



Eljárás növény-specifikus szimbiotikus szignálként alkalmazható
lipo-oligoszacharid szerkezetű anyagok előállítására

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, Párizs

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE, Párizs,

Franciaország

A bejelentés napja: 1991. 04. 05.

Elsőbbsége: 1990. 04. 06. (90/04764) Franciaország

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/FR91/00283

A nemzetközi közzététel száma: WO 91/15496

KIVONAT

A találmány tárgyát képezik a Nod faktorok és analógjaik, eljárás ezek előállítására, valamint alkalmazásukra. A Nod faktor bioszintézisét a Rhizobium baktériumokban általánosan előforduló nodulációs gének (nodA,B,C) közül legalább egy szabályozza. Ez az anyag egy lipo-oligoszacharid, amely nem exopoliszacharid származék. A Nod faktor a megfelelő növényben egy növény-specifikus szimbiotikus szignál, amely képes arra, hogy fokozza a baktériumoknak a növény-fertőzőési képességét, fokozza a gümők képződésének sebességét, és/vagy indukálja a Leguminosa-k szimbiotikus génjei transzkripciós sebességét.

P 92 03/65

A

03/93

66705

KÉPVISELŐ:

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

DANUBIA SZABADALMI ÉS

VÉDJEGY IRODA KFT

BUDAPEST

NSZD

CEZHB/06

012 P 19/04

Eljárás növény-specifikus szimbiotikus szignálként alkalmazható
lipo-oligoszacharid szerkezetű anyagok előállítására

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, Párizs

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE, Párizs,

Franciaország

Feltalálók:

LEROUGE Patrice,

Toulouse,

ROCHE Philippe,

Toulouse,

FAUCHER Catherine,

Ramonville-Saint-Agne

MAILLET Fabienne,

Ramonville-Saint-Agne

DENARIE Jean,

Castanet-Tolosan,

PROME Jean-Claude,

Pechbusque,

TRUCHET Georges,

Auzeville-Tolosane,

Franciaország

A bejelentés napja: 1991. 04. 05.

Elsőbbsége: 1990. 04. 06. (90/04764) Franciaország

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/FR91/00283

A nemzetközi közzététel száma: WO 91/15496

75860-3568-SZÖ/KmO

A jelen találmány tárgyát olyan lipopoliszacharid szerkezetű anyagok képezik, amelyek képesek növény-specifikus szimbiotikus jelek képzésére, valamint a találmány tárgyát képezik ezen anyagok előállítási eljárásai és alkalmazásuk.

Amint az már ismert, a növények növekedésükhöz kombinált nitrogénforrásra van szükség, például ammóniára vagy nitrátra. A nitrogén megkötése, azaz az atmoszferikus nitrogén(N_2) kémiai vagy biológiai redukciója ammóniává (NH_3) ennél fogva életfontosságú szerepet játszik a mezőgazdasági termelésben.

Amint az szintén ismert, a szimbiotikus mikroorganizmusok elősegíthetik a növények növekedését és fejlődését, a nitrogén biológiai megkötésén keresztül.

A Rhizobiumok Gram negatív talajbaktériumok, amelyek általában növényekkel való szimbiotikus együttélésben kötik meg a nitrogént: egy ilyen, a nitrogén-kötő baktériumokkal való szimbiózisnak a létrehozása számos növényfaj számára lehetővé teszi, hogy olyan talajban is nőjön, amely kis mennyiségben tartalmaz asszimilálható nitrogént. A fotoszintézis révén a növényi partner szolgáltatja a baktériumok számára azt az energiát, ami ahhoz szükséges, hogy a molekuláris nitrogén ammóniává redukáljuk. Ezzel szemben a mikroszimbióta által fixált nitrogént a gazdanövény használja fel, amely azt beépíti a nitrogén-metabolizmusába. A nitrogén-kötő baktériumok, például a Rhizobiumok, és a Leguminosa család növényei között létrejött szimbiotikus kapcsolat a legfontosabb mind ökológiai mind mezőgazdasági szempontból. Ez a kapcsolat vezet gümők kialakulására, főleg a gazdanövény gyökerein. Ezekben a gümőkben

a baktériumok redukálják az atmoszférikus nitrogént ammóniává, a nitrogenáz enzimkomplex segítségével.

