

71.737/PA

K I V O N A T

Új, a ptsH gént kódoló nukleotid szekvenciák

A találmány tárgya korineform baktériumokból izolált polinukleotid, amely a következők közül egy polinukleotid szekvenciát tartalmaz:

- a) polinukleotid, amely legalább 70%-ban azonos egy olyan polipeptidet kódoló polinukleotiddal, amely a SEQ ID No.2 aminosav szekvenciát tartalmazza,
 - b) polinukleotid, amely egy olyan aminosav szekvenciát tartalmazó polipeptidet kódol, amely legalább 70%-ban azonos a SEQ ID No.2-vel,
 - c) polinukleotid, amely komplementer az a) vagy b) polinukleotiddal,
 - d) polinukleotid, amely az a), b) vagy c) polinukleotid szekvencia legalább 15 egymás utáni nukleotidját tartalmazza,
- valamint eljárás L-aminosavak fermentációs úton való előállítására a foszfortranszferáz rendszer H komponensét kódoló pstH gén erősítése mellett és az előbbi polinukleotidok primerként vagy hibridizációs szondaként való alkalmazása.

Jellemző ábra: 3.

Reuter

P0100131

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

S.B.G. & K.

Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

1988.2

01

71.737/PA

Új, a ptsH gént kódoló nukleotid szekvenciák

A találmány tárgyát a ptsH gént kódoló nukleotid szekvenciák és fermentációs eljárás képezi L-aminosavak, különösen L-lizin olyan korineform baktériumokkal való előállítására, amelyekben a ptsH gén fokozott hatású.

Az L-aminosavakat, különösen az L-lizint a humán gyógyászatban és a gyógyszeriparban, főként azonban az állat-takarmányozásban alkalmazzák.

Ismeretes, hogy korineform baktérium törzsekkel, különösen a Corynebacterium glutamicum-mal fermentációs úton aminosavak állíthatók elő. A kérdés nagy jelentősége miatt állandóan dolgoznak az előállítási eljárás továbbfejlesztésén. Az eljárás továbbfejlesztése érintheti a fermentációs technikai intézkedéseket /pl. a keverést és az oxigénnel való ellátást/, a táptalaj összetételét /ide tartozik pl. a cukor koncentráció a fermentáció alatt/ vagy a termék alakját pl. az ioncserélő kromatográfiával való feldolgozás során vagy magának a mikroorganizmusnak a teljesítménnyel kapcsolatos tulajdonságait.

A mikroorganizmusok teljesítménnyel kapcsolatos tulajdonságainak javítására a mutagenézis, szelekció és a mutánsok kiválasztása módszereit alkalmazzák. Ily módon olyan törzsekhez lehet jutni, amelyek rezisztensek antimetabolitokkal, pl. a lizin analóg S-/2-amino-etil/-ciszteinnel szemben vagy auxotrófok a

reguláció szempontjából jelentős metabolitokra és L-lizint termelnek.

Néhány év óta a rekombináns DNS technika módszereit is alkalmazzák az L-aminosavakat termelő *Corynebacterium glutamicum* törzsek javítására. Ezek szerint egyes aminosav bioszintézis géneket amplifikálnak és vizsgálják ennek hatását az L-aminosav termelésre. Összefoglaló cikkek találhatók e tárgyban az (1)-(5) irodalmi helyeken.

A találmány szerinti feladat abban áll, hogy új alapokat találjunk L-aminosavak, különösen az L-lizin javított fermentációs előállításához.

Az L-aminosavakat, különösen az L-lizint a humán gyógyászatban, a gyógyszeriparban és kitűntetett módon az állattakarmányozásban alkalmazzák. Általános érdeklődésre tarthat tehát számot az L-aminosavak, különösen az L-lizin előállítására irányuló új, továbbfejlesztett eljárások kidolgozása.

Amikor a következőkben L-lizint említünk, ezen nemcsak a bázist, hanem a sókat - pl. a lizin-monohidrokloridot vagy a lizin-szulfátot - is értjük.

A találmány tárgya korineform baktériumokból származó, egy polinukleotid szekvenciát tartalmazó izolált polinukleotid, a következők közül:

- a) egy, a SEQ ID No.2 aminosav szekvenciát tartalmazó polipeptidet kódoló polinukleotiddal legalább 70%-ban azonos polinukleotid,

- b) a SEQ ID No. 2 aminosav szekvenciával legalább 70%-ban azonos aminosav szekvenciát tartalmazó polipeptidet kódoló polinukleotid,
- c) az a) vagy b) polinukleotiddal komplementer polinukleotid,
- d) az a), b) vagy c) polinukleotid szekvencia legalább 15 egymást követő nukleotidját tartalmazó polinukleotid.

Ugyancsak a találmány tárgyát képezi egy polinukleotid, amely egy korineform baktériumokban replikálható, előnyösen rekombináns DNS.

Ugyancsak a találmány tárgya egy olyan polinukleotid, amely egy RNS.

Szintén a találmány tárgyát képezi egy polinukleotid, mégpedig előnyösen egy replikálható DNS, amely a következők valamelyikét tartalmazza:

- i) a SEQ ID No.1 nukleotid szekvencia,
- ii) legalább egy olyan szekvencia, amely az i) szekvenciának felel meg a genetikai kód degenerációs tartományán belül,
- iii) legalább egy olyan szekvencia, amely hibridizál egy, i)-vel vagy ii)-vel komplementer szekvenciával és adott esetben
- iv) egy funkció semleges szensz mutáció az i)-ben.

A találmány további tárgya az említett polinukleotidok valamelyikét tartalmazó vektor és a vektort tartalmazó, gazdasejteként szolgáló korineform baktériumok.

Ugyancsak a találmány tárgyát képezik olyan polinukleotidok, amelyek lényegében egy polinukleotid szekvenciából állnak. Ezeket egy megfelelő génbank hibridizáció segítségével történő screenelése útján lehet előállítani; ezek a SEQ ID No. 1.-nek

megfelelő polinukleotid szekvenciával rendelkező teljes gént tartalmaznak, egy nyúlvánnyal /szonda/, amely a SEQ ID No. 1.-nek megfelelő polinukleotid szekvenciát vagy ennek egy fragmentumát tartalmazza. Szintén a találmány tárgyát képezi az említett DNS szekvenciák elkülönítése.

A találmány szerinti polinukleotid szekvenciák RNS, cDNS és DNS hibridizációs szondaként alkalmazhatók, a foszfortranszferáz rendszer H komponensét /ptsH/ kódoló cDNS teljes hosszúságban való elkülönítésére, valamint olyan cDNS vagy gének elkülönítésére, amelyek a szekvencia tekintetében nagyfokú hasonlóságot mutatnak a foszfortranszferáz rendszer H komponensét kódoló gén szekvenciájával.

