, de nem is zárták ki.

Nem tisztázott, hogy egy vagy több enzimreakciónak van sebesség korlátozó hatása a penicillin bioszintézisének folyamatában, s ha van ilyen hatás, melyik enzimatikus folyamat vesz részt ebben.

Minthogy a penicillin bioszintézisének folyamata három aminosavval kezdődik, amelyek mindegyike egyébként más anyagcsere-folyamatok részét képezi, úgy ezeknek a folyamatoknak a szabályozó lépései szintén befolyásolhatják a penicillin bioszintézisét. Másrészt, a penicillintermelés alá van vetve a szén katabolizmus repressziójából és a nitrogénforrás szabályozásából álló komplex mechanizmusnak [H. Glainkauf, H. von Döhren, H. Donnauer és G. Nesemann (szerkesztők): Regulation of secondary metabolite formation. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1985);] J.F. Martin és mtsai közlése a 41–75. oldalon]. Szabályozó proteinek szintén szerepelnek az ilyen típusú szabályozásban. Megállapították, hogy ezek a szabályozó proteinek és az általuk szabályozott proteinek közvetve résztvesznek egy másodlagos metabolit, ebben az esetben a penicillin, bioszintetikus folyamatában.

A penicillin G bioszintézisében résztvevő enzimek közül mostanáig csak egy enzimnek, az izopenicillin N szintetáznak (IPNS) vagy cikláznak a génjét klónozták és szekvenálták [L.G. Carr és mtsai, Glene, *48*, 257–266 (1986).], a megfelelő Acremonium chrysogenum gén felhasználásával. CS.M. Samson és mtsai, Nature, 318, 191–194 (1985)]. Ez utóbbi gént klónozták és azonosították oly módon, hogy az IPNS proteint tisztították, meghatározták amino-terminális aminosav szekvenciáját, előállítottak e szekvencia alapján egy szintetikus oligodezoxinukleotidokból álló készletet és egy kozmid genomiális gyűjteményt szondáztak ezen oligodezoxinukleotidok keverékével (S.M. Samson, lásd fent).

Mind a Penicillium chrysogenumból, mind az Acremonium chrysogenumból izolálták az IPNS-t kódoló gént és ezeket használták fel törzsjavításhoz. A Penicillium chrysogenumban fokozott enzim aktivitást mutattak ki, azonban nem észleltek stimulációt a penicillin bioszintézisében [P.L. Skatrud és mtsai: poszter bemutatás a Society of Industrial Microbiology 1987. évi összejövetelén (Baltimore, 1987 augusztus); kivonatát közölte a SIM News (37. kötet, 77. old. 1987)]. Az Acremonium chrysogenumban hasonló eredményeket kaptak LG.Pierce (szerk.), Society of Industrial Microbiology, Developments in Industrial Microbiology, 27. kötet (1987), ebben J. L. Chapman és mtsai közlése; S.W.Queener, 4. ASM konferencia az „Ipari mikroorganizmusok genetikája és molekuláris biológiája" tárgykörben. Bloomington, 1988. október, az összefoglaló 1989-ben jelenik meg].

Tehát mostanig nem bizonyították, hogy az IPNS gént a penicillin vagy cephalosporin termelésének növelésére lehetne felhasználni, génsokszorozás révén.

Kimutatták, hogy a ß-laktám antibiotikumok bioszintézise glükóz repressziónak van alárendelve [J. F. Martin és P. Liras, TIBS, *3*, 39–44 (1985)]. A glükóz okozta represszió kétségtelenül az ACVS hatására bekövetkező tripeptid képződés és az IPNS aktivitás érdekében történik [Revilla és mtsai, J. Bact., 168, 947–952 (1986)]. Másrészt, ami az aciltranszferázt illeti, az adatok kevésbé meggyőzőek: Revilla és mtsai (lásd fentebb) közölték, hogy az AT nincs alávetve glükóz repressziónak, de más adatok alapján feltételezhető, hogy glükóz jelenlétében az AT-nak nincs, vagy legalábbis csökkent az aktivitása [B. Spencer és T. Maung, Proc. Biochem. Soc., 29–30. old. (1970)].

Nem ismert, hogy a glükóz okozta represszió az expresszió mely fokozatánál fejti ki hatását; ez a hatás vagy a transzkripció vagy a transzláció szintjén jelenhet

meg. Ha az előbbi szabályozás érvényes, úgy a termelő és nemtermelő tenyészetek közti mRNS szintkülönbségeket fel lehetne használni a penicillin bioszintézisében résztvevő gének izolálásánál. A másodlagos metabolitok bioszintézisében résztvevő gének izolálására szolgáló eljárás a tárgya a szintén intézés alatt álló „Eljárás bioszintetikus vagy regulátor gének izolálására és felhasználásuk másodlagos metabolitok termelésének fokozására" című szabadalmi bejelentésünknek, amelyet ugyanazon napon nyújtottunk be, mint a jelen bejelentést és amely ebben a bejelentésben referenciaként szerepel.

Az antibiotikus bioszintetikus gének csoportba rendezését a Streptomycetes nembéli mikroorganizmusokra írták le. A következő néhány példát említjük: a S. coelicolorban az actinorhodin bioszintézisében [F. Malpartida és D.A.Hopwood, Nature, *309*, 462–464 (1984)] vagy a S.glaucescensben a tetracenomycin C bioszintézisében [H. Motamedi és C.R. Hutchinson, Proc. Natl. Acad. Sci., *84*, 4445–4449 (1987)] résztvevő gének csoportba rendezése.

Gombák esetében a ß-laktám bioszintetikus gének gén szerkezetét olyan mutánsok genetikai analízisével vizsgálták, amelyekben csökkent volt a penicillin bioszintézise. Az Aspergillus nidulansban 4 olyan lokuszt azonosítottak, amelyek a penicillin bioszintézisében szerepet játszanak (npe A, B, C és D); ezek a lokuszok négy különböző lánccsoporton (azaz kromoszómán) helyezkednek el, úgymint a, VI, IV, III, illetve II láncon [J.F.Makins és mtsai, Advances in Biotechnology, *3*, 51–60 (1980); J.F. Makins és mtsai, J. of General Microbiology, 129, 3027–3033 (1983)]. A Penicillium chrysogenumban öt lokuszt azonosítottak (npe V, W, X, Y, Z), s ezek a lokuszok három lánccsoporton, az I-en (npe W, Y, Z) és két másikon helyezkednek el, melyek az npe V, illetve npe X lokuszt tartalmazzák [P.J.M. Normansell és mtsai, J. of General Microbiology, *112*, 113–125 (1979); J.F. Makins és mtsai, 1980, lásd fent]. Azok a mutációk, amelyek a gyűrűbe záró enzimre (IPNS vagy cikláz; npe W) és az oldallánccserét katalizáló enzimre (aciltranszferáz; npe V) vannak hatással, külön lánccsoporton helyezkednek el. Tehát a genetikai adatokból előreláthatő, hogy legalábbis bizonyos penicillin bioszintetikus gének szét vannak szórva a gomba genomja mentén és például a cikláz és aciltranszferáz géncsoportba rendezése bizonyosan nem várható el ezen adatok alapján.

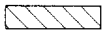
A találmány a csoportba rendezett antibiotikus bioszintetikus génekre vonatkozik, amelyek előnyösen alkalmazhatók mikroorganizmusokban az antibiotikum-termelés javítására és más olyan gének izolálására, amelyek az antibiotikum bioszintézisében résztvesznek. A találmányt a Penicillium chrysogenumban megnövelt penicillin-termeléssel példázzuk, továbbá más csoportba rendezett bioszintetikus gén(ek) izolálásával és a csoportos penicillin bioszintetikus géneknek az A cremonium chrysogenumban való kifejeződésével.

Az alábbiakban az ábrák rövid leírása következik.

Az 1. ábra a penicillin G-nek vagy V-nek a P. chrysogenumban végbemenő bioszintetikus folyamatát mutatja be sematikusan.

A 2. ábrán az (IPNS plusz AT) géncsoportot tartalmazó G2 és 821 lambda klón fizikai térképe látható.

E=EcoRI; B=BamHI; C=ClaI; H=HindIII; K=KnpI; S=SalI; Sa=SacI; Sp=SphI; P=PstI; X=XhoI; Xb=XbaI; Hp=HpaI; N=NcoI; Bg=BglII.

 = az EMBL3 lambda bakteriofág jobb karja (9 kb)

 = az EMBL3 lambda bakteriofág bal karja (20,3 kb)

A 3. ábra a P. chrysogenum aciltranszferáz génje nukleotid szekvenciáját és az. ebből levezetett aminosav szekvenciát mutatja be.

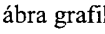
A 4. ábra a pPS07 klónozó kozmid vektor restrikciós és funkcionális térképét mutatja be.

Az 5. ábra a pPS47 restrikciós és funkcionális térképét mutatja be.

A 6. ábra a pGJ01 A és B restrikciós és funkcionális térképét mutatja be.

A 7. ábra a pGJ02 A és B restrikciós és funkcionális térképét mutatja be.

A 8. ábra a HM193 kozmid restrikciós és funkcionális térképét mutatja be (a térképen nem minden helyet jelöltünk be, a szaggatott vonal a kevésbé jól jellemzett szakaszt jelzi).

A 9. ábra grafikusan ábrázolja a pPS47-el () és a pGJ02 A-vel () transzformált gazdasejtek penicillin termelését.

A jelen találmány szerint olyan DNS fragmentumokat azonosítunk, amelyek mono- vagy, policisztronos szekvenciákat tartalmaznak. A gének által kódolt szekvenciák olyan enzimekre fordítódnak át, amelyek másodlagos metabolitok termelésével vagy kereskedelmileg fontos más termékekkel vannak kapcsolatban. A számunkra fontos szekvenciák azonosítását a másodlagos metabolitot termelő kompetens mikroorganizmusból izolált DNS szekvenciák összehasonlításával végezzük: azaz annak a mikroorganizmusnak a DNS szekvenciáit, ahol a szóban forgó gének aktívan kifejeződnek, összehasonlítjuk annak a mikroorganizmusnak a DNS szekvenciáival, ahol az expresszió csendes. Így tehát egy vagy több olyan gént kódoló DNS fragmentumhoz jutunk amelyek eltérő módon fejeződnek ki és amelyek egy kereskedelmi szempontból fontos termék előállításában vesznek részt. E bejelentésben az eltérő módon történő expresszió meghatározást a szóban forgó gén (gének) kifejeződésére akkor használjuk, ha a kifejeződés kimondottan csak bizonyos meghatározott körülmények között aktív, ugyanakkor más, ugyancsak jól meghatározott körülmények között elmarad (vagyis ebben a leírásban ezalatt azt értjük, hogy a kifejeződés alacsony szintű, például 5%-os vagy ennél kisebb az aktív fokozathoz képest).

Az expresszió elmaradását represszió vagy a génexpresszió indukciójának a hiánya vagy mutáció vagy más olyan esemény okozhatja, amely a szóban forgó gén (gének) transzkripciójának csendes voltát eredményezi. Az izolált DNS-hez úgy jutunk, hogy egy géngyűjteményt szűrünk. A gyűjtemény olyan genomiális vagy cDNS gyűjtemény lehet, amelyet például lambda vagy kozmid klónozó vektor vagy expressziós vektor tartalmaz. Másodlagos metabolitok bioszintézise folyamán

kifejeződő szekvenciákban gazdag cDNS szonda felhasználásával pozitív hibrideket azonosíthatunk a gyűjteményben a további manipulációkhoz, hogy ennek révén a másodlagos metabolit termelésével kapcsolatos enzim(ek) céljára expressziós szerkezeteket szerkesszünk. Ennélfogva egy mikroorganizmusból származó géngyűjteményt két cDNS szonda használatával szűrünk, ezek közül az egyik a transzkripciót illetően aktív szekvenciákban gazdag és a második a transzkripció szempontjából csendes szituációból származik. Csak olyan klónok izolálhatók összehasonlítás és szubtrakció révén, amelyek a meghatározott aktív körülmények mellett aktívan kifejeződő gént (géneket) tartalmazzák.

Ezt az eljárást másodlagos metabolit, pontosabban a penicillin bioszintézisében résztvevő gének izolálásával példázzuk, amikor is laktózzal növekedő (termelő) és glükózzal növekedő (nemtermelő) micéliumból származó két cDNS szondát használunk.

Meglepő, hogy az említett módszer alkalmazásával ciklázt és aciltranszferázt kódoló csoportos penicillin bioszintetikus géneket izoláltunk a P. chrysogenumból (vö. a már benyújtott bejelentéssel; lásd fent). Ez az információ előnyösen alkalmazható arra, hogy az említett antibiotikus bioszintetikus folyamatból más géneket izoláljunk e szakterület ismert kromoszóma-séta technika alkalmazásával. Ez utóbbi módszert különösen olyan esetekben alkalmazhatjuk, amikor a szóban forgó gének nem eltérő módon fejeződnek ki, amikor a gén által kódolt enzim ellenáll a tisztításnak, ami a „reverz genetika" („reversed genetics") nevű módszerrel történő génizoláláshoz szükséges, vagy amikor a gének izolálására szolgáló, ezen szakterület más ismert módszereivel nem jutunk az illető génhez.

A csoportosítást (clustering) ebben a bejelentésben akkor használjuk, amikor két vagy több rokon funkciójú (például részvétel egy másodlagos metabolit bioszintetikus folyamatban) gén van jelen egy olyan DNS fragmentumon, amely kozmid klónozó vektorba klónozható és köztük más nem rokon gének nincsenek.

Az említett csoport a természetes szituációt is reprezentálhatja, vagy a találmány egy más szempontja szerint, két vagy több gén mesterségesen kombinált csoportját bevezethetjük egy DNS fragmentumba a szakterület ismert technikáit használva.

A penicillin bioszintetikus géncsoportok használatának más penicillin bioszintetikus gének izolálására történő eredményes alkalmazását ez a bejelentés az ACV szintetáz kódoló gén kromoszóma-séta technikával való izolálásának a példáján mutatja be.

Ezenkívül a penicillin bioszintetikus gének csoportosítását eredményesen használjuk mind a cikláz, mind az aciltranszferáz génnek a P. chrysogenumban való sokszorozására, ami a penicillin megemelkedett termelését eredményezi.

Az azonosított DNS szekvenciák legalább egy, előnyösen kettő vagy több olyan gént tartalmaznak, amelyek egy antibiotikum bioszintetikus enzimet kódolnak és/vagy a teljes bioszintetizáló folyamatban egy szabályozó proteint vagy általánosabban bármilyen olyan proteint kódolnak, amelyek bármilyen módon, akár pozitív, akár negatív módon, az említett antibiotikum bioszintézisében résztvesznek.

Ha a pozitíven működő szerkezeteket megfelelő módon vezetjük be alkalmas gazda mikroorganizmusba, ezek – főként a ß-laktám termelő mikroorganizmusokban – döntően megnövelik a bioszintetikus folyamat hatékonyságát a gén megnövelt mennyisége vagy a magasabb szintű génexpresszió révén. Izolálhatunk másrészt olyan szerkezeteket, amelyeknek negatív hatásuk van az antibiotikum termelésére (például melléktermékek képződnek). Ezeket a szerkezeteket arra használjuk, hogy génhelyettesítés vagy más, hasonlóan hatásos módon inaktiváljuk a negatívan működő gént. A kívánt antibiotikum kitermelése mindkét esetben magasabb lesz az ipari termelés folyamán. Ezt az eljárást ß-laktám termelő mikroorganizmusokon mutatjuk be. Az eljárás ß-laktám termelő mikroorganizmusok esetében nyer különleges alkalmazást antibiotikumok, főként penicillinek, termelése céljára. Előnyös, ha az expressziós kazetta olyan enzimeket kódoló géneket tartalmaz, amelyek sebességkorlátozó lépéseket katalizálnak vagy olyan géneket, amelyek transzkripciót indukáló regulátor proteineket kódolnak vagy egyebeket.