A nitrogén-kötő baktériumok Rhizobium családja (Rhizobium, Bradyrhizobium, Sinorhizobium és Azorhizobium) és a Leguminosa család növényei között létrejött szimbiózis ennél fogva nagyon fontos szerepet játszik a mérsékelt égövi és a trópusi mezőgazdaságban. Az olajban és fehérjében gazdag növények, például a szójabab és a földimogyoró, az állatok etetésére használt növények, például a lucerna és a lóhere, a fehérjében gazdag növények, például a borsók és a mezei babok, a táplálék-növények, például a babok, borsók, lencsék és csicseriborsók, a zöldtrágyák, például a Sesbania és a hasonlók tartoznak ide. Ezeknek a szimbiózisoknak a révén a Leguminosa-k termesztése gyakran kevésbé költséges a nitrogén-műtrágya szempontjából, mint a más családokba tartozó növényeknél. Ebből a szempontból meg kell jegyeznünk, hogy a nitrogén-műtrágyák kiterjedt alkalmazásának számos hátránya van. Először, a műtrágyák szintézise, szállítása és alkalmazása költséges fosszilis energiát igényel, és ennek számos következménye van: a gazdaság szintjén megnöveli a farmer költségeit, a környezetvédelem szintjén pedig hozzájárul az üvegház-hatás kialakulásához, azáltal, hogy növeli a levegő széndioxid tartalmát. Emellett a nitrogén-műtrágyák rosszul kigondolt, vagy fölöslegben való alkalmazása a felszíni vizek szennyezését okozza, eutrofizációt okoz, és megnöveli a földalatti ivóvízkészlet nitrát-tartalmát. Ezek a különböző okok erősen szorgalmazzák a nitrogén biológiai fixálásának egyre elterjedtebb alkalmazását.

A nitrogén műtrágyák kiterjedt alkalmazásának romboló következményei miatt szükséges, hogy a növények biológiai nitrogén-kötésének mértékét fokozzuk, főleg termesztett fajták esetében, amelyek fontos szerepet játszanak az emberi és állati táplálkozásban. Mind ökológiai mind gazdasági szempontból a legelfogadottabb megoldás, ha javítjuk a Rhizobiaceae-Leguminoseae szimbiózist.

Azt javasolták, hogy ezt a javítást úgy kell végrehajtani, hogy a Rhizobium baktériumokat (különösen a Rhizobium vagy Bradyrhizobium fajokat) a vetésnél vigyük be, vagy oly módon, hogy a magokat beborítjuk velük, a magvakkal elkevert granulátumok formájában, vagy folyadék táptalajban való tenyésztéssel. Ezek a baktérium kiegészítések azonban csak azokban a ritka esetekben hatékonyak, amelyekben a megfelelő természetes szimbiotikus baktériumok hiányoznak, illetve nincsenek túl nagy számban jelen a talajban. Az ellenkező esetekben, tehát amikor a talaj már tartalmazza ezeket a baktériumokat, gyakorlatilag lehetetlen, hogy egy kívülről bejuttatott törzset elfogadtassunk, a talajban természetesen jelenlevő baktériumokkal való versengés miatt, amelyek, még akkor is, ha nem szükségszerűen hatékonyan kötik meg a nitrogént, egy korlátozó faktort jelentenek a kiválasztott baktériumok bejuttatásával szemben.