A találmány szerinti polinukleotid szekvenciák továbbá primerként alkalmazhatók a foszfortranszferáz rendszer H komponensét kódoló gének DNS-ének a polimeráz láncreakció /PCR/ révén való előállítására során.

Az ilyen szondaként vagy primerként szolgáló oligonukleotidok legalább 30, előnyösen legalább 20 és különösen előnyösen legalább 15 egymás utáni nukleotidot tartalmaznak. Ugyancsak alkalmazhatók a legalább 40 vagy 50 nukleotid hosszúságú oligonukleotidok.

Az „elkülönítés” a természetes környezetből való kiválasztást jelent.

A „polinukleotid” kifejezés általában poliribonukleotidokra és polidezoxiribonukleotidokra vonatkozik, mimellett nem-módosított vagy módosított RNS-ről vagy DNS-ről lehet szó.



A „polipeptidek” kifejezés olyan peptideket vagy proteineket jelöl, amelyek két vagy több, peptid kötéssel összekapcsolt aminosavat tartalmaznak.

A találmány szerinti polipeptidek tartalmazzak egy SEQ ID No. 2. szerinti polipeptidet, továbbá olyanokat, amelyek a foszotranszferáz rendszer H komponense biológiai aktivitásával rendelkeznek és olyanokat is, amelyek a SEQ ID No. 2. szerinti polipeptiddel legalább 70%-ban, előnyösen legalább 80%-ban és különösen legalább 90-95%-ban azonosak és az említett aktivitást mutatják.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás L-aminosavak, különösen L-lizin előállítására olyan korineform baktériumok alkalmazásával, amelyekről már ismert, hogy egy L-aminosavat termelnek és amelyekben a pstH gént kódoló nukleotid szekvenciák fokozottak, közelebbről túlexprimáltak.

A „fokozás” fogalom ebben az összefüggésben egy vagy több olyan enzim intracelluláris aktivitásának egy mikroorganizmusban való fokozását jelenti, amelyet a megfelelő DNS kódol. Ennek érdekében pl. növelhető a gén vagy gének kópiaszáma, erős promótor alkalmazható vagy olyan gén alkalmazható, amely egy megfelelő, magas aktivitású enzimet kódol és adott esetben ezeket a műveleteket összekapcsolhatjuk.

A találmány tárgyát képező mikroorganizmusok L-aminosavakat, különösen L-lizint képesek termelni glukózból, szacharózból, laktózból, fruktózból, maltózból, melaszból, keményítőből, cellulózból vagy glicerinnél és etanolból. A korineform baktériumok képviselőjeként különösen a Corynebacterium genust kell megemlí-

tenünk. Ennek körében különösen a *Corynebacterium glutamicum* speciesre kell hivatkoznunk, amelyről a szakterületen ismert, hogy L-aminosavakat képes termelni.

A *Corynebacterium* genushoz - és különösen a *Corynebacterium glutamicum* fajhoz - tartozó megfelelő törzsek közé sorolhatók pl. a következő vad típusú törzsek:

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539

Corynebacterium melassecola ATCC17965

Brevibacterium flavum ATCC14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 és

Brevibacterium divaricatum ATCC14020

és az ezekből előállított, L-lizint termelő mutánsok ill. törzsek, pl. a következők:

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709

Brevibacterium flavum FERM-P 1708

Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712

Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463

Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464 és

Corynebacterium glutamicum DSM5715.

A találmány kidolgozása során sikerült elkülönítenünk az új, a foszfotranszferáz rendszer H komponensét kódoló ptsH gént a *C. glutamicum*-ból.

A *ptsH* gén vagy más *C. glutamicum* gének elkülönítése érdekében először e mikroorganizmus génbankját hozzuk létre *E. coli*-ban. Génbankok létrehozását általánosan ismert tankönyvekben és kézikönyvekben írják le /l. pl.: (6), (7)/. Nagyon ismert az *E. coli* K-12 W3110 génbankja (8), amelyet lambda vektorokban alakítottak ki. A (9) helyen a *C. glutamicum* ATCC 13032 génbankját írják le, amelyet a SuperCos I kozmid vektor (10) segítségével hoztak létre *E. coli* K-12 NM 554 törzsben (11). A (12) helyen ugyancsak a *C. glutamicum* ATCC 13032 génbankját ismertetik a pH79 kozmid (13) alkalmazása mellett. A *C. glutamicum* génbankjának *E. coli*-ban való előállítására alkalmazhatók plazmidok (14), mint pl. a pBR322 vagy (15) a pUC9. Gazdaként különösen a restrikciós és rekombinációs hibát mutató törzsek alkalmasak. Példa erre a DH5 α MCR törzs, amelyet (16) ír le. A kozmidok segítségével klónozott hosszú DNS fragmentumok ezután ismét a szekvenálás szempontjából megfelelő vektorokba szubklónoozhatók, majd szekvenálhatók, pl. a (17) helyen leírt módon.

Ily módon kapjuk az új, a *pstH*-t kódoló *C. glutamicum* DNS szekvenciákat, amelyek SEQ ID No. 1-ként a találmány részét képezik. A szóban forgó DNS szekvenciákból az előbbiekben ismertetett módszerekkel továbbá levezettük a megfelelő protein aminosav szekvenciáját. A *pstH* gén termék aminosav szekvenciáját a SEQ ID No. 2 mutatja be.

Ugyancsak a találmány tárgyához tartoznak a SEQ ID No. 1-ből a genetikai kód degeneráltsága következtében leszármaztatható kódoló DNS szekvenciák. A szakterületen szensz mutációként ismertek továbbá a fehérjékben a konzervatív aminosav cserék, ami-

lyen pl. a glicin cseréje alaninra vagy aaszparaginsavé glutaminsavra; ezek nem vezetnek alapvető változásokhoz a fehérje aktivitásában, azaz funkciósemlegesek. Ismert továbbá, hogy a fehérje N- és/vagy C-terminálisán végbemenő változások a funkciót nem befolyásolják lényegesen vagy éppen stabilizálják azt. Erre vonatkozóan a szakember adatokat talál a (18)-(21) helyen és az ismert genetikai és molekuláris biológiai tankönyvekben. Szintén a találmány tárgyát képezik a megfelelő módon a SEQ ID No. 2-ből levezethető aminosav szekvenciák és az ezeket az aminosavszekvenciákat kódoló DNS szekvenciák.

A SEQ ID No. 1-gyel vagy ennek részeivel hibridizáló DNS szekvenciák ugyancsak a találmány tárgyát képezik, akárcsak azok a DNS szekvenciák, amelyek a SEQ ID No. 1-ből leszármaztatható primerek alkalmazása mellett polimeráz láncreakcióval /PCR/ állíthatók elő. Ezeknek az oligonukleotidoknak a hosszúsága jellemző módon legalább 15 nukleotid.