A találmány tárgyát képező eljárás ezenkívül olyan szekvenciákkal is szolgál, amelyeknél bár nem ismerjük az általuk kódolt terméket, de úgy találtuk, hogy a kívánt termék fokozott termelését eredményezi. Ezeket a szekvenciákat „kriptikus gének"-nek nevezzük, azaz olyan szekvenciák ezek, amelyeket az itt leírt izolálási eljárásokkal kapunk meg és ezek a szekvenciák olyan géneket tartalmaznak, amelyeknek ismert funkció még nem tulajdonítható. Ezekre a génekre az jellemző, hogy a transzformált mikroorganizmusban nagyobb mennyiségben fordulnak elő és/vagy fejeződnek ki, összehasonlítva a transzformálatlan gazdasejttel. A már benyújtott szabadalmi bejelentésünkben (lásd fent) szereplő „kriptikus gének"-en és az IPNS-en és aciltranszferázon kívül a jelen találmány a penicillin, cephalosporin és cephamycin bioszintetikus utjának első enzimét, a δ-(L-α-amino-adipil)-L--ciszteinil-D-valin szintetázt – a továbbiakban ACVS – kódoló gént is szolgáltatja.

Az említett benyújtott bejelentésben az „Y" nevű kriptikus génről megállapítottuk, hogy fokozza a penicillin bioszintézisét. A jelen találmány tárgyát az képezi, hogy az lPNS plusz AT géncsoport sokszorozása révén növeli a penicillintermelést.

A jelen találmányban felhasznált mikroorganizmusok prokarióták is és eukarióták is lehetnek, például az Actinomycetes vagy Flavobacterium taxonómiai csoportba tartozó baktériumok, vagy gombák – beleértve az élesztőket – amelyek az Aspergillus, Acremonium vagy Penicillium nemzetséghez tartoznak.

A fragmentum eredetétől függően, akár genomiális vagy cDNS, akár prokarióta vagy eukarióta eredetű, különböző expressziós kazettákat szerkeszthetünk. Baktériumból származó genomiális DNS-nél a mono- és policisztron szerkezetű kódoló szakasz a saját transzkripciót indító szabályozó szakaszt tartalmazhatja, valamint egy transzkripciót leállító szakaszt és megfelelő transz-

lációs szignálokat – például a Shine-Dalgarno szekvenciát – és stop kodonokat. Amikor a genomiális DNS gomba eredetű, rendszerint csak egyetlen gén lesz kapcsolatban egy transzkripciót indító szabályozó szakasszal, így tehát minden génnek saját független transzkripciót indító szabályozó szakasza lesz. Amikor cDNS-t alkalmazunk, gondoskodnunk kell egy megfelelő transzkripciót indító szabályozó szakaszról a későbbi expresszióhoz használt gazdaszervezettől függően.

A szóban forgó géneket véletlenszerűen kaphatjuk meg egy nagy hozamú β-laktám termelő törzs vagy vad-típusú őse géngyűjteményéből (például egy genomiális vagy cDNS gyűjteményből), vagy a gyűjtemény egy olyan alcsoportjából választhatjuk ki, amely az antibiotikum bioszintézisének sebességét korlátozó géneket tartalmaz. Különösen értékes gének azok, amelyek kifejezetten az antibiotkus bioszintézis folyamán fejeződnek ki, ilyenek az ezen szakterületen ismert ß-laktám bioszintetikus enzimeket kódoló gének, például a tripeptid szintetáz (ACVS), a cikláz (IPNS), az aciltranszferáz (AT), az epimeráz, expandáz, hidroxiláz, transzacetiláz, transzkarbomoiláz, metoxiláz. Előnyös, ha mind az izopenicillin N szintetázt, mind az aciltranszferázt kódoló gén nagyobb számban van jelen vagy nagyobb mennyiségben fejeződik ki, ami a transzformált gombában a kívánt antibiotikum magasabb kitermelését eredményezi.

A szakemberek méltányolni fogják, hogy egy ß-laktám termelő gazdasejtben a kifejezendő gének vagy saját natív promoter szekvenciájukat hordozzák, amelyet a gazdasejt RNS polimeráza felismer, vagy hozzá vannak kapcsolva bármilyen más alkalmas promoterhez, például egy másik ß-laktám bioszintetikus gén vagy egy glükolitikus gén – mint a foszfoglicerát kináz, glicer-aldehid-foszfát dehidrogenáz, trióz foszfát izomeráz – promoteréhez, vagy az EF-T transzlációs elongációs faktor promoteréhez és így tovább.

Egy ilyen promotert fel lehet használni arra, hogy az említett enzimeket termelő egy vagy több gén kifejeződésének a szabályozását befolyásolja. Ez oda vezet, hogy transzformálás után az antibiotikum-termelés megnövekszik, mivel penicillin-termelés most már olyan körülmények mellett is lehetséges, amelyek a nem transzformált gazda-törzsnél nem teszik lehetővé a penicillin termelését. Például a glükolitikus enzimek glükóz jelenlétében kifejeződnek, míg a penicillin-termelés glükóz jelenlétében elmarad (J.F. Martin, lásd fent). Azzal, hogy a penicillin bioszintetikus géneket egy glükolitikus gén promoterének szabályozása alatt kifejeződésre késztetjük, a gének glükóz jelenlétében is kifejeződnek, s így penicillin termelődhet a fermentáció korai szakaszában is, amikor a szükséges mennyiségű micélium képződéshez magas koncentrációban van szükség glükózra. Egy ilyen promoter szabályozása alá helyezhető a szelekciós marker is.

A Penicillium transzformálásához olyan szerkezeteket használunk, amelyek a transzformált sejtek számára legalább egy szelekciós markert tartalmaznak és előnyös, ha fokozzák az integrálódott DNS fenttartását. Ennélfogva előnyös, ha a vektor egy olyan DNS szekvenciát tartalmaz, amelyről tudjuk, hogy a transzformálás eredményességét fokozza. Egy ilyen DNS például az „ans" elem, amelyet az Aspergillus nidulans-ból izoláltak [Ballance és Turner, Gene, 36, 321–331 (1985)]. Az ugyancsak benyújtott szabadalmi bejelentésünk (lásd fent) egy olyan DNS szekvenciát szolgáltat, amelyet a P. chrysogenum genomjából izoláltunk és amelyről megállapítottuk, hogy szekvenciájának hatása hasonló az „ans" szekvenciáéhoz. Minthogy ez a szekvencia a P. chrysogenum természetes szekvenciája, fel lehet használni P. chrysogenumban a transzformálás hatékonyságának növelésére. A DNS szekvenciában benne van a P. chrysogenum pyrG génje, amelyet akár magában, akár a gazda-pyrG-vel kombinálva használhatunk, s ebben az esetben a szóban forgó DNS szekvencia mind a transzformált sejtek szelekcióját, mind a transzformációt fokozó hatást (EP-A-260762) biztosítja vagy használhatjuk egy más szelekciós markerrel kombinálva, például egy biociddal – ilyen például a phleomycin – szembeni rezisztenciát kódoló génnel kombinálva. Ez utóbbi esetben a transzformált sejtek szelekcióját és a transzformációt fokozó hatást két külön DNS szekvencia biztosítja és a pyrG elem egyetlen funkciója a transzformáció frekvenciájának a fokozása.

Hasznos markerei lehetnek a transzformált klónok szelekciójának az olyan homológ vagy heterológ bioszintetikus gének, amelyek a gazdasejt egy auxotróf szükségletét képesek kiegészíteni, amit egy aminosavhoz – például az argininhez – vagy egy nukleotid prekurzorhoz – például az uracilhoz – vezető anyagcserefolyamatban fennálló hiba idéz elő.

A szelekcióhoz szükséges markert biztosító strukturális gén vagy a vad-típusú Penicillium gazdasejt saját génje, vagy egy olyan heterológ strukturális gén lehet, amely a gazdasejtben működőképes. Például, az anyagcsere-folyamatban résztvevő egy enzimet kódoló strukturális gén származhat a Penicilliumból vagy más fonalas gombából, ilyenek például az Aspergillus, Neurospóra vagy élesztőkből, ha strukturális génjük a Penicillium gazdasejtben működőképes és az auxotrófiát prototrófiává változtatja.

A kiegészítő strukturális gén származhat anyagcserefolyamatból, ilyen például a purinok vagy pirimidinek (nukleozidok) vagy aminosavak szintézise. Különösen fontosak a pirimidin anyagcsere enzimeit kódoló strukturális gének, például az orotidin-5'-foszfát-dekarboxiláz enzimet kódoló gén (pyrG vagy pyr4). Fontos gének még az aminosav bioszintetikus gének, például az ornitin--karbomoil transzferáz (argB) és az arginin-szukcinát liáz (arg4) gén. A fent említett szelekciós markereket az EP-A-260762 számú európai szabadalmi bejelentés tárgyalja.

Auxotróf markerek helyett fermentációs markerek is használhatók. Például amikor a szén és nitrogén egyedüli forrásaként amidokat használunk, vagy amikor a növekedéshez különböző cukrok, például galaktóz vagy hasonlók szükségesek.

Ezenkívül biocid rezisztenciát kódoló géneket is használhatunk. Ilyen biocidek például a higromicin, gentamicin, fleomicin, glifozát, bialafosz stb.

A találmány tárgyát olyan szerkezetek képezik, amelyek a kívánt szekvenciát tartalmazzák, de más funkciókat is tartalmazhatnak, így replikációs rendszereket egy vagy több gazdasejt számára, például klónozó gazdasejtek és/vagy másodlagos metabolit kifejeződésére szolgáló célgazdasejt számára; tartalmazhatnak egy vagy több szelekciós markert egy vagy több gazdasejt számára – mint fent említettük –; géneket, amelyek a transzformálás eredményességét fokozzák; vagy más speciális funkciókat.

A szerkezet legalább egy gént tartalmaz, előnyösen azonban kettő vagy több gént. A szerkezetet előállíthatjuk hagyományos módon, az egyéb kívánt géneknek a megfelelő gazdasejtekből való izolálásával vagy ezen eljárások kombinációjával. Ugyanígy, a szabályozó szignálokat, a transzkripciót és transzlációt indító és leállító szakaszokat izolálhatjuk természetes forrásból, vagy szintetizálhatjuk ezeket a szakaszokat vagy kombinálhatjuk e módszereket. A különböző fragmentumokat a következőképpen kezelhetjük: emésztés endonukleázokkal (restrikció), ligálás, szekvenálás, in vitro mutagenezis, primer repair, vagy hasonlók. A különböző manipulációk jól ismertek a szakirodalomból és ezek speciális célok elérésére alkalmazhatók.

A különböző fragmentumok hagyományos módszerek szerint kombinálhatók, klónozhatók, izolálhatók és szekvenálhatók. Az egyes manipulációk után a DNS fragmentumot vagy a fragmentumok kombinációit klónozó vektorba építjük be, a vektorral klónozó gazdasejtet, például E. coli sejtet transzformálunk, a klónozó gazdát tenyésztjük, lizáljuk, a plazmidot izoláljuk és a fragmentumot restrikciós analízissel, szekvenálással vagy ezek kombinációjával vagy hasonlókkal vizsgáljuk. A kívánt gének kifejezésére E.coli sejteket is használhatunk gazdasejtek gyanánt, nagymennyiségű protein termelése céljából.

A szerkezet kialakítása folyamán és a gazdasejt transzformálására különböző vektorokat használhatunk. Ezek a vektorok lehetnek klónozó vektorok, expressziós vektorok és olyan vektorok, amelyek a gazdába való integrálódásra képesek vagy használhatunk csupasz DNS-t transzformálás és integrálás céljára.

A klónozó vektort többnyire az jellemzi, hogy markert tartalmaz a klónozó vektort tartalmazó gazdasejt szelekciójához és adott esetben egy transzformációt fokozó szekvenciát. Tartalmazhat továbbá egy vagy több polilinkert vagy kiegészítő szekvenciákat inszercióhoz, szelekcióhoz, manipulációhoz, a szekvenálás megkönnyítéséhez, kimetszéshez és így tovább.

Az expressziós vektorok rendszerint olyan szerkezettel rendelkeznek a beépítéshez, amely transzkripciót és transzlációt indító szakaszt és terminátor szakaszokat tartalmaz, másrészt e szerkezetből hiányozhat az egyik vagy mindkét szabályozó szakasz, mivel ezeket az expressziós vektor szolgáltathatja a protein-terméket kódoló szekvencia beépítésével.

A kívánt enzimet (enzimeket) kódoló DNS-t bevezethetjük Penicillium gazdasejtbe, lényegében az EP-A-260762 számú európai szabadalmi bejelentésben leírt eljárás alapján.

A Penicillium eredményes transzformálása révén olyan transzformált sejtek keletkezhetnek, amelyekben egy vagy több kifejeződésre képes gén külön-külön a gazda genomjába van integrálva (integrált gének). Olyan DNS szerkezeteket készítünk, amelyek biztosítják a transzformált gazdasejtek szelektálását. A transzformáláshoz olyan feltételeket alkalmazunk, amelyek nagy frekvenciával történő transzformációt eredményeznek, s egyben biztosítják a kívánt strukturális gént (géneket) kifejező transzformált gazdasejtek szelektálását és izolálását. A kapott transzformált sejtek lehetővé teszik az integrált DNS állandó fenntartását és kifejeződését. A találmány szerinti transzformált gazda értéke abban van, hogy fel lehet használni kiindulási törzs gyanánt és olyan törzsfejlesztési eljárásokban, amelyek különböznek a DNS közvetítette transzformációtól, amilyen például a protoplaszt fúzió, a mass mating és a mutáció. A kapott törzsek úgy tekinthetők, hogy azok a találmány részét képezik.

A kívánt gének, amelyeket transzformálás révén óhajtunk bevezetni, a transzformáló vektor integráns részét képezhetik, de gyakran sokkal előnyösebb, ha ezeket a géneket külön vektor révén juttatjuk be a transzformációs keverékbe, s így a szelektív vektorral együtt kotranszformációval építjük be ezen említett géneket, ami fonalas gombák esetében igen hatékony eljárás [P.J. Punt és mtsai, Gene, *56,* 117–124 (1987); K. Wernars és mtsai, Mol.Gen. Genet., *209,* 71–77. (1987); I.E. Mattern és mtsai, Mol. Gen. Genet., *210,* 460–461 (1987)].

A transzformálás eredménye az lesz, hogy a kívánt génből (génekből) legalább egy másolat jön létre, gyakran kettő vagy több, legtöbbször mintegy tíznél nem több. A számuk attól függ, hogy vagy integrált formát vagy stabil episzómális fenntartást alkalmazunk. Az integrált másolatok száma attól függ, hogy a szóban forgó szerkezetek sokszorozódnak-e és így tovább.

A szakterületen számos eljárás ismeretes a kívánt géneknek egy kiválasztott faj genomiális gyűjteményéből való izolálására [például: Maniatis és mtsai, Molecular Cloning; A Laboratory Manual (1982)]. Mi a differenciál-szűrés módszerét használjuk a penicillin bioszintézisében résztvevő gének izolálására. Erre a célra mRNS-t izolálunk a laktózon növekedő (termelő) és a glükózon növekedő (nemtermelő) micéliumokból. Jelzett cDNS szondát szintetizálunk mindkét mRNS populációból és miután a termelő cDNS szondát feldúsítottuk (azáltal, hogy minden olyan cDNS-t eltávolítunk, amelyek a nemtermelő mRNS-sel hibridizálnak), olyan genomiális klónokat izolálunk, amelyek csak a termelő cDNS szondával hibridizálnak. Az eljárás részleteit a 2. példa tartalmazza. Nagyszámú ilyen módon izolált klónról derült ki, hogy penicillin bioszintetikus enzimet; az izopenicillin N szintetázt (IPNS vagy cikláz) kódolja.

Ezenkívül azt találtuk, hogy a klónok között az oldalláncserét végző enzimet (aciltranszferáz) kódoló gén számos kópiája van jelen. Ezt olyan kísérletekkel bizonyítottuk, amelyekben a tisztított enzim aminoterminális peptid szekvenciáján alapuló DNS szondát alkalmaztunk. E klónok identitását biokémiailag és biológiailag igazoltuk. Az aciltranszferáz gén nukleotid szekvenciáját és az

ebből levezetett aminosav szekvenciát a 3. ábrán mutatjuk be. Meglepő módon mind az izopenicillin N szintetáz, mind az aciltranszferáz enzimet kódoló gén ugyanazon DNS fragmentumon van jelen. Ezt úgy mutattuk ki, hogy az EMBL3 lambda vektorban lévő P. chrysogenum genomgyűjteményt mindegyik génre külön specifikus szondákkal hibridizáltuk. Az azonos klónok mindkét szondával külön hibridizáltak.