Azt is javasolták, hogy a Rhizobium-Leguminoseae szimbiózis javítását elérhetjük úgy is, hogy a növényeket egy, a Rhizobium nemzetségbe tartozó baktériumból származó exopoliszachariddal kezeljük, vagy egy olyan oligoszachariddal

kezeljük, amely az ilyen exopoliszacharidból (EPS) egy vagy egységet tartalmaz. [Lásd a WO 87/06796 számú PCT Nemzetközi Bejelentést, tulajdonos a The Australian National University, a feltalálók: G.G. Rolfe, S.P. Djordjevic, J.W. Redmond és M. Batley]. Ezt az EPS terméket azonban nem-szimbiotikus gének kódolják. Az tény, hogy ezeknek az exopoliszacharidoknak a bioszintézise nem áll a nod gének közvetlen szabályozása alatt, amelyek a fertőzést és a gümőképződést szabályozzák. Ezeket az exopoliszacharidokat olyan Rhizobium törzsek szintetizálják, amelyeknek a pSym plazmidját kiirtották (ezek a plazmidok a legtöbb szimbiotikus gént, különösen a nod géneket).

A gümőképződési folyamatban szereplő géneket lokalizálták, és számos általános és specifikus nodulációs gént (nod gének) azonosítottak és jellemeztek [Long, S.R., Cell, 56, 203-214 (1989)]. Jóllehet a nodA,B,C gének nodulációs gének, amelyek általánosan előfordulnak a szimbiotikus Rhizobiumok különböző fajtaiban, léteznek mégis specifikus nod gének, amelyek meghatározzák a gazda-specifitást, és amelyek ennél fogva változnak a különböző fajok között, valamint léteznek a nodD típusú gének, amelyek az összes nod gén expresszióját szabályozzák.

Az általános nodA,B,C géneket abban a négy baktérium fajban azonosították, amelyek képesek nitrogén-kötő szimbiózisban élni a Leguminosa-kkal: Rhizobium, Bradyrhizobium, Sinorhizobium és Azorhizobium. A Rhizobium nemzetség esetében ezeknek a géneknek megállapították a nukleotid szekvenciáját Rhizobium meliloti-ban [Török et al., Nucleic Acids Research,

12, 9509-9522 (1984); Jacobs et al., Journal of Bacteriology, 162, 469-476 (1985); Egelhoff et al., DNA, 4, 241-242 (1985)], Rhizobium leguminosarum-ban [Rossen et al., Nucleic Acids Research, 12, 9497-9508 (1984)], Rhizobium trifolii-ban [Schofield et al., Nucleic Acids Research, 14, 2891-2903 (1986)], Bradyrhizobium specifikus.-ben [Scott, Nucleic Acids Research, 14, 2905-2919 (1986)], Azorhizobium caulinodans-ban [Goethals et al., Molecular and General Genetics, 219, 289-298 (1989)].

A jelen találmány néhány szerzőjéből álló kutató-csoport kimutatta, hogy Rhizobium meliloti-ban az általános nodA,B,C gének a specifikus nodH és nodQ génekkel együtt gazdaspecifikus extracelluláris Nod jelek képződését indukálják ezeknek a baktériumoknak a tenyészetéből készült felülúszókban [Faucher et al., Journal of Bacteriology, 172, 5489-5429 (1988); Faucher et al., Molec. Plant-Microbe Interact., 2, 291-300 (1989)], mások mellett. Továbbá, ebből a két publikációból a második beszámol a steril felülúszó ultraszűrőssel való frakcionálásáról, ezzel lehetővé téve, hogy kiderüljön két Nod faktor jelenléte, amelyeknek molekulásúlya 5000 Dalton-nál kevesebb.