A DNS szekvenciák hibridizálás segítségével való azonosításhoz a szakember t.k. a (22) és (23) helyen talál útmutatást. A DNS szekvenciák polimeráz láncreakció /PCR/ segítségével végzett amplifikálására vonatkozóan a szakember útmutatást meríthet t.k. a (24) kézikönyvből és a (25) cikkből.

Azt találtuk, hogy a korineform baktériumok a ptsH gén túlexpressziója után javított L-aminosav, közelebbről L-lizin termelést mutatnak.

A túlexprimálás eléréséhez pl. növelhetjük a megfelelő gén kópiaszámát, vagy mutálhatjuk a promótor és a regulációs régiókat vagy a struktúrgéntől felfelé található riboszóma kötőhelye-

ket. Ugyanígy hatnak az expressziós kazetták, amelyeket a struktúrgéntől felfelé építünk be. Indukálható promótorok segítségével továbbá lehetővé vált az expresszió fokozása az L-aminosavak fermentációs előállítása során. Az m-RNS élettartamának meghosszabbítására vezető lépésekkel ugyancsak javítható az expresszió. Az enzim fehérje lebomlásának akadályozásával ugyancsak fokozódik az enzimaktivitás. A gének vagy gén szerkezetek vagy különböző kópiaszámban fordulhatnak elő a plazmidokban vagy a kromoszómába integrálódtak és amplifikálódtak. Egy másik megoldás szerint a szóban forgó gén túlexprimálása érhető el a közeg összetételének és a tenyésztési körülményeknek a megváltoztatása révén.

A szakember számára információt nyújtanak t.k. a irodalmi források, valamint az ismert genetikai és molekulárbiológiai tankönyvek.

Plazmidként azok alkalmasak, amelyek korineform baktériumokban túlexprimálhatók. Számos ismert plazmid vektor, pl. a pZ1 (40), a pEKEx1 (41) vagy a pHS2-1 (42) a pHM1519, a pBL1 vagy a pGA1 kriptikus plazmidon alapul. Más plazmid vektorok, pl. a pCG4-en (43) vagy pNG2-n (44) vagy a pAG1-en (45) alapulnak, ugyanígy felhasználhatók.

Alkalmazhatók továbbá olyan plazmid vektorok is, amelyek segítségével a gén-amplifikációs eljárás a kromoszómába való integrálás révén megvalósítható. Ezzel foglalkozik pl. a hom-thrB operon duplikációjával ill. amplifikációjával kapcsolatban a (46) közlemény. E módszer esetében a teljes gént egy plazmid

vektorba klónozzuk, amely replikálható egy gazdaszervezetben /jellemző módon E. coli-ban/, de nem replikálható C. glutamicum-ban. Vektorként pl. a pSUP301 (47), a pK18mob vagy a pK19mob (48) alkalmazható, továbbá a pGEM-T (/Promega Co., MD, AEÁ/, PCR2.1-TOPO 8(49), pCR^RBlunt (50) vagy a pEM1 (51). Az amplifikálendő gént tartalmazó plazmid vektort ezután konjugációval vagy transzformációval az alkalmazni kívánt C. glutamicum törzsbe visszük át. A konjugációs módszert pl. (52) írja le. A transzformációs módszerek leírása pl. (53)-(55)-ben található meg. „Cross over” esemény segítségével végzett homológ rekombináció után a kapott törzs a szóban forgó génből legalább két kópiát tartalmaz.

A találmány további tárgya tehát eljárás L-aminosavak, különösen az L-lizin fermentációs előállítására, amelynek során egy plazmid vektorral transzformált törzset alkalmazunk és a plazmid vektor a foszfo-transzferáz rendszer H komponensét kódoló gén nukleotid szekvenciáját hordozza.

Az L-aminosavak, különösen az L-lizin termeléséhez ezenkívül előnyös lehet a ptsH gén mellett a keresett L-aminosav bioszintézis út további génjeinek fokozása, ezzel az aktuális bioszintézis út egy vagy több enzimének, a glikolízisnek, az anaplerotikának és az aminosav exportnak a túlexprimálása.

Az L-lizin előállításához pl. túlexprimálható egy vagy több gén a következők közül:

a foszfoenol-piruvát-cukor-foszfo-transzferáz rendszer M komponensét (ptsM) kódoló ptsM gén (56),

- a dihidrodipikolinát-szintetázt kódoló dapA gén (57)
- a piruvát-karboxilázt kódoló pyc gén (58)
- a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenázt kódoló gap gén (59)
- a triózfoszfát-izomerázt kódoló tpi gén (59)
- a 3-foszfoglicerát-kinázt kódoló pgk gén (59)
- a lizin exportot kódoló lysE gén.

Az L-aminosavak, különösen az L-lizin termeléséhez továbbá előnyös lehet a ptsH gén mellett egyidejűleg a következők közül egy vagy több gén gyengítése:

- a foszfoenolpiruvát-karboxikinázt kódoló pck gén (60)
- a glukóz-6-foszfát-izomerázt kódoló pgi gén (61)
- a piruvát-oxidázt kódoló poxB gén (62).

Az L-aminosavak, különösen az L-lizin termeléséhez továbbá előnyös lehet a ptsH gén túlexprimálása mellett a nem kívánt mellékreakciók kikapcsolása (63).

A találmány szerint előállított mikroorganizmusok az L-aminosav, különösen az L-lizin termelés céljából folyamatosan vagy szakaszosan sarzsokban (batch eljárás), sarzsokban betáplálással (fed batch eljárás) vagy sarzsokban ismételt betáplálással (repeated batch eljárás) tenyésztethetők.

Az ismert tenyésztési módszerekre vonatkozó összefoglalás tankönyvekben megtalálható (64), (65).

Az alkalmazott tenyésztő közeg összetétele megfelelő módon ki kell, hogy elégítse az aktuális mikroorganizmus igényeit. Kü-

lönböző mikroorganizmusok táptalajaira vonatkozóan kézikönyvekben - pl. (66) - találhatók leírások.

Szénforrásként a következők alkalmazhatók: cukor és szénhidrátok, pl. glukóz, szacharóz, laktóz, fruktóz, maltóz, melasz, keményítő és cellulóz; olajok és zsírok, mint pl. szójaolaj, napraforgóolaj, földi mogyoró olaj és kókuszszsír; zsírsavak, pl. palmitinsav, sztearinsav és linolsav; alkoholok, mint pl. glicerin és etanol és szerves savak, mint pl. ecetsav. Ezek az anyagok külön-külön vagy keverékként alkalmazhatók.

Nitrogénforrásként a következők alkalmazhatók: nitrogént tartalmazó szerves vegyületek, mint pepton, élesztőkivonat, húskivonat, malátakivonat, kukoricailekvár, szójaliszt és karbamid vagy szervetlen vegyületek, mint ammónium-szulfát, ammónium-klorid, ammónium-foszfát, ammónium-karbonát és ammónium-nitrát. A nitrogénforrások külön-külön vagy keverékként alkalmazhatók.