Ezenkívül az egyik agenomiális lambda klón fizikai térképének elkészítése után, valamint a lambda klón restrikciós emészteteinek a két génhez külön készített szondákkal való hibridizálása alapján azt találtuk, hogy a genomiális szerkezet megfelel a 2. ábrán bemutatott képnek (B21 és G2 klón). A két génnek egyazon nagy DNS fragmentumon való elhelyezkedése lehetővé teszi olyan P. chrysogenum törzsek szerkesztését, amelyekben mind az izopenicillin N szintetáz, mind az aciltranszferáz gén nagyobb számban van jelen anélkül, hogy ez megzavarná a két gén rokonszerkezetét vagy kiegyensúlyozott kifejeződését. Ezenkívül, ha e nagy DNS fragmentumból több másolatot építünk be, úgy lehetővé válik, hogy a DNS fragmentumon lévő mindkét gén természetes környezetben fejeződjék ki a normál helyzettel azonos upstream és downstream szekvenciákkal.

Úgy a kiegyensúlyozott expresszió, mint a természetes környezetben való fenntartás jó hatásúnak bizonyul a génkifejeződés eredményességére, tehát a penicillintermelésre, amint ezt a penicillin hozamának javulása (40% felett) bizonyítja azokban a transzformált sejtekben, amelyek egy olyan DNS szerkezetet tartalmaznak, amely magába foglalja mind az AT, mind az IPNS gént, s ezt a továbbiakban [IPNS plusz AT] géncsoportnak nevezzük. Ennélfogva az AT-t és IPNS-t kódoló gének csoportba rendezését előnyösen alkalmazzuk a Penicillium törzs javítására. Egy csak IPNS gént tartalmazó DNS szerkezet bevezetése nem eredményezett jobb penicillintermelést (Skatrud és mtsai, lásd fent).

A jelen találmány ezenkívül az [IPNS plusz AT] géncsoport izolálás előnyös alkalmazását a ß-laktám antibiotikumok szintézisében résztvevő más gén(ek) izolálásában is felhasználja, a kromoszóma-séta technika segítségével (azaz ezzel a technikával egy rekombináns klónból kiindulva más olyan rekombináns klónokat izolálunk, amelyek a kiindulási klón szomszédságában vannak és amelyek a genomról átfedő információkat tartalmaznak).

Ezt egy kozmid klónnak az IPNS génnel való homológiájára alapozott izolálásának példáján mutatjuk be, valamint egy kiegészítő eljárással, nemtermelő mutánsok egy említett kozmid klónját használva, melyről tudjuk, hogy az [IPNS plusz AT] géncsoport által kódolt enzimaktivitást tartalmazza. Tehát az IPNS és AT gének csoportosítását eredményesen alkalmazzuk a penicillin bioszintézisében résztvevő másik gén, az ACVS gén izolálására. Az említett ACVS gént is az [IPNS plusz AT] géncsoporthoz csoportosítjuk és ezt a csoportot a HM193 kozmid tartalmazza. Annak érdekében, hogy világosan meghatározzuk a szabadalmat, utalunk a 8. ábrára, amely az említett kozmid fizikai térképét ábrázolja. Ezenkívül a kozmid klónt letétbe helyeztük CBS 179.89 letéti szám alatt. Megjegyezzük, hogy a 8. ábra a restrikciós helyek körülbelüli pozícióját mutatja, amelyeket méretmeghatározás céljából végzett agaróz gél elektroforézis segítségével határoztunk meg, de nem szükségszerűen kívánja meghatározni a bemutatott DNS-en jelenlévő összes lehetséges restrikciós helyet. A HM193 kozmidban egy másik gén jelenléte – például egy reguláló proteint kódoló gén – még nem zárható ki. Az ACVS-t kódoló gén izolálásával a penicillin bioszintetikus folyamat (1. ábra) klónozása megtörtént és bevezethető bármely mikroorganizmusba, például élesztőbe.

További tárgyát képezi a találmánynak, hogy olyan génekkel transzformáljuk a Penicillium chrysogenum sejteket, amelyek specifikusan olyan feltételek mellett fejeződnek ki, amikor az antibiotikum szintetizálódik és amelyek olyan géntermékeket kódolnak, amelyek a szóban forgó antibiotikumhoz vezető bioszintetikus reakciókat katalizálják.

Az egyik ilyen enzim, az aciltranszferáz (a továbbiakban AT), a penicillin bioszintézis utolsó lépését katalizálja, amikor is az izopenicillin N amino-adipil része egy hidrofób acil-oldallánc prekurzorra, például fenil-acetsavra vagy fenoxi-ecetsavra cserélődik kis ez a lépés a penicillin G-t, illetve V-t eredményezi.

A találmány rendelkezésre bocsátja a P. chrysogenum aciltranszferáz génjét nukleinsav szekvenciájával együtt, valamint az olyan konzervatív mutációkkal, amikor a szekvencia ugyanezt az aminosav szekvenciát kódolja, de a bázisok 30%-a különbözhet, rendszerint azonban a bázisoknak körülbelül 10%-a különbözik. A találmány tárgyát képezik a nem konzervatív mutációk is, amikor az aminosavaknak kevesebb, mint 10%-a, sokkal gyakrabban kevesebb, mint 5%-a és előnyösen nem több, mint körülbelül 1%-a helyettesített vagy deletált és amikor 5%-nál kevesebb a beépített aminosav, ahol a százalék a természetben előforduló aminosavak számához való viszonyt jelenti. Felhasználhatjuk ezenkívül az enzimet kódoló nukleinsav fragmentumait is – rendszerint legalább körülbelül 9 kodont, még gyakrabban legalább 15 kodont – továbbá expressziós termékeit szondák gyanánt, antitestek termelésére és így tovább. A szondákat más fajokban az enzim azonosítására használhatjuk olyan módon, hogy a nukleinsavakat hibridizálásra használjuk, az antitesteket pedig a keresztreagáló proteinek azonosítására.

Egy másik enzim, az ACVS katalizálja a ß-laktám antibiotikum penicillin, cephalosporin és cephamycin bioszintézisének első lépését, azaz három aminosavnak, az L-α-amino-adipin-savnak, L-ciszteinnek és L-valinnak δ-(L-α-aminoadipil)-L-ciszteinil-D-valin tripeptiddé való kondenzációját. Az ACVS gén a HM 193 kozmidban áll rendelkezésre. E kozmid részeit, vagy az egész kozmidot felhasználhatjuk hibridizációs szondaként abból a célból, hogy más fajokban meghatározzunk olyan DNS fragmentumokat, amelyek szintén ACVS enzimet kódolnak. A klónt felhasználhatjuk még in vitro hibridrögzítő transzlációs kísérletekben, amikor is első lépésként olyan mRNS populációt izolálunk, amelynek a klónnal való homológiája elegendő ahhoz,

hogy vele hibridizáljon. A második lépés az említett mRNS populáció izolálása és ezt követően funkcionális proteinné való transzlációja, a szakterületen ismert in vitro transzkripciós rendszer használatával. Az így izolált proteint például fel lehet használni aktivitás mérésekre vagy antitestek termelésére.

Az AT, ACVS, Y és más penicillin bioszintetikus gének izolálása lehetővé teszi az individuális gének szabályozó elemeinek – ilyen egy promoter, egy upstream aktiváló szekvencia (UAS = upstream activating sequence), egy terminátor és hasonlók – azonosítását. Ez a gének egymás közötti összehasonlításával érhető el, valamint az izopenicillin N szintetáz bioszintetikus génre és más rokon génekre kapott szekvenciákkal való összehasonlítással. Ez utóbbi összehasonlítás felfedheti ezenkívül a penicillin bioszintetikus gének csoportjában a génexpresszió szabályozásának speciális természetét.

Egy ilyen „penicillin bioszintetikus szabályozó elem" azonosítása specifikus szabályozó proteinek azonosításához vezet olyan standard technikák segítségével, mint a gél retardáció, keresztkötés, DNS footprint analízis és hasonlók. A specifikus szabályozó proteinek affinitás kromatográfiával való izolálása után következik az illető proteint kódoló gén klónozása, majd manipulálása egy megfelelő gazdasejtben.

A klónozott AT-gén, ACVS-gén, Y-gén és más penicillin bioszintetikus gének használatával, módosított enzimek tervezhetők és szintetizálhatók. Ezek a módosítások azt eredményezik, hogy az enzimek jellemzői módosulnak, például változik pH és hőmérséklet optimumuk, változik a stabilitásuk vagy változik szubsztrátum specificitásuk. Azokat a gazdatörzseket, amelyeket e módosított enzimeket kódoló génekkel transzformáltunk, úgy programozhatjuk, hogy az antibiotikum szintézisét különböző feltételek mellett végezzék vagy hogy más antibiotikumot szintetizáljanak, például penicillin helyett ampicillint.

A találmány egy másik szempontja szerint, a klónozott gének olyan gazdatörzsek transzformálására használhatók, amelyek a természetben nem tartalmazzák ezeket az enzimeket. Ismeretes, hogy a Streptomycesnek és az Acremoniumnak nincs AT enzime, míg másrészt a Penicilliumból hiányzik a cephalosporin és cephamycin bioszintetikus enzimek génje. Ha ezeket a géneket gazdasejtekbe vezetjük be, az eredmény az lesz, hogy a Penicillium cefalosporint vagy cefamicint szintetizál és az Acremonium penicillint vagy cefalosporinokat szintetizál hidrofób oldallánccal. További példa a Penicillium chrysogenum [IPNS plusz AT] géncsoport kifejeződése az Acremonium chrysogenumban.

A következő eredmények alapján nyilvánvaló, hogy a másodlagos metabolitok termelése nagyban fokozható olyan szűrési eljárások alkalmazásával; amelyek lehetővé teszik a másodlagos metabolitok termelésével összefüggő DNS szekvenciák azonosítását. A másodlagos metabolitok termelésével kapcsolatos specifikus szekvenciák azonosítására használt kivonásos módszerekkel mRNS és cDNS izolálható, amelyek – azonosításuk után – szondákként alkalmazhatók. Megállapítottuk tehát, hogy olyan fragmentumok, amelyek eddig nem ismert funkciójú géneket tartalmaznak, nagymértékben fokozzák a másodlagos metabolitok termelését és ezekkel a fragmentumokkal gazdasejtek transzformálhatók a másodlagos metabolit termelése céljából. Ezt az eljárást a penicillin példáján mutatjuk be.

Ezenkívül egy olyan aciltranszferáz gént bocsátunk rendelkezésre, amelyet változatos módon használhatunk: mint enzimet a ß-laktám vegyületek módosítására, mint jelzőt, mint antigénforrást aciltranszferáz antitestek termeléséhez, mint promoter szekvenciaforrást, mint olyan forrást, melynek révén nagymennyiségű protein fejezhető ki kristályosítás céljára, templátként in vitro mutagenezishez, amellyel módosított jellemzőket felmutató enzimet kapunk és így tovább. Az AT gén bevezetése a z [IPNS plusz AT] géncsoportba a transzformált sejtekben a penicillintermelés nagymértékű fokozódásához vezet. A csoport-genotípust ezenkívül más olyan gén(ek) izolálására használjuk, amely(ek) a penicillin bioszintézisében résztvesz(nek), ilyen például az ACVS-t kódoló gén. A géncsoport bevezetése az Acremonium chrysogenumba a géncsoport kifejeződését és a penicillinnek Acremonium chrysogenum által történő termelését vonja maga után.

A találmány tárgya ezenkívül egy kozmid klón, mely az ACVS-t kódoló gént tartalmazza. Ezt a gént, úgy mint az AT-t kódoló gént, az előbb említett célra alkalmazzuk. Lehetséges, hogy más (regulátor) géneket is tartalmaz a HM193 kozmid.

E szabadalmi leírásban említett minden közleményt és szabadalmi bejelentést úgy építettünk be referenciaként, mintha minden egyes közleményt vagy szabadalmi bejelentést speciálisan és egyedileg lenne indokolt referenciaként alkalmazni.

Bár a találmányt bizonyos részletességgel írtuk le az előbbiekben és a világosabb megértés céljából ábrákat és példákat adunk közre, az ezen a szakterületen átlagos jártassággal rendelkezők számára a találmányban előadottak fényében nyilvánvalóvá válik, hogy bizonyos változtatásokat és módosításokat végezhetnek anélkül, hogy a csatolt szabadalmi igénypontok szellemétől vagy oltalmi körétől eltérnének.

A következő példákat mint illusztrációkat adjuk közre, anélkül azonban, hogy ezekkel a találmány oltalmi körét korlátoznánk.

1. példa

Genomiális gyűjtemény előállítása Penicillium chrysogenumból

A Penicillium chrysogenumból (ATCC 28089) lényegében a szakterület ismert módszerei szerint [Z. Maniatis és mtsai, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. USA (1982)] készítünk genomiális gyűjteményt. A kromoszómális DNS-t úgy vonjuk ki a Penicillium chrysogenumból, hogy a micéliumokat protoplasztokká alakítjuk, mint ahogy ezt korábban az EP-A-260762 számú európai szabadalmi bejelentés leírta.

A protoplasztokat ezután olyan módon lizáljuk, hogy az izotóniás (0,7 mólos KCl) szuszpenziót négy térfogat

TES pufferrel (0,05 M trisz.HCl; pH= 8,0; 0,1 M EDTA, 0,15 m M NaCl) hígítjuk. Ezután 1% nátrium-laurilszulfátot adunk a lizátumhoz és az elegyet 55 °C-on inkubáljuk 30 percig. Egy fenolos és két kloroformos extrahálás után a DNS-t etanollal kicsapjuk, szárítjuk, majd TE pufferben (10 mM trisz, 1 mM EDTA; pH= 8,0) feloldjuk. A DNS-oldatot ezután 100 μg/ml RNáz-zal kezeljük 37 °C-on 1 órán át, majd ezután 200 μg/ml proteináz K-val 42 °C-on 1 óra hosszat. Az oldatot egyszer fenollal és kétszer kloroformmal extraháljuk. Az azonos mennyiségű izopropanolt rétegezünk a vizes fázis fölé és a DNS-t a határfelületről gyűjtjük össze úgy, hogy üvegbotra gombolyítjuk fel. Szárítás után a DNS-t TE pufferben oldjuk. Az így kapott DNS-készítmény molekula tömege körülbelül 10^8. A DNS-t részlegesen emésztjük Sau3A-vel, ezután BamHI-el hasított defoszforilált EMBL3 karokhoz (Promega Biotec, Madison, WI.; USA) ligáljuk és lambda bakteriofág kapszidokba pakoljuk Promega Biotec-féle Packagene System segítségével. Minden reakciót az előállító cég előírásai szerint végeztünk, kivéve, hogy a pakolás reakciója 22 °C-on, 2–3 órát tartott. A gyűjteményeket úgy szaporítjuk, hogy a megpakolt fágokat lemezre visszük, a lemezeket 7–8 óra hosszat 37 °C-on inkubáljuk, majd a fágokat Petri csészénként 4 ml SM pufferrel (0,1 M NaCl, 0,01 M Mg_5SO_4, 0,05 M trisz.HCl; pH= 7,5, 0,01% zselatin) oldjuk ki.

2. példa

A penicillin bioszintézise folyamán specifikusan kifejeződő gének izolálása differenciál-szűrési eljárással

A penicillin bioszintézise folyamán specifikusan és túlsúlyban kifejeződő géneket úgy azonosítjuk, hogy az 1. példa szerinti genomiális gyűjteményt megszondázzuk olyan jelzett cDNS szondákkal, amelyeket a termelő (laktózon növekedő) és nemtermelő (glükózon növekedő) micéliumokból kivont mRNS templátok alapján szintetizáltunk és kiválasztjuk azokat a klónokat, amelyek túlnyomórészt pozitív szignált adnak az előbbi (+) szondával.

Messzendzser RNS-eket izolálunk a 3. vagy 6. napos tenyészetekből, egyszer a termelő táptalajból (lásd a 3. példát) (+ előállítás), másszor ugyanebből a táptalajból, amikor a laktózt glükózzal helyettesítjük (- előállítás). A micéliumokat szűréssel gyűjtjük össze, folyékony nitrogénben fagyasztjuk, homogenizáljuk és a mRNS-t T.Maniatis és mtsai (lásd fent) által leirt guanidinium-izotiocianát módszerrel izoláljuk.