A fertőzés és a noduláció specifikusságát Rhizobium meliloti-ban két szinten határozták meg, nevezetesen:

- a nodD gének aktiválják más nod operonok expresszióját, ami a növények által termelt specifikus jelek jelenlététől függ [Györgypál et al., Molecular and General Genetics, 212, 85-92 (1988)], és

- specifikus gének, például a nodH és a nodQ ha aktiválva vannak, bakteriális extracelluláris jelek (Nod faktorok) termelését határozzák meg, amelyek lehetővé teszik, hogy felismerjék és serkentsék a hüvelyes gazdanövényeket, például a lucernát [Faucher et al., Journal of Bacteriology, 172, 5489-5499 (1988); Faucher et al., Molec. Plant-Microbe Interact., 2, 291-300 (1989)]. A bakteriális jelek kémiai természete azonban nem volt ismert.

A jelen találmány tárgya ennél fogva a szimbiotikus Nod jelek kémiai szerkezetének meghatározása, valamint ilyen kémiai szerkezettel rendelkező anyagok előállítás, valamint eljárás olyan anyagok előállítására, amelyek ilyen szimbiotikus Nod jelként képesek hatni, valamint eljárás ezeknek az anyagoknak az alkalmazására, mind a növény- mind az állatvilágban való kezelés céljából (beleértve az embert is).

A jelen találmány tárgyát olyan, lényegében tiszta készítmény képezi, amely egy Nod faktor szerkezetével rendelkezik, vagy annak analógja, amely Nod faktort azzal a ténnyel lehet jellemezni, hogy bioszintézise legalább egy nodulációs gén (nodA,B,C) szabályozása alatt áll, amely általánosan előfordul a Rhizobiumokban, főleg a Rhizobium, Bradyrhizobium, Sinorhizobium és Azorhizobium nemzetségekben, és ezt a vegyületet az jellemzi, hogy olyan lipooligoszacharidot tartalmaz, amely nem exopoliszacharidokból származik.

A jelen találmány szövegében a "Nod faktor" alatt olyan szignál-molekulát értünk, amely a nod gének közvetlen szabályozása alatt keletkezik, és amely szignál segítségével a

szimbiotikus baktériumok képesek megfertőzni a növényeket és gümőket hoznak létre.

Az említett lényegében tiszta anyagoknak egy előnyös felhasználási módja szerint a Nod faktor szerkezetét az jellemzi, hogy ez egy növény-specifikus szimbiotikus szignál, és képes fokozni a baktériumoknak azt a képességét, hogy megfertőzzék azt a gazdanövényt, amellyel együtt él, és/vagy felgyorsítsa a gümők képződését azon a gazdanövényen, amellyel együtt él, és/vagy indukálja a Leguminosák szimbiotikus génjeinek transzkripcióját.

Az említett a találmány szerinti lényegében tiszta anyag egy másik előnyös megvalósítási módja szerint annak a Nod faktornak, amelynek a szerkezete alapján készült, a tulajdonságai egy lektin ligandum tulajdonságainak felelnek meg.

A jelen találmány tárgyát képezi továbbá egy, az I általános képletű lipo-oligoszacharid anyag, amelyben:

- G jelentése egy különbözőképpen szubsztituált hexózamin például a nitrogénatomon acetil-csoporttal, szulfát-csoporttal, egy acetil-csoporttal és/vagy egy éter-csoporttal az egyik oxigénen;

- R_1, R_2, R_3, R_5, R_6 és R_7 jelentése lehet azonos vagy különböző, lehet hidrogénatom, CH_3-CO- , C_xH_yCO- csoport, amelyben x értéke 0 és 17 közötti egész szám, y értéke 1 és 35 közötti egész szám, illetve bármely más acil-csoport, például karbamil-csoport;

- R_4 jelentése egy egyszeres, kétszeres vagy háromszoros telítetlenséggel rendelkező alifás szénatom, amely legalább 12

szénatomot tartalmaz, és

- n értéke 1 és 4 közötti egész szám.

A jelen találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint G jelentése:

- Rhizobium meliloti-ban N^{α} -acetil-D-glükózamin-6-szulfát

- Rhizobium leguminosarum b.vektor. viciae-ben N^{α} -acetil-D-glükózamin.