Foszfor forrásként a következők vehetők figyelembe: kálium-dihidrogénfoszfát, dikálium-hidrogénfoszfát vagy a megfelelő, nátriumot tartalmazó sók.

A táptalajnak ezenkívül tartalmaznia kell fémsókat (amilyen pl. a magnézium-szulfát vagy a vas-szulfát), amelyek a növekedéshez szükségesek. Végül az előbb említett anyagokon kívül esszenciális növekedési anyagok, amilyenek az aminosavak és a vitaminok, alkalmazhatók. A tenyészközeghez megfelelő prekursorok is adhatók. Az említett adalékanyagok egyszeri adag formájában adhatók a tenyészethez vagy megfelelő módon a tenyésztés során táplálhatók be.

A tenyészet pH-jának ellenőrzésére megfelelő módon bázisos vegyületeket, amilyen a nátrium-hidroxid, kálium-hidroxid, ammónia, vagy savas vegyületeket, így foszforsavat vagy kénsavat alkalmazunk. A habképződés ellenőrzésére habzásgátló szereket, így pl. zsírsav-poliglikol-észtert használhatunk. A plazmidok stabilitásának megőrzésére megfelelő szelektíven ható anyagokat, pl. antibiotikumokat adagolhatunk. Az aerób feltételek biztosítására oxigént vagy oxigént tartalmazó gázelegyeket, pl. levegőt vezetünk a tenyészetbe. A tenyésztési hőmérséklet rendszerint 20-45°C, előnyösen 25-40°C. A tenyésztést addig folytatjuk, amíg L-lizin maximum alakul ki. Ez a cél rendszerint 10-160 óra alatt érhető el.

A találmány további tárgya ennek megfelelően eljárás L-aminosavak, különösen L-lizin fermentációs úton való előállítására, amelynek során a következő lépéseket hajtjuk végre:

- i) fermentálunk egy, az L-aminosavat termelő korineform baktériumot, amelyben legalább a foszotranszferáz rendszer H komponensét kódoló ptsH gén fokozott, különösen túlexprimált,
- ii) az L-aminosavat a táptalajban vagy a baktériumsejtekben dúsítjuk és
- iii) elkülönítjük az L-aminosavat.

Az L-lizin elemzését anioncserélő kromatográfiával, majd ninhidrines származékképzéssel végezhetjük, pl. a (67)-ben leírt módon.

A találmány szerinti eljárás L-aminosavak, különösen az L-lizin fermentációs előállítására irányul.

PÉLDÁK

A találmányt a továbbiakban megvalósítási példák segítségével szemléltetjük részletesebben.

1. példa

Genomiális kozmid génbank előállítása a Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 törzsből

A kromoszomális DNS-t a Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 törzsből a (68)-ban leírt módon különítettük el és a Sau3AI restrikciós enzimmel (69) részlegesen elbontottuk. A DNS fragmentumokat tengeri sün lúgos foszfáttal /SAP, (70)/ defoszforilezzük. A SuperCos1 kozmid vektor DNS-ét /(71), (72)/ az XbaI restrikciós enzimmel (73) hasítjuk és szintén SAP-vel defoszforilezzük. Ezután a kozmid DNS-t a BamHI restrikciós enzimmel (74) elhasítjuk. Az ily módon kezelt kozmid DNS-t hozzáadjuk a kezelt ATCC 13032 DNS-hez és a keveréket T4-DNS ligázzal (75) kezeljük. A ligációs elegyet ezután a Gigapack II XL packing extract (76) segítségével fágokba csomagoljuk. Az E. coli NM 554 törzs megfertőzéséhez (11) szerint a sejteket 10 mM magnézium-szulfátban felvesszük és a fág szuszpenzióból egy alikvottal keverjük össze. A kozmid bank fertőzését és titrálását (7) szerint végeztük; a sejteket ennek során 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB agarra (77) szélesztettük. Egy éjjelen

át 37°C-on való inkubálás után elkülönítjük a rekombináns egyes telepeket.

2. példa

A ptsH gén elkülönítése és szekvenálása

Egy egyes kolónia kozmid DNS-ét Quiaprep Spin Miniprep készlettel (78) a gyártó adatai szerint elkülönítjük és a Sau3AI restrikciós enzimmal (69) elbontjuk. A DNS fragmentumot SAP-vel (70) defoszforilezzük. Gélelektroforetikus szeparálás után következik az 1500-2000 bp mérettartományba eső kozmid fragmentumok izolálása a QuiaExII gélextrakciós készlettel (79). A pZero-1 szekvenáló vektor DNS-ét, amelyet az Invitrogen cégtől szereztünk be (80), a BanHI restrikciós enzimmal (69) megbontottuk. A kozmid fragmentumnak a pZero-1 szekvenáló vektorba való ligálását (7) szerint végeztük, a DNS keveréket egy éjjelen át inkubálva a T4 ligázzal (81). Ezt a ligációs keveréket elektroporációval (55) bevisszük az E. coli DH5 α MCR törzsbe (16), majd 50 μ g/ml zeocint tartalmazó LB agaron (77) szélesztjük. A rekombináns klón plazmidjának előállítását Biorobot 9600-zal végeztük (82). A szekvenálás a (83) szerinti didezoxi-lánchasításos módszerrel történt a (84) szerinti módosítással. Ennek során az RR drodamin terminátor ciklus szekvenáló készletet (85) alkalmaztuk. A gélelektroforézises szeparálás és a szekvenálási reakció analízise 29:1 Rotiphorese NF Acrylamid/bisacrilamid/Bisacrylamid géllel (86) történt, az ABI prizma 377 szekvenáló berendezéssel (86).

A kapott közelítő szekvencia adatokat a Staden programcsomag, Version 97-0 (87) alkalmazásával dolgoztuk fel. A pZero1 származék egyes szekvenciáit összefüggő contig-gá szerkesztettük. A számítógép alapú kódoló tartomány elemzést az XNIP programmal (87) végeztük. További elemzést végeztünk a BLAST kereső programokkal (88) a NCBI (89) nemredundáns adatbankjával szemben.

A kapott nukleotid szekvenciát a SEQ ID No. 1 mutatja be. A nukleotid szekvencia elemzése 267 bázispárból álló nyitott leolvasókeretet mutat, amelyet pstH génként jelöltünk. A ptsH gén egy 89 aminosavból álló fehérjét kódol.