Mindkét mRNS populációval szemben cDNS-t szintetizálunk és (α-32P) dATP-vel jelezzük nagy specifikus aktivitás mellett, 30 μl reakcióelegyben, melynek összetétele a következő:

12,5	mM	$MgCl_2$
50	mM	trisz.HCl, pH=8,3
100	mM	KCl
125	mM	DTT
2	μM	RNáz
500	μM	dGTP
500	μM	dCTP
500	μM	dTTP
25	μM	dATP
0,1	μg/ml	BSA
100–200	μg/ml	poli A^+ RNS
50–60	μg/ml	oligo dT_{12-18}
1,2	μg/μl	reverz transzkriptáz
1,67	μCi/μl	(α-^{32}P) dATP

A poli A^+RNS-t és az oligo dT-t külön kevertük össze, 100 °C-on 1 percig hevítettük és mielőtt a reakcióelegyhez adtuk, lehűtöttük jeges vízben. A reakcióelegyet 1,5 órán át 42 °C-on inkubáljuk, majd hozzáadunk 5 μl 1 mM-os dATP-t és tovább inkubáljuk 30 percig. Ezután a reakcióelegy EDTA koncentrációját 20 mM-ra, NaOH koncentrációját 40 mM-ra állítjuk be (végső térfogat 100 μl) és 65 °C-ra hevítjük. Egy órás inkubáció után hozzáadunk 5 μl 1 mólos trisz.HCl-t (pH=8,3), 40 μl 0,1 HCl-t, 7 μg borjú timusz DNS-t, 100 μl TES puffert (10 mM trisz, 1 mM EDTA, 1% SDS; pH = 7,5) és 200 μl 5 mólos ammónium-acetátot, s a DNS-t 800 μl etanollal csapjuk ki –20 °C-on 16 óra alatt.

A csapadékot centrifugálással gyűjtjük össze, 70%-os etanollal mossuk, szárítjuk, végül 32,5,μl TE pufferben (10 mM trisz, 1 mM EDTA; pH=8,0) oldjuk fel. A (+) cDNS készítményt ezután a penicillin bioszintézise folyamán specifikusan kifejeződő szekvenciákban dúsítjuk fel úgy, hogy két egymásután következő hibridizációs lépcsőben (kaszkád) a (–) mRNS készítménnyel hibridizáljuk 75 μl reakcióelegyben, melynek összetétele a következő:

32,5	μl	(+) cDNS
10	μl	(–) mRNS (1 μg/μl)
30	μl	1 mólos $NaPO_4$; pH = 6,8
1,5	μl	10%-os SDS
1	μl	0,5 mólos EDTA

A reakcióelegyet 16 órán át 68 °C-on inkubáljuk, hozzáadunk 102 μl vizet (a végső foszfátkoncentráció 170 mM) és az elegyet hidroxilapatit oszlopra visszük fel, amelyet előzőleg 170 mM foszfátoldattal hoztunk egyensúlyba 68 °C-on. Ilyen körülmények mellett a kettősszálú nukleinsavak az oszlopon megkötődnek, míg az egyszálú nukleinsavak kioldódnak. Az eluátumot összegyűjtjük, TE pufferral szemben 1,5 óra hosszat dializáljuk és 4 μg hordozó DNS (borjú timusz) hozzáadása után etanollal kicsapjuk. Az eljárást megismételjük és a végső kötetlen cDNS-t közvetlenül használjuk szondaként a Penicillium genomiális gyűjtemény szűrésére a következőképpen:

Az 1. példa szerint elszaporított gyűjtemény egy mintáját 5 Petri csészére szélesztjük úgy, hogy lemezenként körülbelül 1500 plakk képződjön. A plakkokat két-két Gene Screen Plus szűrőre (New England Nuclear) viszszük át az előállító cég előírása szerint. Az egyik szűrő csoportot a jelzett, dúsított (%) cDNS-készítménnyel szondázzuk, a másodlat szűrőcsoportot a jelzett (–) cDNS-sel, mint kontrollal szondázzuk.

A pozitív plakkokat tisztítjuk s egy második szűrésnek vetjük alá. Ezzel az eljárással 96 plakkot szelektáltunk, melyek túlnyomóan pozitív szignált adtak a (+) cDNS-szondával.

Azokat a rekombináns fág DNS-eket, amelyek erős vagy közepes szignált adtak az első szűrésnél, ^{32}P-vel jeleztük és szondák gyanánt használtuk fel a termelő és

nemtermelő micéliumokból izolált Penicillium RNS-ek Northern blotjainak szűréséhez abból a célból, hogy megállapítsuk mindkét körülmény mellett az expresszió szintjét. Eszerint a rekombináns klónokat három csoportba osztottuk.

Az 1. csoport olyan géneket tartalmaz, amelyek magas szinten fejeződnek ki a penicillin bioszintézise folyamán. Ilyenek például az alábbi klónok:

G2 és B21
B9, L5 és G5
L12
K9

A 2. csoportba tartozó gének kifejeződése közepes. Ilyenek például az alábbi klónok:

C12
P3 és K11
B13
B20

A 3. csoportba tartozó gének kifejeződése gyenge. Ilyenek például az alábbi klónok:

G3
G1
L10
K16
B23

A G2 és B21 rekombináns fág fizikai térképét mutatja be a 2. ábra. A G2 és B12 klón pozitív hibridizációs szignált adott, amikor egy izopenicillin N szintetáz specifikus szondával vizsgáltuk (S.M. Samson és mtsai, lásd fentebb). Meglepő módon úgy tűnt, hogy ugyanezen klónok egy aciltranszferáz specifikus szondával is hibridizáltak (lásd az 5. példát).

3. példa

Az aciltranszferáz tisztítása

Penicillium chrysogenum törzzsel (ATCC 28089) beoltunk (2.10^6 konidium/ml mennyiséggel) egy komplex oltó táptalajt, melynek összetétele a következő: 20 g/l kukoricalekvár, 20 g/l szeszgyártási maradék, 20 g/l szacharóz, 5 g/l $CaCO_3$. A táptalaj pH-ja sterilizálás előtt 5,7. Az oltó-táptalajt 36 órán át 25 °C-on 250 ford./perc mellett inkubáljuk, s a kapott tenyészetet használjuk húszszoros térfogatú komplex termelő táptalaj beoltására. A termelő táptalaj 35 g/l szárított kukoricalekvárt, 25 g/l laktózt, 2,5 g/l kálium-fenil-acetátot, 3 g/l $Mg_5SO_4.7H_2O$-t, 7 g/l KH_2PO_4-ot, 2,5 g kukoricaolajat és 10 g/l $CaCO_3$-ot tartalmaz. Az inkubálást tovább folytatjuk 48 órán át, majd a micéliumokat szűréssel gyűjtjük össze és a szűrőpogácsát négyszer mossuk hideg 0,15 mólos NaCl-al.

200 g (nedves tömeg) micéliumot szuszpendálunk 700 ml 5 mM ditiotreitol (DTT) tartalmú 0,05 mólos trisz.HCl pufferben N. (pH = 8; TD puffer). A szuszpenziót Braun-féle dezintegrátorban (Braun, Melsungen, NSZK) Bellotini üvegszemcsék (Sigma, V típus, átmérő: 450–500 μm) használatával, 15 másodperces intervallumokban 30 másodperces periódusokkal, etanol/szárazjégürdőben mélyhűtve tárjuk fel. A kivonatot 30 percig 20 000 g mellett centrifugáljuk. Ezt a műveletet és minden ezután következő lépést 4 °C-on végzünk. A kivonat 640 ml-éhez lassan hozzáadunk 27 ml 0,5 mólos trisz.HCl-lel (pH = 8,0) készített 10%-os (tömeg/térf) protamin-szulfát oldatot. Az oldatot 45 percig kevertetjük, majd a nukleinsav csapadékot centrifugálással 20 000 g – távolítjuk el és a felülúszót ammónium-szulfátos kicsapással frakcionáljuk, miközben az oldat pH-ját 8,0-on tartjuk az ammónium-szulfát adagolása közben. A 40–55%-os telítés között kicsapódott frakciót 1 M ammónium-szulfát tartalmú TD pufferben oldjuk fel és az oldatot CL-4B oszlopra (1,8×16 cm) visszük fel, melyet előzőleg ugyanezen pufferrel hoztunk egyensúlyba. Az oszlopot TD pufferrel mossuk 5 ml/perc átfolyási sebesség mellett, amíg kötetlen protein már nem jön le az oszlopról.

Ezután az aciltranszferázt oldjuk le az oszlopról 0,05 mólos trisz.HCl-lel (pH = 8,0) készített 40%-os etilén-glikollal.

A kioldott frakciókat aciltranszferáz aktivitásra vizsgáljuk oly módon, hogy a 0,2 mM fenil-acetil-koenzim A-t, 0,2 mM 6-amino-penicillán savat, 5 mM DTT-t, 0,1 M trisz.HCl-t (pH = 8,0,) és az enzimkivonatot tartalmazó reakcióelegyet, melynek végső térfogata 200 μl, 25 °C-on inkubáljuk. Tíz perc múlva a reakciót 200 μl metanol hozzáadásával állítjuk le. A mintákat 5 000 g mellett lecentrifugáljuk és a felülúszóban lévő penicillin G-t hagyományos mikrobiológiai vagy kromatográfiás módszerekkel határozzuk meg.

A fenil- Sepharose oszlopról származó aktív frakciókat egyesítjük és felvisszük DEAE-Sephacel oszlopra (1,5×20 cm), melyet előzőleg TD pufferrel hoztunk egyensúlyba és az aciltranszferáz aktivitást TD pufferes NaCl lineáris grádiensével (0–0,25 M) oldjuk le, 0,25 ml/perc átfolyási sebesség mellett. Az egyesített aktív frakciókat 70% ammónium-szulfáttal csapjuk ki, a csapadékot 3 ml TD pufferben oldjuk, majd TD pufferrel kiegyensúlyozott Sephadex G-75 (coarse) oszlopra (2,6×70 cm) visszük fel. Az aciltranszferázt TD pufferrel oldjuk ki 9 ml/perc átfolyási sebességgel. A később kioldódó frakciórészeket gyűjtjük össze, ahol a proteincsúcs szimmetrikus a megfelelő aciltranszferáz aktivitással. A végső tisztaság 258-szoros volt.

4. példa

Az aciltranszferáz aminoterminális aminosav szekvenciájának meghatározása és a megfelelő oligonukleotid szonda keverékek megtervezése

A 3. példa szerinti eljárással kapott enzimkészítményt SDS-PAGE gélben [U.K. Laemmli, Nature, *227,* 680 (1970)] futtatjuk (13% akrilamid; 50 mA). Az SDS gélből egy 29 kD sávot (körülbelül 10 μg protein) vágunk ki és a proteint elektroforézis segítségével egy PCGM-2 membránra (polybrene impregnated glass-fibre, Janssen, Beerse, Belgium) visszük át Multiphor II Nova blot egység (LKB; 0,8 mA/cm^2; 90 perc; elektród puffer: 5 mM nátrium-borát; pH = 8,0) segítségével. A blotting után a PCGM membránt négyszer mossuk 25 mM nátrium-kloridot és 10 mM nátrium-borátot tartalmazó oldattal (pH = 8,0), majd szárítjuk.

Az így kapott, PCGM-re adszorbeált protein N-terminális aminosav szekvenciájának analízisét gázfázi-

sú szekvenátorral (Applied Biosystems, model 470A) végeztük el. A meghatározásnál a következő szekvenciát kaptuk.

thr-thr-ala-tyr-cys-gln-leu-pro-asn-gly-ala-leu-gln--gly-gln-asn-trp-asp

A fenti aminosav-szekvencia aláhúzott része alapján az alábbi oligodezoxinukleotid készletet szintetizáltuk:

```
          T
      A   C   A   T       T
5' CA  GG  CA  AA  TGGGA    3'
      G   A   G   C       C
          G
```

A készítményben néha jelenlévő 10 kD sáv aminoterminális aminosav szekvenciáját szintén meghatároztuk, de nem használtuk fel oligodezoxinukleotid szonda készítéséhez. A kapott szekvencia a következő: Met-Leu-His-Ile-Leu-X--Gln-Gly-Thr-Pro-Phe-Glu-Ile-Gly-Tyr-Glu-His-Gly--Ser-Ala-Ala-Lys-Ala-Val-Ile-Ala.

5. példa

Az aciltranszferáz gén azonosítása

Néhány 2. példa szerinti lambda klón DNS-ét SalI restrikciós endonukleázzal emésztjük, a fragmentumokat 0,7%-os agaróz gélben elválasztjuk, átvisszük Genescreen Plus membránra, ahol a 4. példa szerinti [^{32}P]-vel végjelzett oligonukleotidok keverékével hibridizáljuk. A pozitív szignált adó klónokról standard módszerekkel végzett restrikciós analízissel térképet készítünk. Két rekombináns fág – lambda B21 és lambda G2 – reprezentatív fizikai térképét mutatja be a 2. ábra. Az oligodezoxiribonukleotid keverék specifikusan hibridizált a térképen jelzett EcoRI/HindIII szubfragmentummal. Ezt és a szomszédos fragmentumokat a pTZ 18/19-ben (United States Biochemical Corporation) újra klónoztuk és elvégeztük nukleotid szekvencia analízisüket. A meghatározott szekvencia és a belőle levezetett aminosav-szekvencia a 3. ábrán látható.

Meghatároztuk a készítményben szintén jelenlévő 10 kD sáv amino-terminális aminosav szekvenciáját és megállapítottuk, hogy ez egy olyan DNS-szekvenciának felel meg, amely a 29 kD szekvenciához képest upstream helyezkedik el. Tehát valószínű, hogy az AT mint egy 40 kD protein szintetizálódik. Ezt a feltevést támasztja alá az AT messzendzser hossza, amelyről kimutattuk, hogy körülbelül 1 500 bázis hosszú (hasonlóan az izopenicillin N szintetáz mRNS-hez, amely egy 38 kD proteint kódol), s ez teszi lehetővé 100 bázis hosszú 3' és 5' hosszú nem transzlatált szakaszok jelenlétét.

A 29 kD protein aminosav szekvenciája (a Thr-Thr--Ala-Tyr-Cys-Gln-Leu-Pro-Asp-Gly-Ala-Leu-Gln--Gly-Gln-Asn-Trp-Asp-Phe-Phe-Ser-Ala-Thr-Lys--Glu-Ala szekvenciára kiterjesztve) és a 10 kD protein aminosav szekvenciája két intron jelenlétét mutatja. Egy harmadik intron léte is feltételezhető a 10 kD protein bruttó aminosav összetétele (97 csoport) és határainak általánosan elfogadott szekvenciája alapján [D.J.Ballance, Yeast, *2*, 229–236 (1986)]. Ennek a harmadik intronnak a jelenlétét primer extenzióval és a kódoló és nem kódoló szakaszokból származó oligonukleotid szondák használatával végzett Northern blot hibridizációval bizonyítottuk.

6. példa

A pP547 szerkesztése

A Penicillium genom gyűjteményből standard módszerekkel (Maniatis; 1. példa) izoláljuk a foszfoglicerát kináz (pgk) gént, amikor is hibridizációs szondaként a megfelelő élesztőgént használjuk (Hitzeman és mtsai, lásd, fent).

A P. chrysogenum pgk promotert, mint 1,5 kb HindIII fragmentumot, beklónozzuk a pTZ18R-be és egy olyan klónt szelektálunk, amelyben megfelelő az orientációja.

Ezután a fleomicin rezisztencia gént, melyet az 1,0 kb BamHI plusz BgIII fragmentum alakjában a pUT702-ből (Cayla, Toulouse Cedex, Franciaország) izoláltunk, beklónozzuk ebbe a klónba, a polilinker BamHI helyére. A pgk promotert a fleomicin rezisztenciagén keretébe fuzionáljuk úgy, hogy kihurkoljuk a deletálandó szekvenciát az alábbi oligonukleotid szekvencia használatával:

5' – GGA ACG GCA CTG GTC AAC TTG GCC ATG GTG GGT AGT TAA TG1 TAT G-3'

Ez az oligonukleotid ezenkívül még egy NcoI helyet vezet be az ATG helynél (aláhúzva).