A jelen találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a találmány szerinti lipo-oligoszacharidot a II általános képlettel jellemezhetjük, amelyben R jelentése hidrogénatom vagy CH_3CO - csoport, n értéke 2 vagy 3.

A II általános képletű Rhizobium meliloti lipo-oligoszacharidokat, amelyekben R jelentése hidrogénatom, az alábbiakban a NodRm általános néven említjük; ha $n=2$, akkor a megfelelő lipo-oligoszacharidot NodRm-1-nek hívjuk; ha $n=3$, akkor a megfelelő lipo-oligoszacharidot NodRm-3-nak hívjuk.

A II általános képletű lipo-oligoszacharidokat, amelyekben R jelentése CH_3CO -, a továbbiakban Ac-NodRm néven említjük; ha $n=2$, akkor a megfelelő lipo-oligoszacharidot Ac-NodRm-1-nek hívjuk; ha $n=3$, akkor a megfelelő lipo-oligoszacharidot Ac-NodRm-3-nak hívjuk.

A jelen találmány tárgya továbbá eljárás a jelen találmány szerinti, lényegében tiszta anyagok előállítására, amely eljárások közé tartoznak tisztítási eljárások, kiindulási anyagként Rhizobium tenyészetek felülúszóit használva, rutin eljárások, amelyek az osid szintézis során szekvenciális vagy

konvergens szintézist alkalmaznak, valamint génszbészeti eljárások az említett anyagok előállítására, kiindulási anyagként a Rhizobacteriaceae családba tartozó mikroorganizmusokba klónozott nod géneket alkalmazva, vagy egy megfelelő promoter szabályozása alá helyezve, és/vagy olyan szabályozó gének jelenlétében, amelyeket a megfelelő mutációknak vetettünk alá.

A jelen találmány szerinti, lényegében tiszta anyag előállításának egy előnyös megvalósítási módja szerint az első lépésben egy rekombináns plazmidot állítunk elő, amely egy klónozási kísérlet eredménye, amely során egy Rhizobacteriaceae baktériumban szaporodni képes plazmidba klónozzunk

(1) vagy egy olyan fragmentet, amely általános és specifikus nod géneket tartalmaz, valamint az adott Rhizobacteriaceae baktérium szabályozó génjeit,

(2) vagy a nod gének expressziójához szükséges szabályozó géneket.

A Rhizobacteriaceae baktériumokat, vagy bármely más megfelelő baktériumokat úgy módosítjuk, hogy az említett rekombináns plazmidot bejuttatjuk a sejtbe, hogy egy olyan mutáns törzset kapjunk, amely nagy mennyiségben túltermeli a Nod faktorokat, és az említett mutáns törzset megfelelő tenyésztő táptalajban növesztjük; egy második lépésben a tenyészet felülúszót kinyerjük, majd tisztítjuk egy megfelelő alacsony szénatomszámú alkohollal végzett extrakcióval, vagy szilárd-folyadék extrakcióval, amelyet az extrakciós maradék fordított fázisú HPLC kromatográfiája, egy gélpermeációs kromatográfia,

egy ioncserélő kromatográfia és egy analitikai HPLC kromatográfia követ.

A jelen találmány szerinti eljárás előnyös megvalósítási módja szerint a Nod túltermeléséért felelős plazmidot egy exopoliszacharidot nem termelő Rhizobiace baktériumba juttatjuk be.

A jelen találmány szerinti lényegében tiszta anyagok előállítására szolgáló eljárások egy másik előnyös megvalósítási módja szerint egy vad Rhizobiace baktérium törzset, amely nagy mennyiségben termeli a Nod faktort, használunk kiindulási anyagként, az említett törzset megfelelő tenyésztő táptalajban tenyésztve, majd a tenyészet felülúszóját eltávolítjuk, és az előzőekben leírt módszerekkel kezeljük.