3. példa

A pEC-K18mob2ptsHexp ingavektor előállítása C. glutamicumban a ptsH gén fokozására

3.1 A ptsH gén klónozása a pCR^{Blunt} II vektorba

A kromoszomális DNS-t az ATCC 13021 törzsből különítettük el (90) szerint. A ptsH génnek a 2. példából a C. glutamicum-ra ismert szekvenciája alapján a következő oligonukleotidokat választottuk ki a polimeráz láncreakcióhoz:

ptsHexp1:

5' -ACC ACT GGT GCA ATC TCC AT-3'

ptsHexp2:

5' -TTT ACT CAG CGT CAA GGT CC-3'

A szintetikus primereket a (91) helyről szereztük be és a PCR reakciót (92) standard PCR módszere szerint végeztük, a (93)-tól származó Pwo polimerázzal. A polimeráz láncreakció segítségével a primerek lehetővé teszik egy 686 bp DNS elkülönítését, amely a potenciális promótor régióval együtt a pstH gént hordozza. Az amplifikált DNS fragmentum DNS szekvenciáját szekvenálással elemeztük.

Az amplifikált DNS fragmentumot a Zero Blunt™ készlettel (94) a pCR^RBlunt II vektorba ligáljuk (95).

Az *E. coli* TOPIC törzset ezután a ligációs keverékkel elektroporációnak vetjük alá (96). A plazmid hordozó sejteket oly módon szelektáltuk, hogy a transzformációs keveréket 25 µg/ml kanamicint tartalmazó LB agaron /(7)/ szélesztettük. A plazmid DNS-t egy transzformánsból QIAprep Spin Miniprep készlet /Qiagen/ alkalmazásával különítjük el az EcoRI restrikciós enzimmel elemezzük, majd agaróz gél /0,8%/ elektroforézist végzünk. A plazmidot pCRB1-nek nevezzük el és az 1. ábrám mutatjuk be.

3.2 A pEC-K16mob2 *E. coli*-C. glutamicum ingavektor előállítása

Az *E. coli*-C. glutamicum ingavektort a technika állása szerint állítottuk elő. A vektor a pGAl plazmid replikációs régióját tartalmazza, ideértve a „per” replikációs effektort (47), a Tn5 transzpozon (98) kanamicin rezisztenciáért felelős aph(3'-IIa) génjét (98), a pMB1 plazmid oriv replikációs tartomány génjét (99), a lacZα génfragmentumot, ideértve a lac promótort és egy többszörös klónozási helyet /mcs; (60)/ és az RP4 plazmid mob

tartományát (47). A létrehozott vektort átalakítjuk a DH5 α mcrr törzssé (96). A plazmidot hordozó sejteket úgy szelektáljuk, hogy a transzformációs keveréket 25 mg/l kanamicint tartalmazó LB agaron szélesztjük. A plazmid DNS-t egy transzformánsból QIAprep Spin Miniprep készlet /Qiagen/ alkalmazásával különítjük el és az EcoRI és HindIII restrikciós enzimmel elemezzük, majd agaróz gél /0,8%/ elektroforézist végzünk. A plazmidot pEC-K18mob-2-nek nevezzük el és a 2. ábrán mutatjuk be.

A következő mikroorganizmust helyeztük letétbe a Mikroorganizmusok és Sejttenyészetek Német Gyűjteményében /MSMZ, Braunschweig, Németország/ a Budapesti Szerződés szerint:

C. glutamicum DMS 5715/pEC-K18mob2 /DSM 13245/.

3.3 A *pstH* gén klónozása a pEC-K18mob2 *E. coli*-*C. glutamicum* ingavektorba

A 3.2 példában leírt ingavektorba való klónozás érdekében a pEC-K18mob2 plazmid DNS-ét teljesen elbontjuk a KpnI és XbaI restrikciós endonukleázzal és SAP-val kezeljük (93).

Az *E. coli* Top10-ből elkülönítjük a pCRB1-*pstH*exp vektort és teljesen elbontjuk a KpnI és XbaI restrikciós endonukleázzal, a *pstH* gént hordozó 788 bp méretű fragmentumot pedig 0,8%-os agaróz gélből a QIAquick gélextrakciós készlettel (78) tisztítjuk. A *pstH*-t hordozó fragmentumot T4-ligázzal összekapcsoljuk a pEC-K18mob2 vektorral (70). A ligációs keveréket az *E. coli* DH5 α mcrr törzsbe transzformáljuk (96). A plazmidot hordozó sejteket úgy szelektáljuk, hogy a transzformációs keveréket 25 mg/l

kanamicint tartalmazó LB agaron (7) szélesztjük. Egyik transzformánsból elkülönítjük a plazmid DNS-t a QIAprep Spin Miniprep készlet /Qiagen (78)/ alkalmazásával. Az elemzést az EcoRI restrikciós enzimmel végzett kezeléssel végezzük, majd agaróz gélben elektroforézist hajtunk végre. A plazmidot pEC-K18mob2pstHexp-nek nevezzük el és a 3. ábrán mutatjuk be.

A törzset E. coli DH5 α mc/pEC-K18mob2pstHexp-nek nevezzük el és tiszta tenyészet alakjában 2000.11.28.-án helyeztük letétbe a Budapesti Szerződés szerint a DSMZ-ben DSM 13878 számon.

4. példa

A DSM 5715 törzs transzformálása a pEC-K18mob2pstHexp plazmiddal

A DSM 5715 törzset az elektroporációs módszer (101) alkalmazásával a pEC-K18mob2pstHexp plazmiddal transzformáljuk.

A transzformánsok szelekcióját 25 mg/l kanamicinnel kiegészített LHBIS agaron végezzük, amelynek összetétele:

18,5 g/l agy-szív húsleves

0,5 M szorbit

5 g/l bakto-tripton

2,5 g/l bakto-élesztő kivonat

5 g/l NaCl

18 g/l bakto-agar.

Az inkubálást 2 napon át 33°C-on végeztük.

A plazmid DNS-t egy transzformánsból a szokásos módon különítjük el (102), EcoRI restrikciós endonukleázzal elbontjuk és a plazmidot agaróz gélelektroforézissel elemezzük.

A kapott törzset DSM 5715/pEC-K18mob2pstHexp-nek nevezzük el.

5. példa

Lizin előállítás

A 4. példa szerint előállított *C. glutamicum* DSM 5715/- pEC-K18mob2pstHexp-törzset a lizin termelés szempontjából megfelelő táptalajon tenyésztjük és a tenyészet felülűszójában meghatározzuk a lizin tartalmát.

Ecélból a törzset kiindulásként 24 órán át 33°C-on agar lemezen, a megfelelő antibiotikum jelenlétében inkubáljuk /agy-szív agar, 25 µg/ml kanamicin/. Ebből az agar lemez tenyészetből kiindulva beoltunk egy előtenyészetet /10 ml táptalaj 100 ml-es Erlenmeyer lombikban/. Az előtenyészethez a Cg III táptalajt alkalmazzuk:

10 g/l bakto-pepton

10 g/l bakto-élesztő kivonat

2,5 g/l NaCl

2 tömeg/térf% /külön autoklávozott/ glukóz

A pH-t 7,4-re állítjuk be.