7. példa

Nagy transzformációs hatékonyságú transzformáló vektor szerkesztése (pP554)

Annak érdekében, hogy a P. chrysogenum esetében olyan transzformációs frekvenciát kapjunk, amely elég magas ahhoz, hogy lehetővé váljék transzformálás vagy kotranszformálás révén gének beépítése olyan céllal, hogy kiegészítsük vagy megsokszorozzuk a ß-laktám bioszintézisében szereplő nem-szelektálható géneket, kívánatos, hogy a transzformáló vektorba egy transzformációt fokozó szekvenciát vezessünk be [ans szekvencia az Aspergillusban; D.J. Ballance és G.Turner, Gene, *36*, 321–331 (1985)]. Meglepő, hogy a P. chrysogenumban működő transzformáció-stimuláló szekvencia egy olyan DNS szekvencián helyezkedik el, amely a P. chrysogenum pyrG génjét tartalmazza. Ez a DNS fragmentum részét képezi annak a 4 kb Sau3A parciális fragmentumnak, amely a pUC13 plazmid BamHI helyére van beklónozva [J. hiessing, Meth. Enzymol., *101*, 20 (1983) Acad. Press]. A plazmid jele a következőkben pUC13::pyrG (lásd az EP-A-260762 számú európai szabadalmi bejelentést).

A 2,4 kb EcoRI fragmentumot beépítjük a Streptoalloteichus hindustanus fleomicin rezisztencia génjét tartalmazó plazmidba (pP547) a P. chrysogenumból származó foszfoglicerát kináz (pgk) gén promoterének a szabályozása alá. A kapott szerkezet neve: pP554.

A pyrG fragmentumnak a transzformálás gyakoriságára való hatását az alábbi 1. táblázat ismerteti.

1. táblázat

Plazmid	Transzformált sejt/μg DNS
pPS47 (phleo^R)	37
pPS54 (phleo^R, pyrG)	186

8. példa

Az AT klónok identitásának biológiai és biokémiai bizonyítása

Az AT klónok identitását biológiailag a P. chrysogenum ATCC 28089, npe 8 egy aciltranszferáz-negatív mutánsának kiegészítésével igazoljuk.

Az ATCC 28089 npe 8 törzs egy uracil-függő származékából, az ATCC 28089 npe8 pyrG (CBS 512.88) sejtekből, 2.10^7 protoplasztot készítünk. A protoplasztokat 5 μg pUC13::pyrG szelektív plazmidból és 15 μg lambda B21 DNS-ből álló keverékkel kotranszformáljuk olyan módon, ahogyan azt előzőleg leírtuk (EP-A-260762).

Több száz transzformált sejtet kapunk, amelyekből a konidiumokat összegyűjtjük és az 1. példa szerinti komplex termelő táptalajt tartalmazó lemezekre visszük, Petri csészénként 1–10 telep sűrűségben. A lemezeket 3 napig 25 °C-on inkubáljuk, majd rárétegezünk penicillin érzékeny Bacillus subtilis indikátor törzsből készült spóra szuszpenziót. A lemezeket egy éjszakán át 30 °C-on inkubáljuk, majd meghatározzuk a baktérium pázsiton kialakult gátlási zónák nagyságát.

Mindkét csoportból több transzformált klón sejtmentes kivonatából meghatározzuk az AT aktivitást: a micéliumokat két napos növekedés után összegyűjtjük – úgy, ahogy ezt a 3. példában leírtuk – mossuk, folyékony nitrogénben fagyasztjuk és porítjuk. Minden meghatározáshoz 2,5 g őrölt micéliumot szuszpendálunk 5 mM DTT és 5 mM EDTA tartalmú 50 mM-os kálium-foszfát pufferben (pH = 8,0) – a végső térfogat 12,5 ml – és a szuszpenziót 25 percig kevertetjük. A sejtmentes kivonatot úgy kapjuk, hogy a szuszpenziót 5 percig 1000 g mellett centrifugáljuk.

Az AT aktivitás meghatározásakor 2 ml sejtmentes kivonatot 0,1 ml DTT-vel (10 mg/ml), 0,2 ml 6-amino-penicillánsavval (10 mg/ml) és 0,2 ml fenilacetil-koenzim A oldattal (20 mg/ml) inkubálunk 25 °C-on.

A reakciót 15 és 30 perc múlva azonos mennyiségű metanol hozzáadásával állítjuk le és a mintát lecentrifugáljuk (20 perc; 5 000 g). A felülúszót penicillin G tartalomra vizsgáljuk az ismert kromatográfiás (HPLC) módszerekkel. Egy tipikus kísérlet eredményét a 2. táblázatban foglaljuk össze. Az adatok azt mutatják, hogy a transzformált törzsek – (3) és (4) – AT aktivitása 2–3-szor felülmúlja a vad-típusú törzs (5) AT aktivitását, ami egybevág a megnövekedett génmennyiséggel.

Az IPNS plusz AT csoportot beklónozzuk a pP554-be, s így kapjuk a pGJO1 A és B vektort (lásd a 6. ábrát), valamint a pP547-be, amikor a GJO2 A és B vektorhoz jutunk (lásd a 7. ábrát). Egy B21 lambda klónból származó 5 kb SalI fragmentumot (lásd 2. ábrát) tompa végűvé alakítunk T4 DNS polimerázzal, majd bekötjük a pP554 vagy pP547 egyetlen HindIII helyére, miután e vektorokat T4 DNS polimerázzal kezeltük.

2. táblázat

Törzs	Transzformáló vektor	Gátlási zóna	Képződött penicillin G egység*/mg protein		AT másolatok száma Southern hibridizálással meghatározva
			15 perc után	30 perc után	
1) CBS 512.88	pUC13::pyrG	–	vizsgálva	0,9	1**
2) u. az	pUC13::pyrG plusz lambda B21	–	1,7	1,1	1**
3) u. az	u. az	+	11,9	9,5	> 1
4) u. az	u. az	+	10,8	7,0	> 1
5) ATCC 28089 nem transzformált		+	4,5	2,7	1

* relatív AT aktivitás a kivonatban

** mutáció következtében inaktív

9. példa

Megnövekedett penicillintermelés kriptikus Y génnel transzformált gazdatörzsben

Annak érdekében, hogy bemutassuk azoknak a géneknek a hatását, amelyekről megállapítottuk, hogy résztvesznek a penicillintermelésben, a Penicillium gazda törzsben megnöveltük egy ilyen génszámát. Úgy jártunk el, hogy az „Y" gént, amelyet a B9, L5 és G5 klón tartalmaz, beklónoztuk 3,0 kb BamHI plusz SphI fragmentum gyanánt a pP547-be. A kapott pRH05 jelű szerkezettel P. chrysogenum Wis 54–1255 (ATCC 28089) sejteket transzformáltunk és a fleomicin rezisztens klónokat izoláltuk. Több klónt vizsgáltunk penicillintermelésre, rázott palackokban.

Egy ilyen módon izolált transzformált sejttel kapott eredményeket a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat

Törzs	Relatív penicillintermelés
ATCC 29089	100
ATCC 28089::pRH05	122

Southern blot analízissel bizonyítottuk, hogy az Y génből nagyobb mennyiséget tartalmaz a transzformált sejt, mint a nem transzformált gazdasejt. Tehát a

találmány szerinti eljárással izolált kriptikus gén, azaz az Y gén lényegesen megnövelte a penicillintermelést.

Az Y gén átiratának nagyságát Northern blot hibridizációval határoztuk meg: az átírt szekvencia körülbelül 1,0 kb hosszúnak bizonyult.

10. példa.

Megnövekedett penicillin-termelés pGJO2 A-val transzformált gazdasejtekben

Hogy tanulmányozzuk az [IPNS plusz AT] géncsoport hatását a penicillintermelésre, azzal szemben, amikor az IPNS gén egyedül van (lásd fent), az ATCC 28089 törzsből (= Wis 54–1255) 2.10^7 protoplasztot transzformálunk pGJO2 A-vel (6. ábra) az EP-A-260762 számú európai szabadalmi bejelentésben leírt eljárás használatával. A transzformált sejteket 30 μg/ml fleomicin koncentráció alkalmazásával szelektáljuk. Mintegy száz transzformált sejtet és hasonló számú kontroll transzformált sejtet (ezek csak a pP547 vektorral vannak transzformálva) vizsgáltunk meg a termelés szempontjából, a 8. példában leírt bioassay-t használva. Huszonhat olyan transzformált sejtet találtunk, amelyeknél a gátlási gyűrű átmérője szignifikánsan nagyobb volt, mintha kontroll transzformált sejteknél, s ezek termelését rázott palackokban vizsgáltuk. E transzformált sejtek penicillintermelését összehasonlítottuk nyolc kontroll transzformált sejt átlag termelésével: a huszonhat transzformált sejt termelésének átlaga 18%-al nagyobb volt, mint a kontroll transzformált sejtek termelésének átlaga, míg két kiválasztott transzformált sejtnél úgy találtuk, hogy körülbelül 40%-al több penicillint termel, mint a kontroll transzformált sejtek átlagosan. Ennek grafikus ábrázolása a 9. ábrán látható. Tehát az [IPNS plusz AT] géncsoport eredményesek alkalmazható a P. chrysogenum törzs javítására.

11. példa

Kozmid gyűjtemény készítése Penicillium chrysogenumból

A P. chrysogenumból kromoszómális DNS-t izolálunk, melyet úgy kezelünk, ahogyan az 1. példában leírtuk. A DNS részleges emésztése után 20–35 kb nagyságú fragmentumokat izolálunk és a BamHI-gyel emésztett pP507 kozmid vektorba (lásd az EP-A-0260762 számú európai szabadalmi bejelentést és a 4. ábrát) ligáljuk standard technikák segítségével (például: Maniatis és mtsai, lásd fent). A ligázos keveréket in vitro pakoljuk és a fág lizátumot E.coli HB101 sejtekbe (ATCC 33694) visszük át, ugyancsak a szakterület ismert módszerei segítségével. A befogadó friss telepeket 10 ml L-táplevesben (litere 10 g NaCl-t, 10 g Bacto Tryptont és 5 g Bacto élesztőkivonatot tartalmaz) tenyésztjük ampicillin szelekció mellett. A kozmid DNS-t izoláljuk és a beépült DNS jelenlétét EcoRI-el való emésztéssel ellenőrizzük. Az inszertumokat tartalmazó kozmidokat mikrotitráló lemezeken, –20 °C-on tároljuk.

12. példa

Az IPNS gént tartalmazó HM193 kozmid izolálása

Az IPNS gént és határ-régióit nagy számban tartalmazó kozmid klónok izolálása céljából a 11. példa szerinti kozmid gyűjteményt IPNS gént tartalmazó klónokra szűrjük. Az 1. példa szerinti lambda fág gyűjteménnyel szemben a kozmid gyűjteményt használjuk, mivel a kozmid vektorokról tudjuk, hogy nagyobb inszertumokat (20–40 kb) tartalmaznak, mint a lambda vektorok (9–23 kb). A P. chrysogenum IPNS génjének N-terminális aminosav szekvenciája alapján készített két oligonukleotidot használtuk szondák gyanánt:

5' – TTC GGC GAT AAC ATG GAG -3' és 5' – TTC GGC GAT AAT ATG GAG – 3'. A szondákat a szakterület standard technikáinak használatával jeleztük (például: Maniatis és mtsai; lásd fent).

A szondákkal hibridizáló kozmidokat izoláljuk és az IPNS gén jelenlétét szubklónozással és szekvencia analízissel bizonyítjuk, valamint azzal, hogy az adatokat összehasonlítjuk az L. Carr és mtsai (lásd fent) által közölt szekvencia adatokkal. A teljes HM.193 kozmid előzetes fizikai térképét a 8. ábra mutatja be. A kozmid klón körülbelül 23 kb DNS-t tartalmaz az IPNS génhez képest upstream; a klón csak részben fedi a B21 és G2 lambda klónokat (lásd a 2. ábrát).

13. példa

A nemtermelő mutánsok kiegészítése a HM193 kozmid felhasználásával

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk vannak-e jelen más gének is a HM193 kozmidon (CBS 179.89) az ismert IPNS génen kívül, az említett kozmiddal és a pGJ02 A-val kotranszformáltunk más npe törzset. Az npe 5 törzsről (CBS 178.89) kimutattuk, hogy IPNS és AT aktivitást is tartalmaz, és nincs ACVS aktivitása. Hogy kizárjuk az IPNS gén egyedüli bevezetésén alapuló kiegészülést, megvizsgáltuk a csak pGJ02 A szerkezettel transzformált sejteket is. A transzformálást úgy végeztük, ahogyan itt az előbbiekben leírtuk, a kotranszformált sejteket pedig az előzőekben leírt bioassayt használva analizáltuk. Az eredményeket a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat

Törzs	Vizsgált (ko)transzformált sejtek	Gyűrűt képező (ko) transzformált sejtek	
		száma	%-a
npe5	31	0*	0
npe5::pGJ02 A	72	1*	1,3
npe5::pGJ02 A+HM193	19	5	26

* Az npe5 törzsnél körülbelül 1,5% a reverzió gyakorisága.

A 4. táblázat adatai arra utalnak, hogy a HM193 kozmid képes kiegészíteni az npe5 mutáns törzset, míg a pGJ02 A plazmid ezt a mutációt nem képes kiegészíteni. Tehát más olyan gént/géneket azonosítottunk az IPNS géntől kiindulva, amelyek a penicillin bioszintézisében résztvesznek. Ez a gén ugyanazon a kozmidon van jelen, amely az [IPNS plusz AT] géncsoport részét is tartalmazza és így az [IPNS plusz AT] géncsoporttól kisebb, mint 23 kb távolságra van jelen.

14. példa

A HM193 kozmidon jelenlévő ACVS génnek biokémiai és biológiai bizonyítéka

Azt vizsgálandó, hogy vajon a HM193 kozmidon lévő gének egyike kódolja-e az ACVS-t, meghatároztuk az ACVS aktivitást az npe5 törzsben, mégpedig e törzs olyan mutáns sejtjeiben, amelyeket csak pGJ02 A-val transzformáltunk és az npe5 olyan sejtjeiben, amelyeket a pGJ02 A-val plusz a HM193 kozmiddal kotranszformáltunk.

A törzseket 48 órán át laktóz és 0,75% fenoxiecetsav tartalmú termelő táptalajon tenyésztjük. Sejtmentes kivonatokat készítünk és ACVS aktivitásukat lényegében a Van Liempt [H. van Liemnt és mtsai, J. Biol. Chem., *264,* 3680–3684 (1 989)] által leírt módon határozzuk meg. Az A pufferrel való extrahálást 30 percig folytatjuk. A vizsgálatban használt jelzett valin 12,5 μCi értékű és a reakciót 30 perc eltelte után állítjuk le. A reakcióelegyet a leírtak szerint csapjuk ki és ezután Porapak Q oszlopokra visszük fel. Az oszlopokat 2 ml kiegyensúlyozó pufferrel mossuk és 2×1 ml metanollal oldjuk ki. Az ACV tartalmat HPLC-vel határozzuk meg. Egy RP18 oszlopra 100 ml-es mintákat injektálunk és 10% metanol és 0,1 mM DTT tartalmú 50 mM KH_2PO_4 -el (pH = 6,00) oldjuk ki szobahőmérsékleten. Az átfolyási sebesség 1,0 ml/perc és az észlelést Berthold LB503 szcintillációs detektorral végezzük, 200 μl-es cella alkalmazásával. A jelzett csúcsot, amelynek a retenciós ideje azonos a redukált tripeptiddel, összegyűjtjük és a jelzett mennyiséget folyadék szcintillációs análizátorral (Packard) való számlálással határozzuk meg.