A jelen találmány tárgyát képezi továbbá egy növény-kezelési eljárás, amelynek egy lényeges eleme az előzőekben meghatározott, lényegében tiszta anyag, pontosabban:

- egy, a növények patogénekkal szembeni védekező mechanizmusát serkentő anyag,
- egy, a Leguminose szimbiotikus tulajdonságait serkentő anyag, különös tekintettel a nitrogén-kötésre.

A jelen találmány szerinti növény-kezelésre használt ágens egy előnyös előállítási módja szerint az anyagot egy olyan készítmény formájában állítjuk elő, amelyet magvak bevonására, illetve permetezésre használt vizes oldat vagy szuszpenzió készítésére használunk, amelyben az említett anyag egyedül, illetve más aktív adalékanyagokkal együtt fordul elő.

A jelen találmány szerinti növény-kezelésre

használt ágens egy másik előnyös előállítási módja szerint az említett anyag a bevonó készítményben vagy a vizes oldatban illetve szuszpenzióban 10^{-6} mol/l és 10^{-14} mol/l közötti koncentráció-tartományban található, ha a növény-kezelési anyagot olyan ágensként akarjuk használni, amely serkenti a védekezési mechanizmust vagy a szimbiotikus tulajdonságokat.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy terápiás ágens, amelynek a, vagy egyik aktív adalékanyaga az előzőekben meghatározott lényegében tiszta anyag.

Ennek a terápiás ágensnek egy előnyös megvalósítási mód szerinti a koncentrációja a terápiás ágensben 10^{-5} és 10^{-8} mol/l között van.

Az előzőekben említett feltételek mellett a találmány egyéb feltételeket is tartalmaz, amelyek az alábbi leírásból világosak lesznek.

A találmány világosabban érthető lesz az alább következő további leírásból, amelyben az alábbi példákra hivatkozunk.

Az azonban nyilvánvaló, hogy ezek a példák, valamint a mellékelt ábrák csak a találmány illusztrálását szolgálják, és nem korlátozzák az oltalmi körét.

Példák

1. Példa -A találmány szerinti vegyületek előállítása tisztítással, egy Rhizobium meliloti tenyész-táptalajt használva kiindulási anyagként

A. A vegyület előállítása

Rhizobium-ban az extracelluláris Nod faktor termelése

egyrészt az általános nodA,B,C gének szabályozása alatt áll [van Brussel et al., Journal of Bacteriology, 165, 517-522 (1986); Zaat et al., Journal of Bacteriology, 169, 3388-3391 (1987); Faucher et al., Journal of Bacteriology, 170, 5489-5499 (1988)], másrészt pedig a gazdaspecifikus nod gének szabályozása alatt áll. A Rhizobium meliloti-ban például a nodH és nodQ gének szabályozzák a termelődését [Faucher et al., Journal of Bacteriology, 170, 5489-5499 (1988); Faucher et al., Molec. Plant-Microbe Interact., 2, 291-300 (1989)].

Az általános nodA,B,C gének transzkripciójának szabályozása a nodD1, nodD2, nodD3 és syrm gének által kódolt szabályozó fehérjék ellenőrzése alatt áll [Mulligan et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 82, 6609-6613 (1985); Györgypál et al., Molecular and General Genetics, 212, 85-92 (1988)]. A NodD1 fehérje csak bizonyos induktív flavonoidok, például luteolin jelenlétében aktív, amelyek a Leguminosa-k gyökérváladékában vannak jelen [Mulligan et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 82, 6609-6613 (1985); Peters et al, Science, 233, 977-980 (1986)]. A nodD3 és a syrm gének jelenléte a multikópiás plazmidon hajtja végre a nodA,B,C gének konstitutív aktiválását, még az induktív flavonoidok távollétében is [Mulligan et al., Genetics, 122, 7-18 (1989)].