25 mg/l kanamicint adunk a táptalajhoz. Az előtenyészetet 16 órán át 33°C-on inkubáljuk 240 fordulat/perc rázatási sebesség-

gel. A főtenyészetet ebből az előtenyészetből oltjuk be úgy, hogy a főtenyészet kiindulási OD értéke /660 nm/ 0,05 legyen.

A főtenyészet esetében a MM táptalajt alkalmaztuk:

kukoricafehérje /CSL/	5 g/l
MOPS /morfolino-propánszulfonsav/	20 g/l
glukóz /külön autoklávozva/	100 g/l
ammónium-szulfát	25 g/l
kálium-dihidro-foszfát	0,1 g/l
magnézium-szulfát.7H ₂ O	1,0 g/l
kalcium-klorid.2H ₂ O	10 mg/l
vas/II/szulfát.7H ₂ O	10 mg/l
mangán-szulfát.H ₂ O	5,0 mg/l
biotin /szűrővel sterilizálva/	0,3 mg/l
tiamin.HCl /szűrővel sterilizálva/	0,2 mg/l
L-leucin /szűrővel sterilizálva/	0,1 g/l
kalcium-karbonát	25 g/l

A CSL-t, MOPS-ot és a sóoldatot ammónia oldattal pH 7-re állítottuk be és autoklávoztuk. A steril szubsztrát és vitamin oldatokat, valamint a szárazon autoklávozott kalcium-karbonátot ezután adtuk hozzá.

A tenyésztést 10 ml térfogatban, terelőlapokkal ellátott 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban végeztük, 25 mg/l kanamicin hozzá-

adásával. A tenyésztést 33°C-on és 80% levegő-nedvesség mellett végeztük.

48 és 72 óra elteltével az OD értéket 660 nm mérési hullámhosszúságon a Biomek 1000 készülékkel /Beckmann Instruments GmbH, München, Németország/ határoztuk meg. A képződött lizin mennyiségét aminosav elemzővel /Eppendorf-Biotronik, Hamburg, Németország/ határoztuk meg, ioncserélő kromatográfia és az oszlop utáni származék-képzés /ninhidrines kimutatás/ segítségével. A kísérlet eredményeit az 1. táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat

Törzs	OD (660 nm)	lizin.HCl, g/l
DSM 5715/pEC-K18mob2 48 óra	11,4	14,14
DSM5715/pEC-K18mob2ptsHexp 48 óra	10,7	15,98
DSM5715/pEC-K18mob2mob2 72 óra	10,1	15,24
DSM5715/pEC-K18mob2ptsHexp 72 óra	10,0	17,13

Ábrák

A következő ábrákat mutatjuk be:

1. ábra: A pCRBI-ptsHexp plazmid térképe
2. ábra: A pEC-K18mob2 plazmid
3. ábra: A pEC-K18mob2ptsHexp plazmid

Az alkalmazott rövidítések és jelölések magyarázata a következő:

Kan: kanamicin rezisztencia gén

zeocin: zeonin rezisztencia gén

pstH: a *C. glutamicum* ptsH génje

CelE1: a CelE1 plazmid replikációs origója

lacZ-alpha: a lacZ génfragmentum az *E. coli*-ból

lacZ-alpha': a LacZ génfragmentum fragmentuma *E. coli*-ból

per: a pGA1 kópia számát ellenőrző gén

oriV: ColE1-hez hasonló origó a pMB1-ből

rep: a *C. glutamicum* pGA1 plazmidből származó, plazmid által kódolt replikációs tartomány

RP4mob: RP4 mobilizációs hely

EcoRI: az EcoRI restrikciós enzim restrikciós helye

HindIII: a HindIII restrikciós enzim restrikciós helye

KpnI: a KpnI restrikciós enzim restrikciós helye

XbaI: az XbaI restrikciós enzim restrikciós helye

Szekvencia protokoll

<110> Degussa-Hüls AG

<120> Új, a ptsH gént kódoló nukleotid szekvenciák

<130> 990219 BT

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 480

<212> DNS

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (163)..(429)

<400> 1

```

ggacattggtt ttgcttccg gtaacgtggc aaaacgaaca atgtctcact agactaaagt 60
gagatcgaca ttaaatecccc tcccttgggg ggtttaacta acaaatcgct gcgccctaatt 120
ccgttcggat taacggcgta gcaacacgaa aggacacttt cc atg gct tcc aag 174
                                     Met Ala Ser Lys
                                     1

act gta acc gtc ggt tcc tcc gtt ggc ctg cac gca cgt cca gca tcc 222
Thr Val Thr Val Gly Ser Ser Val Gly Leu His Ala Arg Pro Ala Ser
  5                10                15                20

atc atc gct gaa gcg gct gct gag tac gac gac gaa atc ttg ctg acc 270
Ile Ile Ala Glu Ala Ala Ala Glu Tyr Asp Asp Glu Ile Leu Leu Thr
      25                30                35

ctg gtt ggc tcc gat gat gac gaa gag acc gac gcg tcc tct tcc ctc 318
Leu Val Gly Ser Asp Asp Asp Glu Glu Thr Asp Ala Ser Ser Ser Leu
      40                45                50

atg atc atg gcg ctg ggc gca gag cac ggc aac gaa gtt acc gtc acc 366
Met Ile Met Ala Leu Gly Ala Glu His Gly Asn Glu Val Thr Val Thr
      55                60                65

tcc gac aac gct gaa gct gtt gag aag atc gct gcg ctt atc gca cag 414
Ser Asp Asn Ala Glu Ala Val Glu Lys Ile Ala Ala Leu Ile Ala Gln
      70                75                80

gac ctt gac gct gag taaacaacgc tctgcttggt aaaagctcgt tagaagcttg 469
Asp Leu Asp Ala Glu
      85

ttaaaaagcgg t 480

```

1993

<210> 2

<211> 89

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 2

Met Ala Ser Lys Thr Val Thr Val Gly Ser Ser Val Gly Leu His Ala
 1 5 10 15

Arg Pro Ala Ser Ile Ile Ala Glu Ala Ala Ala Glu Tyr Asp Asp Glu
 20 25 30

Ile Leu Leu Thr Leu Val Gly Ser Asp Asp Asp Glu Glu Thr Asp Ala
 35 40 45

Ser Ser Ser Leu Met Ile Met Ala Leu Gly Ala Glu His Gly Asn Glu
 50 55 60

Val Thr Val Thr Ser Asp Asn Ala Glu Ala Val Glu Lys Ile Ala Ala
 65 70 75 80

Leu Ile Ala Gln Asp Leu Asp Ala Glu
 85

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Korineform baktériumokból izolált polinukleotid, amely a következők közül egy polinukleotid szekvenciát tartalmaz:

- a) polinukleotid, amely legalább 70%-ban azonos egy olyan polipeptidet kódoló polinukleotiddal, amely a SEQ ID No.2 aminosav szekvenciát tartalmazza,
- b) polinukleotid, amely legalább 70%-ban azonos egy olyan polipeptidet kódoló polinukleotiddal, amely a SEQ ID No.2 aminosav szekvenciát tartalmazza,
- c) polinukleotid, amely komplementer az a) vagy b) polinukleotiddal,
- d) polinukleotid, amely az a), b) vagy c) polinukleotid szekvencia legalább 15 egymás utáni nukleotidját tartalmazza.