Az eredményeket az 5. táblázatban foglaljuk össze. ACVS aktivitást nem észleltünk az npe5-ből készített sejtmentes kivonatban, sem ennek PGJ02 A-val [IPNS plusz AT] transzformált mutánsainak sejtmentes kivonataiban, de a Wis 54–1255-ből készített és a pGJ02 A-val és HM193-al kotranszformált sejtekből készített sejtmentes kivonatok ACVS aktivitást tartalmaztak. Ebből azt következtettük, hogy az ACVS aktivitást visszaállítja az npe5 törzsben a HM193 kozmid bevezetése. A sejtmentes kivonatokban lévő polipeptidek SDS-poliakrilamid gél elektroforézises analízisével az utóbbi törzsben kimutattunk egy 250 kD sáv jelenlétét, míg az előbbi törzsnél ez a sáv hiányzott. Az A. nidulans ACVS enzimeinek a molekulatömege körülbelül ilyen nagyságú (Van Liempt, lásd fentebb) és mi a penicillium enzimnek is hasonló molekulatömeget tulajdonítunk. Ennélfogva arra a következtetésre jutottunk, hogy a HM193 kozmid tartalmazza az ACVS gént.

5. táblázat

Törzs	cpm.10^3 +ATP	–ATP	250 kD polipeptid
Wis 54–1255	490,8	nem vizsgáltuk	+
npe5	3,3	nem vizsgáltuk	–
npe5::pGJ02 A	2,5	nem vizsgáltuk	–
npe5::pGJ02 A +HM193	261,3	1,1	+

15. példa

Az Acremonium chrysogenum transzformálása

50 ml MMC táptalajt tartalmazó 250 ml-es levegőztetett rázott palackokat, palackonként két lemeznyi spórával oltunk be. A sejteket 6 napon át tenyésztjük Le Page-Campbell spóraképző táptalajon. Az MMC táptalaj összetétele literenként a következő: 31,6 g szacharóz, 2,2 g glükóz, 3 g $CaCO_3$, 0,5 g szárított kukoricalekvár, 7,5 L-aszparagin, 0,22 g ammóniumacetát, 15 g KH_2PO_4, 21 g K_2HPO_4, 0,75 g Na_2SO_4, 0,18 g $MgSO_4.7H_2O$, 0,8 g $CuSO_4.5H_2O$. A Le Page-Campbell táptalaj összetétele literenként a következő: 1 g glükóz, 1 g élesztőkivonat, 0,5 g NaCI, 10 g $CaCl_2$, 20 g agár; pH = 6,8. A tenyészeteket 24–30 órán át 28 °C-on inkubáljuk és 200 ford./perc mellett rázzuk. A micéliumokat nylon szűrőn (pórusnagyság: 25 μm) átszűrve gyűjtjük össze és a felesleges vizet nyomkodással távolítjuk el. Az izolált micéliumot 50 mg/ml mennyiségben 10 mM DTT tartalmú TPC pufferben (0,8 mM NaCI, 0,02 mM $MgSO_4$, 50 mM kálium-foszfát puffer, pH – 7) szuszpendáljuk; a micéliumot 28 °C-on inkubáljuk 90 percig, rázással. A micéliumokat centrifugálással (5 perc; 2 500 ford./perc; asztali centrifuga) gyűjtjük össze, majd körülbelül 25 mg/ml koncentrációban szuszpendáluk 2 mg/ml Novozym (TM) tartalmú TPC pufferben. A szuszpenziót rázás mellett 2–5 órán át 28 °C-on inkubáljuk. A protoplasztokat 25 μm pórusú nylon szűrőn átszűrjük és centrifugálással izoláljuk (5 perc; 2 000 ford./perc; asztali centrifuga). A protoplaszt üledéket háromszor mossuk 0,8 mólos NaCl-oldattal. A protoplasztokat 10 ml NMC pufferben (0,8 M NaCI, 50 mM $CaCl_2$, 10 mM MOPS; pH = 7) reszuszpendáljuk, ülepítjük és újra szuszpendáljuk ötszörös üledéktérfogatnak megfelelő mennyiségű NMC pufferben (körülbelül 10^8 protoplaszt/ml), majd hozzáadunk 0,1 térfogat CCM puffert [0,8 M NaCI, 50 mM $CaCl_2$, 10 mM MOPS; pH –7,18% polietilénglikol (PEG, Sigma)].

Minden transzformációhoz a DNS-t és 100 μl protoplaszt szuszpenziót mérünk egy 10 ml-es kémcső aljára, a szuszpenziót óvatosan elkeverjük és jégen tartjuk 20 percig. Ezután minden kémcsőhöz 500 μl CCM puffert adunk és a keveréket további 20 percig tartjuk szobahőmérsékleten. A transzformációs keveréket 600 μl NMC pufferrel hígítjuk fel, majd 10 μg/ml fleomicint tartalmazó TSA-szacharóz lemezre visszük [S.V. Queener és mtsai, Microbiology (ASM), 468–472 (1985)]. A lemezeket 2–6 napon át 28 °C-on inkubáljuk. A transzformált sejteket phleomycin tartalmú lemezekre oltjuk át; növekedés után, a Le Page-Campbell spóraképző táptalajon kifejlődnek a spórák.

16. példa

Egy Acremonium chrysogenum nemtermelő mutáns törzs kiegészítése és a transzformált sejtek penicillintermelése

Az Acremonium chrysogenum N2 törzset [Shirafuji és mtsai, Agric.Biol.Chem., *43,* 155–160 (1979); J.L.Capman és mtsai, Developments in Industrial Microbiology, *27,* 165 (1987), szerk: G. Pierce, Society for Industrial Microbiology; F.R.Ramos és mtsai, FEMS

Microbiology Letters, *35,* 123 (1986) a 15. példában leírtak szerint P. chrysogenum [IPNS plusz AT] géncsoportot tartalmazó G2 lambda fággal (2.ábra) transzformáljuk. A kotranszformációs kísérletben szelektív konstrukcióként a fleomicin rezisztencia gént tartalmazó pP547-et használjuk. Az N2 törzs IPNS génjében mutáció történt (Shirafuji és mtsai, lásd fent) és így nem termel cephalosporin C-t.

A kotranszformált sejteket izoláljuk és a termelést illetően teszteljük. Antibiotikum termelő klónokat 25%-os gyakorisággal izoláltunk, ami azt jelezte, hogy a P. chrysogenum IPNS génje kifejeződik az A. chrysogenumban és hogy a P. chrysogenum enzim képes funkcionálisan helyettesíteni az A. chrysogenum enzimet. A transzformált sejtekkel beoltunk olyan Caltrider és Niss-féle [Appl. Microbiol. *14,* 746–753 (1966)] komplex szilárd termelő táptalajt, mely részben tartalmaz, részben nem tartalmaz fenil-ecetsavat; a táptalajokat 27 °C-on 5 napon át inkubáljuk és a termelődött antibiotikumokat Micrococcus luteus-szal vizsgáljuk, amely igen érzékeny penicillin G-re, de nem érzékeny a cephalosporin C-re (legalább 10 μg/ml felett) és E.coli E552231 sejtekkel is vizsgáljuk, amely cephalosporin C-re szuperérzékeny törzs, de kevéssé érzékeny penicillin G-re. A Micrococcus luteus és E.coli E552231 törzsre vonatkozóan lásd a következő közleményeket: J.M. Luengo és mtsai, J. Antibiotics, *39,* 1565 (1986); M. J. Lopez-Nieto és mtsai, Appl. Microbiol. Biotechnol., *22,* 343 (1985); G.Revilla és mtsai, J. Bacteriol., *168,* 947 (1986). Több transzformált törzs vizsgálatának eredményét a 6. táblázat tartalmazza. A M. luteus-szal szemben aktív azon antibiotikumok összehasonlítása, amelyek a fenil-ecetsav (PA) jelenlétében és távollétében termelődtek, azt mutatja, hogy közülük többnél az antibiotikumtermelés erősen stimulálódott PA révén, amiből arra lehet következtetni, hogy penicillin G termelődött. A PA nélkül termelt antibiotikum valószínűleg penicillin N vagy izopenicillin N lehet; mindkét vegyületnek erős antibiotikus aktivitása van. A kiválasztott transzformált sejtet 0,8 mg/ml PA-val kiegészített folyékony termelő táptalajon (Caltrider és Niss, 1966, lásd fent) tenyésztettük.

A képződött penicillin G-t dietil-éterrel való extrahálással izoláltuk, miután a vizes fázis pH-ját foszforsavval 2-re állítottuk be.

A penicillin G szerves fázisból extrahálható, hidrofób oldallánca (PA) következtében. A cephalosporin C (ennek hidrofil oldallánca van: α-amino-adipinsav) nem extrahálódik az organikus fázisba.

A szerves fázis elválasztása után következik a 0,1 mólos kálium-foszfát pufferrel (pH=7,0) való extrahálás; ennek az extrakciónak az a következménye, hogy a penicillin G átmegy a vizes fázisba.

Az antibiotikus aktivitást a vizes fázis tartalmazza, ezt bizonyítja a bioassay-vel való meghatározás; a M. luteus érzékenyebb volt ezzel az aktivitással szemben, mint az E.coli.

Az aktivitás kioltható kereskedelmi penicillinre specifikus penicillinázzal (Difco) való inkubálással. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy valóban Penicillin G-t termeltek a transzformált sejtek. Ezenfelül a vizes fázis egy mintáját HPC-vel analizáltuk, s e vizsgálat (retenciós idő, elúciós profil) eredménye szerint az antibiotikus hatású vegyület penicillin Gnek bizonyult. Egy hasonló kísérletben, amikor az N2 gazdatörzs fermentlevét használtuk, azt találtuk, hogy benne nem volt antibiotikum aktivitás, minthogy ez a törzs nem termel penicillin G-t. Tehát a P.chrysogenum AT gén A. chrysocrenumban is kifejeződik és azt a képességét, hogy penicillin G-t termel, ez rendes körülmények között a Penicillium és Aspergillus fajokra korlátozódik – azáltal vittük át az A. chrysogenumba, hogy a P. chrysogenum [IPNS plusz AT] géncsoportjával transzformáltuk.

6. táblázat

Transzformált sejt	A bioassay* gátlási zónáinak átmérői			
	M. luteus		E.coli	
	+PA	–Pa	+PA	–PA
1	36	24	29	29
2	29	23,5	22	13
3	28	11,5	30	30
4	21	18	28	27
5	34	29	10	7
6	20	14	10	7
7	22	16	19	17,5
8	43	36	29	28

*Megjegyzés: a gátlási zóna átmérője arányos az antibiotikum mennyiségének logaritmusával.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás legalább két, a baktériumok vagy gombák anyagcseréje folyamán kifejeződő és egy másodlagos metabolit termelésében közvetlenül vagy közvetve részvevő gént tartalmazó DNS fragmentumok izolálására, *azzal jellemezve,* hogy

i) egy, az illető másodlagos metabolit termelésére képes baktériumból vagy gombából preparált DNS-gyűjteményt a baktériumnak vagy gombának az illető másodlagos metabolit termelésére képes első tenyészetéből származó mRNS-ből vagy DNS-ből kapott próbákkal szűrjük;

ii) az említett DNS-gyűjteményt az illető baktériumnak vagy gombának az említett másodlagos metabolit termelésére képtelen második tenyészetéből származó mRNS-ből vagy DNS-ből kapott próbákkal szűrjük; majd

iii) azonosítjuk a legalább két gént tartalmazó olyan fragmentumokat, amelyek az említett első tenyészetben átíródnak, a második tenyészetben viszont nem íródnak át; és

iv) ezeket a fragmentumokat izoláljuk. (Elsőbbsége: 1988. 08. 11.)

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy gombák anyagcseréje folyamán kifejeződő és egy ß-laktám antibiotikum termelésében közvetlenül vagy közvetve részvevő gént tartalmazó DNS fragmentumot izolálunk. (Elsőbbsége: 1988. 08. 11.)

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az izopenicillin N szintetázt (IPNS), az aciltranszferázt (AT) vagy az ACV szintetázt (ACVS) kódoló gének legalább egyikét és egy vagy két további gént tartalmazó DNS fragmentumot izolálunk. (Elsőbbsége: 1988. 08. 11.)

4. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az izopenicillin N szintetázt (IPNS), az aciltranszferázt (AT) és az ACV szintetázt (ACVS) kódoló gének közül legalább két szomszédos gént tartalmazó DNS fragmentumot izolálunk. (Elsőbbsége: 1988. 08. 11.)

5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy nemtermelő típusú mutációt kiegészítő DNS fragmentumot izolálunk. (Elsőbbsége: 1988. 08. 11.)

6. Eljárás egy ß-laktám antibiotikum fokozott bioszintetikus termelésében résztvevő rekombináns vektor előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

i) egy megfelelő vektort egy alkalmas restrikciós enzimmel emésztünk;

ii) az emésztett vektor megfelelő fragmentumát ligáljuk

i') egy 2–5. igénypontok bármelyike szerint izolált DNS fragmentummal,

i") egy, az említett 13-laktám antibiotikumot termelő törzs szelektálásához alkalmas markerrel és

i'") adott esetben egy, a gazdasejt vektorral való transzformálásának hatásosságát fokozó szekvenciával, és

iii) izoláljuk a rekombináns vektort. (Elsőbbsége: 1988. 08. 11.)

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a pGJ02A vagy pGJ02B vektort, vagy a HM193 kozmidot állítjuk elő. (Elsőbbsége: 1989. 04. 21.)

8. Eljárás egy ß-laktám antibiotikumot fokozott mértékben termelő transzformált baktérium vagy gomba gazdasejt előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

i) egy, a 2–5. igénypontok bármelyike szerint előállított DNS szerkezettel vagy egy 6–7. igénypontok bármelyike szerint előállított vektorral egy alkalmas baktérium vagy gomba gazdasejtet transzformálunk;

ii) a kapott transzformált gazdasejteket klónozzuk; és

iii) kiválaszjuk a ß-laktám antibiotikumot, fokozott mértékben termelő klónokat. (Elsőbbsége: 1988. 08. 11.)

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy Penicillium, Aspergillus vagy Acremonium gazdasejtet, előnyösen Penicillium chrysogenum sejtet transzformálunk. (Elsőbbsége: 1988. 08. 11.)

10. Eljárás penicillin bioszintetikus gének izolálására, *azzal jellemezve*, hogy egy izolált, izopenicillin N szintetázt (IPNS), aciltranszferázt (AT) vagy ACVS-t kódoló gének legalább egyikét tartalmazó DNS szerkezetet alkalmazva egy adott génkönyvtárból a „kromoszóma-séta technika" segítségével izolálunk egy másik, a penicillin bioszintézisben közvetlenül vagy közvetve résztvevő DNS szerkezetet. (Elsőbbsége: 1988. 08. 11.)

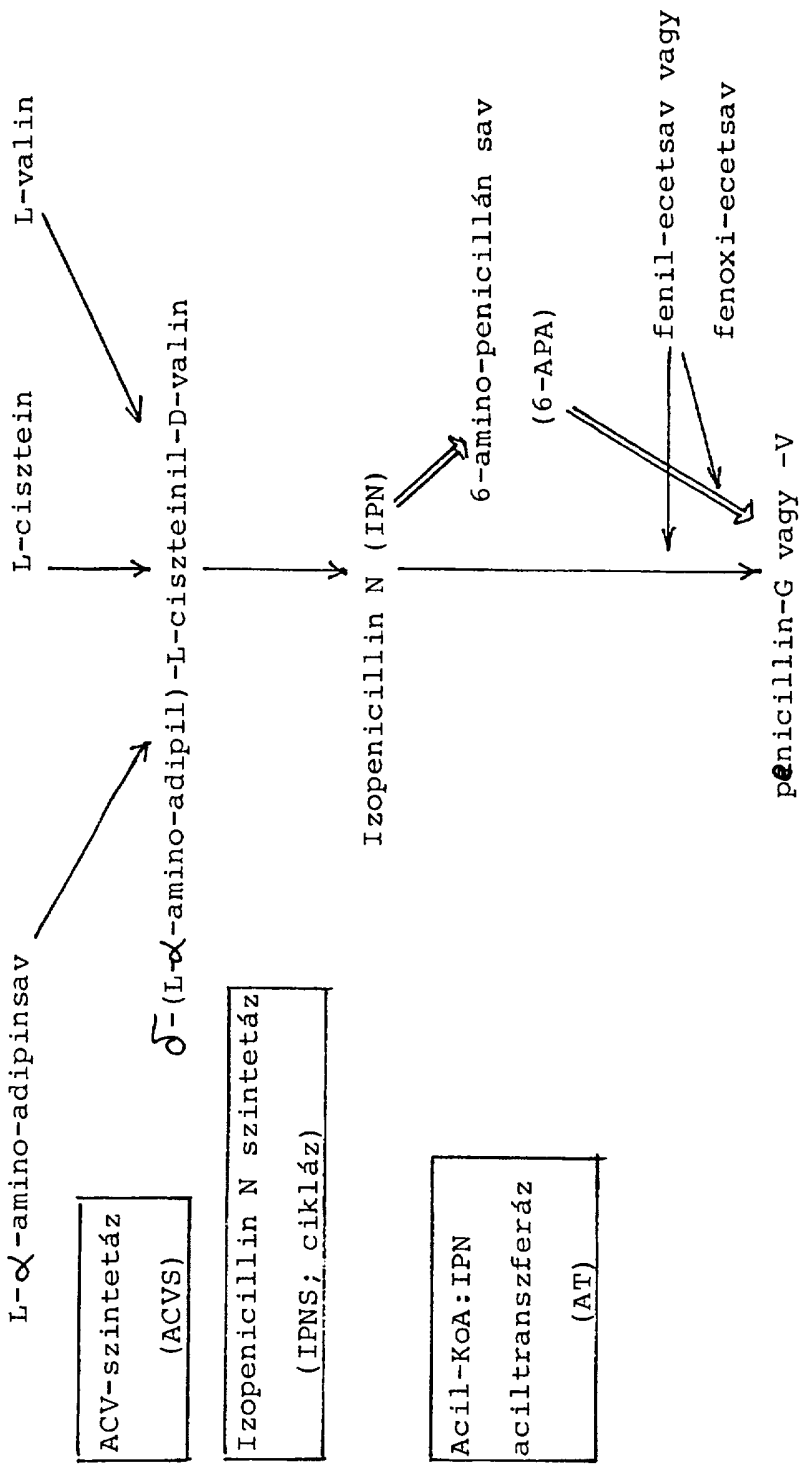
11. Eljárás másodlagos metabolit mikrobiális gazdasejtben való termelésére vagy termelésének fokozására, *azzal jellemezve*, hogy

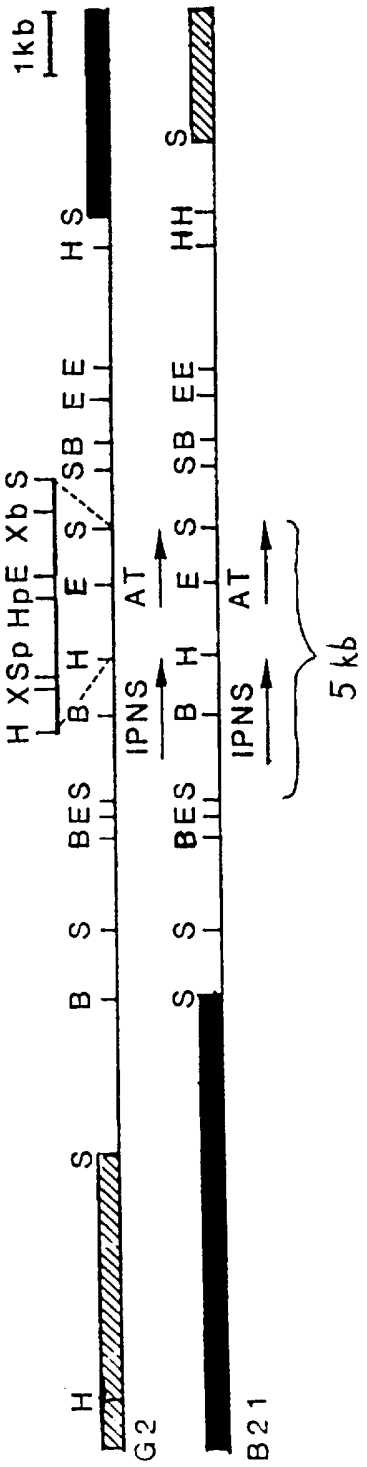
i) egy, az 1 – 5. igénypontok bármelyike szerint izolált DNS fragmentumot tartalmazó szerkezettel vagy egy 6. igénypont szerint előállított vektorral egy bakteriális vagy gomba gazdasejtet transzformálunk;

ii) a transzformált sejteket klónozzuk; és

iii) azonosítjuk a másodlagos metabolitot termelő klónokat, és elkülönítjük a másodlagos metabolitot a transzformálás előtt nem, de utána termelő klónokat, vagy az eredetileg termelő és a transzformálás után legalább 5%-kal magasabb szinten termelő klónokat, és ezeket tenyésztjük. (Elsőbbsége: 1988. 08. 11.)

1. ábra


L-α-amino-adipinsav
L-cisztein
L-valin
δ-(L-α-amino-adipil)-L-cisztеinil-D-valin
Izopenicillin N (IPN)
6-amino-penicillán sav
(6-APA)
fenil-ecetsav vagy
fenoxi-ecetsav
penicillin-G vagy -V
ACV-szintetáz
(ACVS)
Izopenicillin N szintetáz
(IPNS; cikláz)
Acil-KoA:IPN
aciltranszferáz
(AT)



2. ÁBRA

```
        10          20          30          40          50          60
AAGCTTTCAGGCAACCTAGGCAACCCAATAGGAACCAAGTGATAGGCCCACCTGCTTTCT

        70          80          90         100         110         120
ATCTAGTCTGGACGGTTGCTATTGGCTCGATCATTGTTTACCATCCCGGCAAAAAGCTCT

       130         140         150         160         170         180
ACAGAGTTGTGCTATTTCTATTCCTGTCTTGGCATGTCCAGGCTGGCTGTTATCGCCTCC

       190         200         210         220         230         240
GTGGTGAACCCTCTTCATGCAAGAGGTCAGTCAATAATGCGCTTCACCGTTCTCGACGAA

       250         260         270         280         290         300
ACTTGGCATCCATGCTCAATCCAGCTCCTCGGCAAGACTAGGCGGATGCAGCAGGGATAC

       310         320         330         340         350         360
TCGAGGTGCCCCAGTTGATGTCCCATCAGTGTCATGCTATGGTCCCAGATTGGTGGCTAC

       370         380         390         400         410         420
GGCCAATATAAATCTCAGCATGCAGTTCCGCCTGCATGATCATCCCCAGGACGCGTTTGT

       430         440         450         460         470         480
CATCTCCGTCAGCCAGGTCTCAGTTGTTTACCCATCTTCCGACCCGCAGCAGAAATGCTT
                                                        MetLeu

       490         500         510         520         530         540
CACATCCTCTGTCAAGGCACTCCCTTTGAAGTAAGTGCTGCACTGAATACCAGATTTTTT
HisIleLeuCysGlnGlyThrProPheGlu

       550         560         570         580         590         600
CCTTCTGAATCTTCCGAGTTCTGACCTGATCCAGATCGGCTACGAACATGGCTCTGCTGC
                                            IleGlyTyrGluHisGlySerAlaAl

       610         620         630         640         650         660
CAAAGCCGTGATAGCCAGAAGCATTGACTTCGCCGTCGATCTCATCCGAGGGAAAACGAA
aLysAlaValIleAlaArgSerIleAspPheAlaValAspLeuIleArgGlyLysThrLy

       670         680         690         700         710         720
GAAGACGGACGAAGAGCTTAAACAGGTACTCTCGCAACTGGGGCGCGTGATCGAGGAAAG
sLysThrAspGluGluLeuLysGlnValLeuSerGlnLeuGlyArgValIleGluGluAr

       730         740         750         760         770         780
ATGGCCCAAATACTACGAGGAGATTCGCGGTGAGTGCCACTTCGGTCTTTCCTACATTTT
gTrpProLysTyrTyrGluGluIleArgG
```

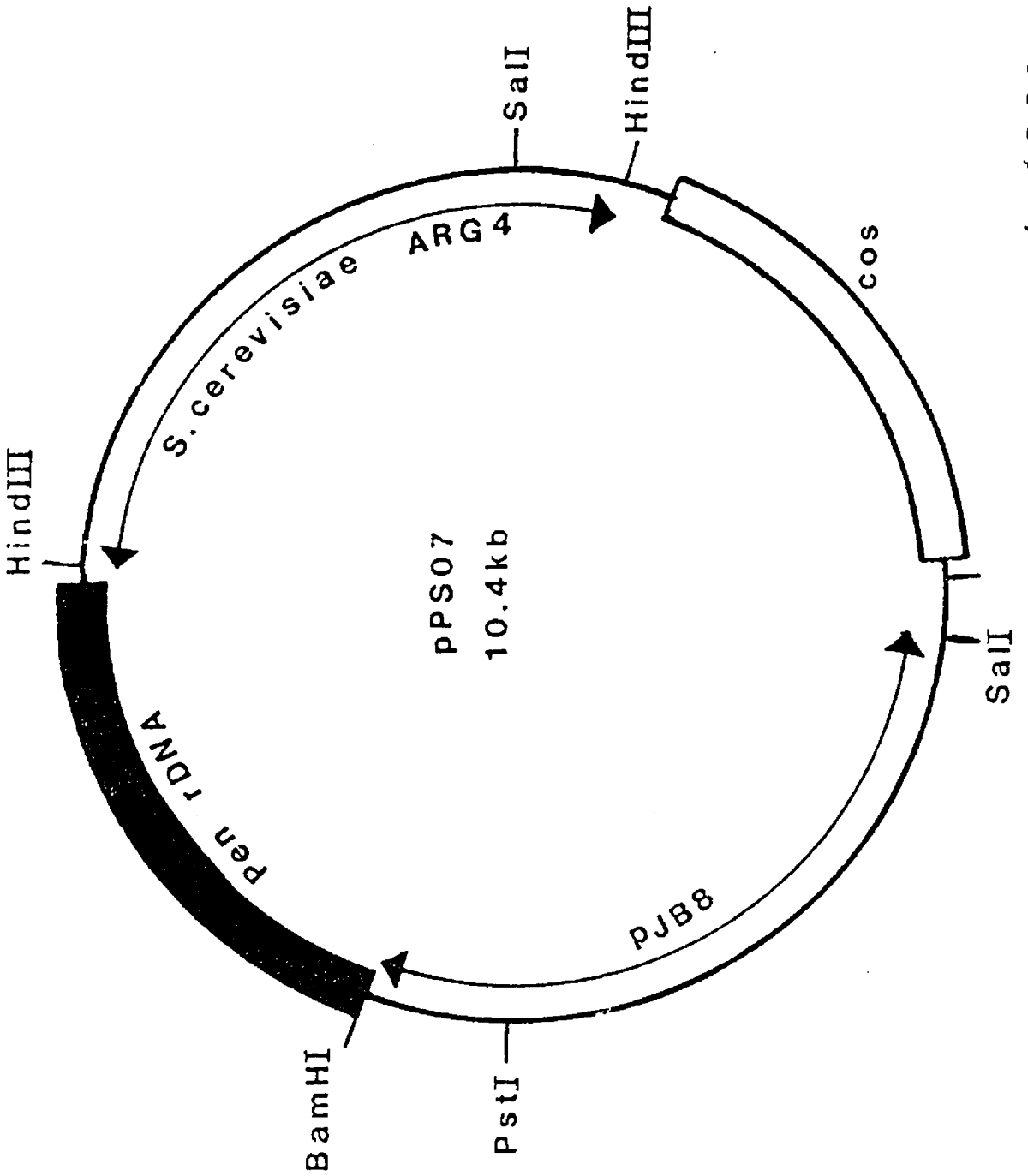
3A. ÁBRA

```
      790        800        810        820        830        840
CTGCACCAATGCTGACCGATGACCCCCGAAAAACCAGGTATTGCAAAGGGCGCTGAACGC
                                      lyIleAlaLysGlyAlaGluArg

      850        860        870        880        890        900
GATGTCTCCGAGATTGTCATGCTTAATACCCGCACGGAATTTGCATACGGGCTCAAGGCA
AspValSerGluIleValMetLeuAsnThrArgThrGluPheAlaTyrGlyLeuLysAla

      910        920        930        940        950        960
GCCCGTGATGGCTGCACCACTGCCTATTGTCAACTTCCAAATGGAGCCCTCCAGGGCCAA
AlaArgAspGlyCysThrThrAlaTyrCysGlnLeuProAsnGlyAlaLeuGlnGlyGln

      970        980        990       1000       1010       1020
AACTGGGATGTACGTTAAGAGATTTTACCTCCTCATTTTATTCCATCGAATTTGCGCCGA
AsnTrpAsp

     1030       1040       1050       1060       1070       1080
CTAATTTGGTTGTTCAAGTTCTTTTCTGCCACCAAAGAGAACCTGATCCGGTTAACGATC
                   PhePheSerAlaThrLysGluAsnLeuIleArgLeuThrIle

     1090       1100       1110       1120       1130       1140
CGTCAGGCCGGACTTCCCACCATCAAATTCATAACCGAGGCTGGAATCATCGGGAAGGTT
ArgGlnAlaGlyLeuProThrIleLysPheIleThrGluAlaGlyIleIleGlyLysVal

     1150       1160       1170       1180       1190       1200
GGATTTAACAGTGCGGGGGTCGCCGTCAATTACAACGCCCTTCACCTTCAGGGTCTTCGA
GlyPheAsnSerAlaGlyValAlaValAsnTyrAsnAlaLeuHisLeuGlnGlyLeuArg

     1210       1220       1230       1240       1250       1260
CCCACCGGAGTTCCTTCGCATATTGCCCTCCGCATAGCGCTCGAAAGCACTTCTCCTTCC
ProThrGlyValProSerHisIleAlaLeuArgIleAlaLeuGluSerThrSerProSer

     1270       1280       1290       1300       1310       1320
CAGGCCTATGACCGGATCGTGGAGCAAGGCGGAATGGCCGCCAGCGCTTTTATCATGGTG
GlnAlaTyrAspArgIleValGluGlnGlyGlyMetAlaAlaSerAlaPheIleMetVal

     1330       1340       1350       1360       1370       1380
GGCAATGGGCACGAGGCATTTGGTTTGGAATTCTCCCCCACCAGCATCCGAAAGCAGGTG
GlyAsnGlyHisGluAlaPheGlyLeuGluPheSerProThrSerIleArgLysGlnVal

     1390       1400       1410       1420       1430       1440
CTCGACGCGAATGGTAGGATGGTGCACACCAACCACTGCTTGCTTCAGCACGGCAAAAAT
LeuAspAlaAsnGlyArgMetValHisThrAsnHisCysLeuLeuGlnHisGlyLysAsn

     1450       1460       1470       1480       1490       1500
GAGAAAGAGCTCGATCCCTTACCGGACTCATGGAATCGCCACCAGCGTATGGAGTTCCTC
GluLysGluLeuAspProLeuProAspSerTrpAsnArgHisGlnArgMetGluPheLeu

     1510       1520       1530       1540       1550       1560
CTCGACGGGTTCGACGGCACCAAACAGGCATTTGCCCAGCTCTGGGCCGACGAAGACAAT
LeuAspGlyPheAspGlyThrLysGlnAlaPheAlaGlnLeuTrpAlaAspGluAspAsn

     1570       1580       1590       1600       1610       1620
TATCCCTTTAGCATCTGCCGCGCTTACGAGGAGGGCAAGAGCAGAGGCGCGACTCTGTTC
TyrProPheSerIleCysArgAlaTyrGluGluGlyLysSerArgGlyAlaThrLeuPhe
```