2. Az 1. igénypont szerinti polinukleotid, azzal jellemezve, hogy a polinukleotid egy korineform baktériumokban replikálható, előnyösen rekombináns DNS.

3. Az 1. igénypont szerinti polinukleotid, azzal jellemezve, hogy RNS.

4. A 2. igénypont szerinti replikálható DNS, azzal jellemezve, hogy a következők valamelyikét tartalmazza:

- i) a SEQ ID No. 1 nukleotid szekvenciát vagy
- ii) legalább egy olyan szekvenciát, amely az i) szekvenciának felel meg a genetikai kód degenerációs tartományán belül, vagy

iii) legalább egy olyan szekvenciát, amely az i) vagy ii) szekvenciával komplementer szekvenciához hibridizál és adott esetben

iv) i) funkció semleges szensz mutációit.

5. A 2. igénypont szerinti polinukleotid szekvencia, azzal jellemezve, hogy olyan polipeptidet kódol, amely a SEQ ID No. 2 szerinti aminosav szekvenciát tartalmazza.

6. Vektor, azzal jellemezve, hogy valamely, az 1. igénypont szerinti polinukleotid szekvenciát tartalmaz.

7. Korineform baktérium, azzal jellemezve, hogy egy 6. igénypont szerinti vektort tartalmaz.

8. Eljárás L-aminosavak fermentációs úton történő előállítására, azzal jellemezve, hogy

i) a keresett L-aminosavat termelő korineform baktériumokat, amelyekben legalább a foszfortranszferáz rendszer H komponensét kódoló gén fokozott, tenyésztjük, közelebbről túlexprimáljuk,

ii) az L-aminosavat a közegben vagy a baktérium sejtekben dúsítjuk és

iii) az L-aminosavat elkülönítjük.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan baktériumokat alkalmazunk, amelyekben a keresett L-aminosavhoz vezető bioszintézis út további génjei is fokozottak.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan baktériumokat alkalmazunk, amelyekben a keresett L-aminosav képződését csökkentő anyagcsere utak legalább részben ki vannak kapcsolva.

11. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy plazmid vektorral transzformált törzset alkalmazunk és a plazmid vektor a foszfostranszferáz rendszer H komponensét kódoló gén nukleotid szekvenciáját hordozza.

12. A 9-11. igénypont közül egy vagy több szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan korineform baktériumokat alkalmazunk, amelyek L-lizint termelnek.

13. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egyidejűleg fokozunk, azaz túlexprimálunk vagy amplifikálunk egy vagy több következő gént:

- a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenázt kódoló gap gén,
- a piruvát-karboxilázt kódoló pyc gén,
- a triózfoszfát-izomerázt kódoló tpi gén,
- a dihidropikolinát-szintetázt kódoló dapA gén,
- a foszfoenol-piruvát-cukor-foszfostranszferáz rendszert /ptsM/ kódoló ptsm gén
- a 3-foszfoglicerát-kinázt kódoló pgk gén és
- a lizin exportot kódoló lysE gén.

14. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy L-lizin előállítására olyan baktériumokat alkalmazunk, amelyekben egyidejűleg gyengítünk egy vagy több következő gént:

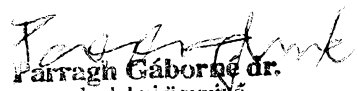
- a foszfoenol-piruvát-karboxikinázt kódoló pck gén,
- a piruvát-oxidázt kódoló poxB gén,
- a glukóz-6-foszfát-izomerázt kódoló pgi gén.

15. Az előző igénypontok közül egy vagy több szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a *Corynebacterium glutamicum* fajhoz tartozó mikroorganizmusokat alkalmazunk.

16. Az 1. igénypont szerinti polinukleotid szekvenciák primerként való alkalmazása olyan gének DNS-einek előállítására, amelyek a ptsH génterméket kódolják, azzal jellemezve, hogy a polimeráz-láncreakciót alkalmazzuk.

17. Az 1. igénypont szerinti polinukleotid szekvenciák alkalmazása, azzal jellemezve, hogy ezeket hibridizációs szondaként használjuk fel.

A meghatalmazott:


Parragh Gáborné dr.
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

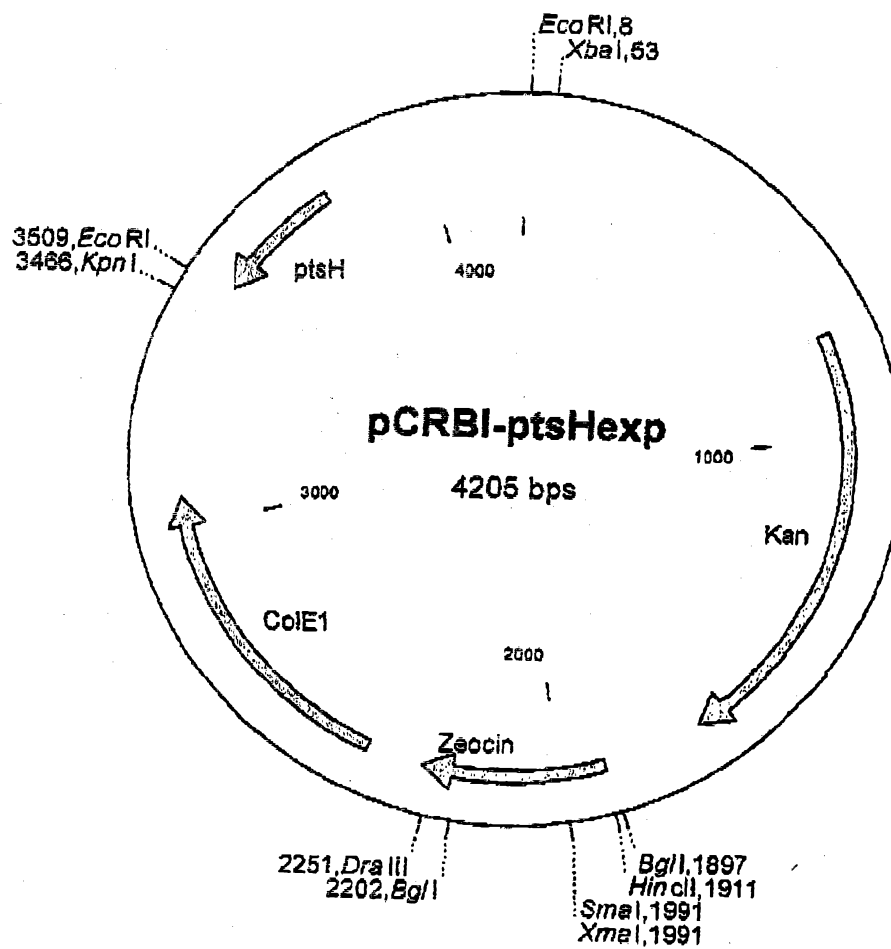
29 oldal
32 oldal

32 oldal

Reuun

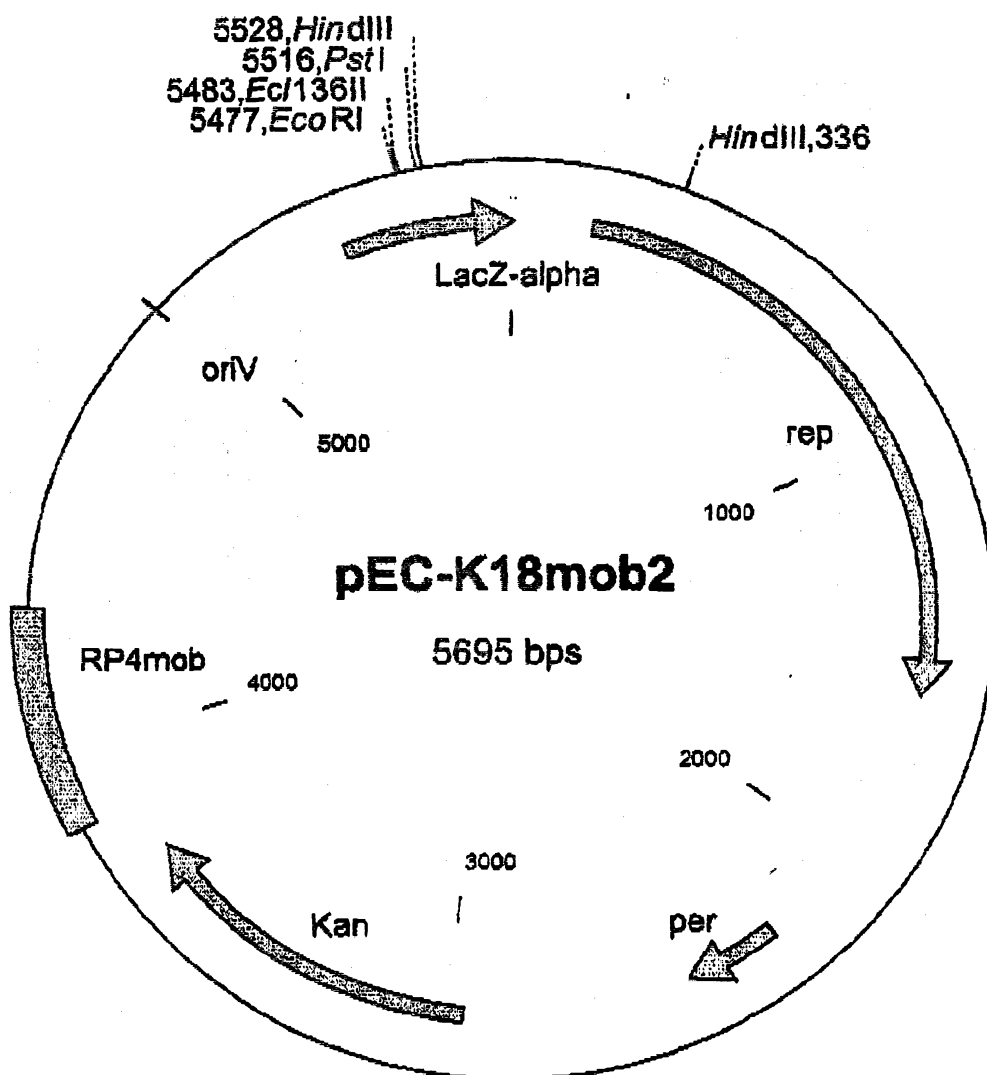
1/3

A pCRB1-ptshepx plazmid képe



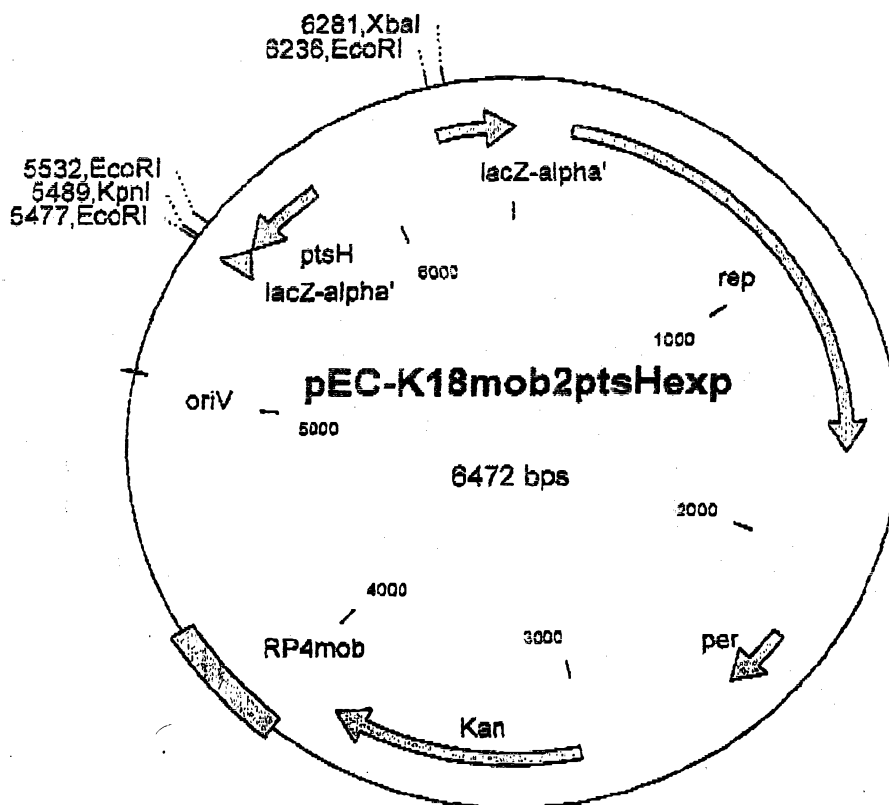
1. ábra

A pEC-K18mob2 plazmid képe



2. ábra

A pEC-K18mob2ptsHexp plazmid képe



3. ábra