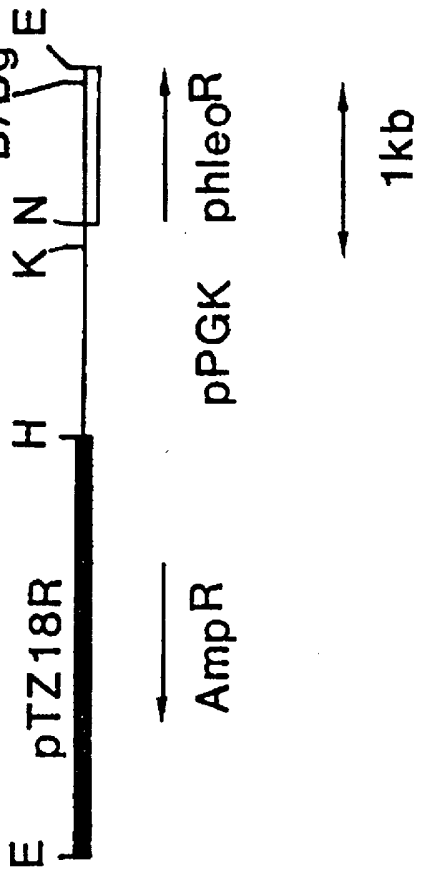
3B. ÁBRA

```
      1630       1640       1650       1660       1670       1680
AATATCATCTACGACCATGCCCGTAGAGAGGCAACGGTGCGGCTTGGCCGGCCGACCAAC
AsnIleIleTyrAspHisAlaArgArgGluAlaThrValArgLeuGlyArgProThrAsn

      1690       1700       1710       1720       1730       1740
CCTGATGAGATGTTTGTCATGCGGTTTGACGAGGAGGACGAGAGGTCTGCGCTCAACGCC
ProAspGluMetPheValMetArgPheAspGluGluAspGluArgSerAlaLeuAsnAla

      1750       1760       1770       1780       1790       1800
AGGCTTTGAAGGCTCTTCATGACGAGCCAATGCATCTTTTGTATGTAGCTTCAACCGACT
ArgLeuEnd

      1810       1820       1830       1840       1850       1860
CCGTCTTCACTTCTTCGCCCCGCACTGCCTACCGTTTGTACCATCTGACTCATATAAATGT

      1870       1880       1890       1900       1910       1920
CTAGCCCCTACCTACACTATACCTAAGGGAGAGAAGCGTAGAGTGATTAACGTACGGGCC

      1930       1940       1950       1960       1970       1980
TATAGTACCCCGATCTCTAGATAGAACATTTAGTAGAGATTAGGATGCCTAACTAATTTA

      1990       2000       2010       2020       2030       2040
ACTTGAGCATTGTCCCGTTCATATTGATTTTCAGTCCATTATACACTCTTAATCGTTTCC

      2050       2060       2070       2080       2090       2100
CGGTAGAAGCCTGATATATACGACCATAGGGTGTGGAGAACAGGGCTTCCCGTCTGCTTG

      2110       2120       2130       2140       2150       2160
GCCGTACTTAAGCTATATATTCTACACGGCCAATACTCAATGTGCCCTTAGCACCTAAGC

      2170       2180       2190       2200       2210       2220
GGCACTCTAGGGTAAGTGCGGGTGATATAGGTGAGAAGTCTTAAGACTGAAGACAGGATA

      2230       2240       2250       2260       2270       2280
TCACGCGTTACCCTGCACCGTACCTACTACCTTCAATATCAACTCTTTCAGGATGGACAG


GGTCGAC
```

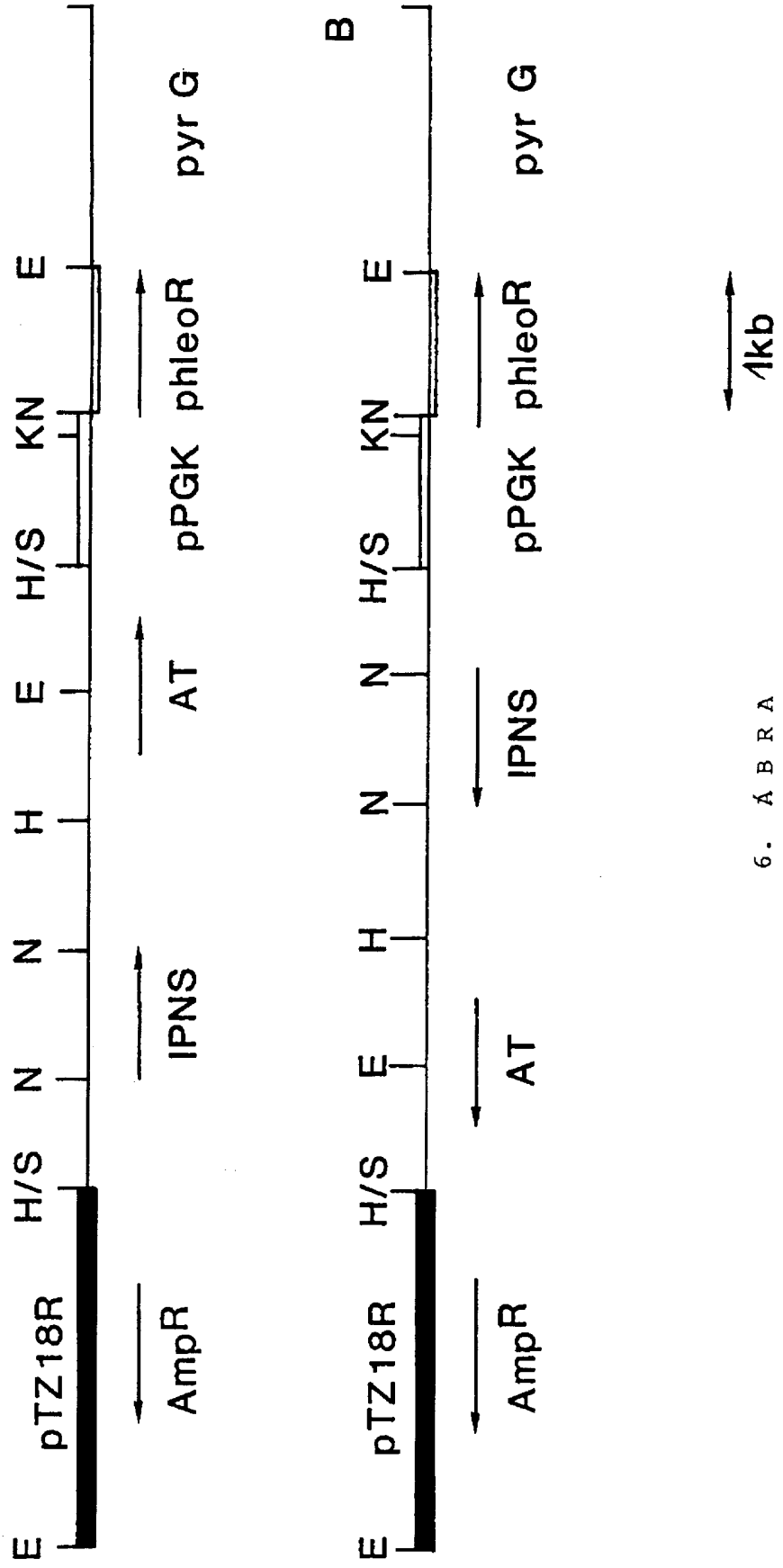
3C. ÁBRA


SalI
HindIII
S. cerevisiae ARG 4
cos
HindIII
pPSO7
10.4kb
SalI
pJB8
Pen rDNA
BamHI
PstI

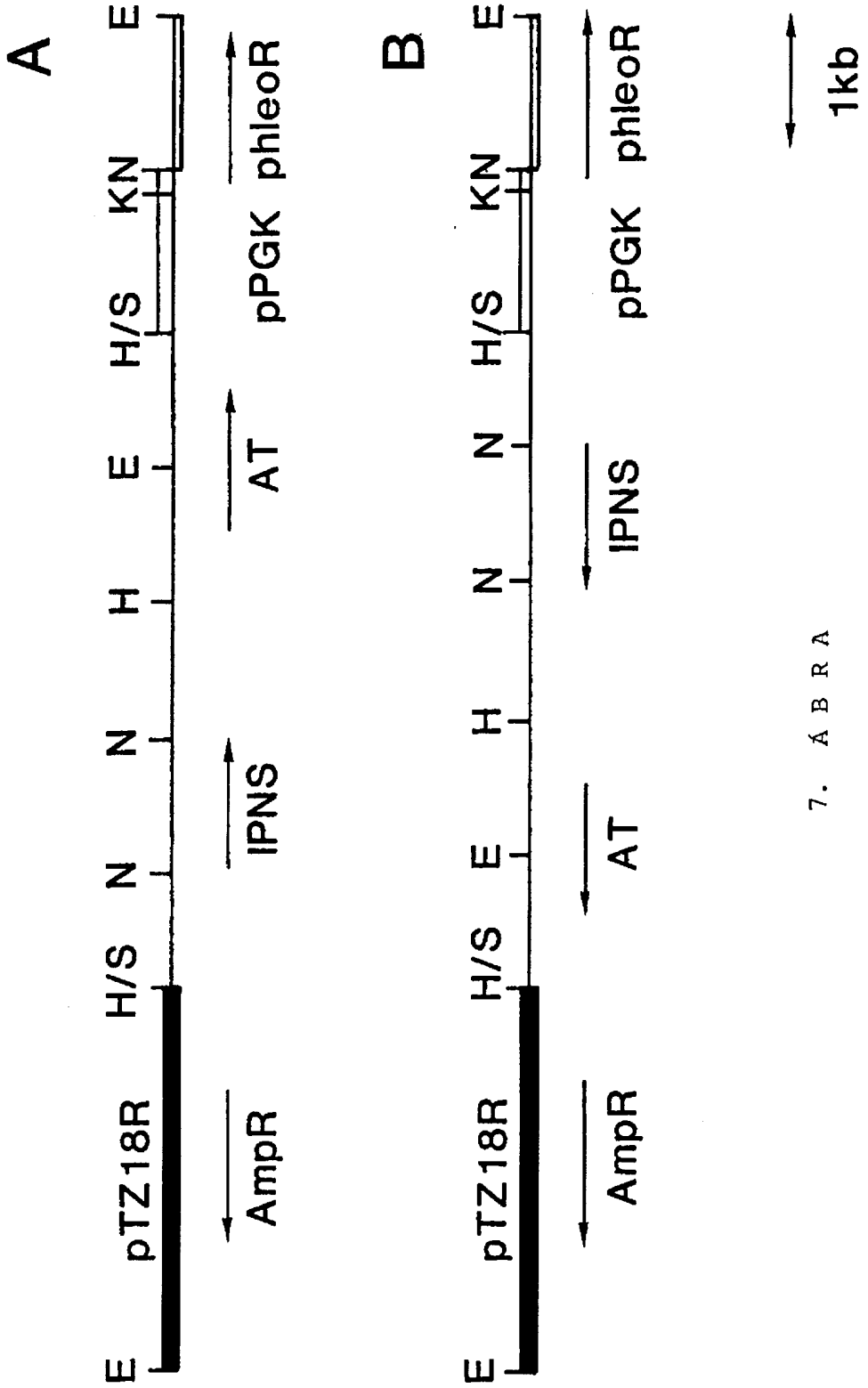
4. ÁBRA



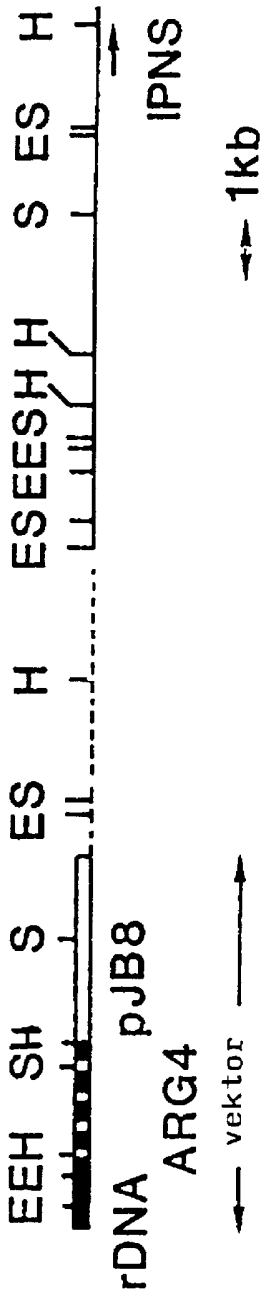
5. ÁBRA


A
E
pTZ18R
H/S
N
N
IPNS
H
E
AT
H/S
pPGK
KN
phleoR
E
pyr G
AmpR
B
E
pTZ18R
H/S
E
AT
H
N
N
IPNS
H/S
pPGK
KN
phleoR
E
pyr G
1kb

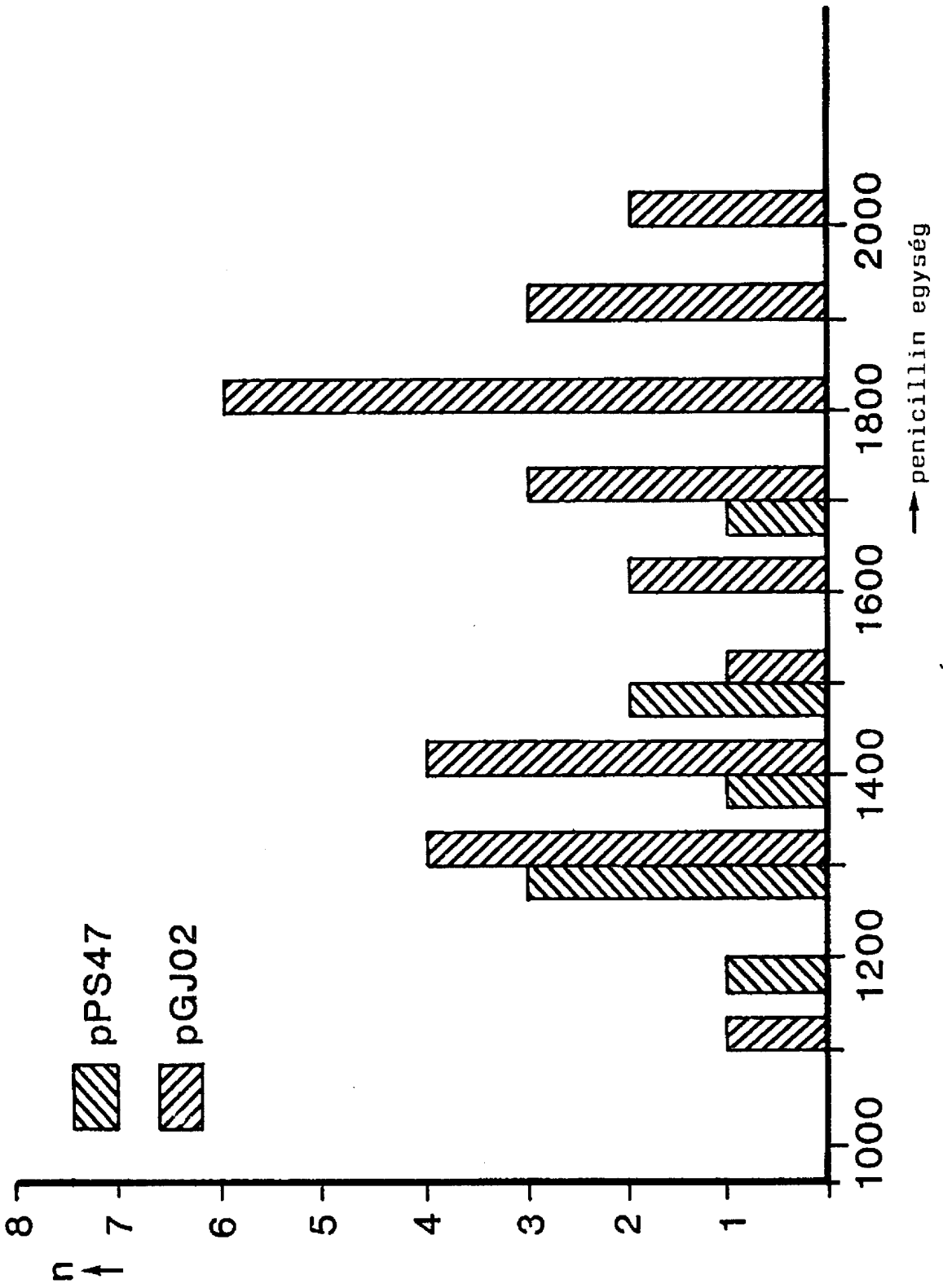
6. ÁBRA


A
E
H/S
N
N
H
E
H/S
KN
E
pTZ18R
AmpR
IPNS
AT
pPGK
phleoR
B
E
H/S
E
H
N
N
H/S
KN
E
pTZ18R
AmpR
AT
IPNS
pPGK
phleoR
1kb

7. ÁBRA



8. ÁBRA


n
8
7
6
5
4
3
2
1
pPS47
pGJ02
1000
1200
1400
1600
1800
2000
penicillin egység

9. ÁBRA