A többi nod gén szabályozásának meghatározására a feltalálók fúziókat hoztak létre a gazdaspecifitásért felelős nodE, nodG és nodH gének és az Escherichia coli-ból származó β -galaktozidáz gén között. Ezek a fúziók tették lehetővé annak

kimutatását, hogy *Rhizobium meliloti*-ban a gazdaspecifitásért felelős nod gének szabályozása ugyanúgy zajlik le mint az általános nodA,B,C géneké:

- (i) transzkripciójukat a nodD1, nodD3 és a syrM gén aktiválja;
- (ii) a nodD1 aktiválásához luteolinra van szükség;
- (iii) a transzkripció aktiválása sokkal magasabb, ha a szabályozó gének és a struktúrgének az Inc-P1 inkompatibilitási csoportba tartozó plazmidon található (ezek 5-10 példányban található a sejtben).

Ez az információ serkentette a feltalálót arra, hogy a pRK290 plazmidot használják, amely a pRK2 plazmidból származik, és amelybe a *Rhizobium meliloti* pSym megaplazmid 30 kb méretű fragmentjét klónozták. Ez a rekombináns plazmid, jele pGMI149 tartalmazza az összes általános és specifikus nod gént, valamint a szabályozó géneket (nodD1, nodD3 és syrM) [Debellé et al., *Journal of Bacteriology*, 168, 1075-1086; Faucher et al., *Journal of Bacteriology*, 170, 5489-5499 (1988)]. Azt is kimutatták, hogy az a *Rhizobium meliloti* törzs, amely tartalmazza a pGMI149 plazmidot, túltermeli a Nod faktorokat; valóban ezek termelődése legalább százszor magasabb szinten történik mint a vad típusú *Rhizobium meliloti* törzsekben.

A Nod faktorok nagy mennyiségben való előállításához, például fermentoros tenyészetekben, az exopoliszacharidok nagy mennyiségben való termelése előnytelen a tenyészet szűrésére és a szignál molekula tisztítására gyakorolt előnytelen hatása miatt. A feltalálók ezért előnyösnek vélték, hogy a pGMI149-es

jelű, túltermelést okozó plazmidot egy olyan, EJ355 jelű *Rhizobium meliloti* mutánsba építsék be, amely nem termel exopoliszacharidokat. Az EJ355 (pGMI149) törzs nagy mennyiségben termeli a Nod faktorokat, de nem termel exopoliszacharidokat.

Az *Rhizobium meliloti*-ből származó nod gének és az *Escherichia coli*-ből származó lacZ gén közötti génfúziók alkalmazásával (nod::lac fúziók), amelyet arra a célra fejlesztettek ki, hogy mérjék a nod gének expressziós szintjét, a feltalálók egy olyan táptalajt fejlesztettek ki, amely lehetővé teszi a nod gének jó expresszióját és a Nod faktorok nagy mennyiségben való termelését. A megfelelő táptalaj egy szervesetlen táptalaj, amely szénforrásként szukcinátot tartalmaz, nitrogénforrásként és szénforrásként pedig glutamátot. Valójában egy gazdag táptalajon, amely fehérje lizátumokat és élesztő-kivonatot tartalmaz, a nod gének transzkripciója alacsony; emellett, a Nod faktorok tisztítása könnyebb egyszerű táptalajból készült tenyészet felülúszó felhasználásával. Ennek a táptalajnak az összetétele például az alábbi:

- szervesetlen sók:

14,7 mmol/l KH_2PO_4 , 11,5 mmol/l K_2HP_4 , 1 mmol/l MgSO_4 ,
0,46 mmol/l CaCl_2 , 37 $\mu\text{mol/l}$ FeCl_3 ;

- szerves vegyületek:

5,3 mmol/l nátrium-L-glutamát, 7,4 mmol/l nátrium-szukcinát, 2 $\mu\text{mol/l}$ biotin, 10 $\mu\text{mol/l}$ luteolin.

B.1. A vegyület tisztítása

B.1.1. A vegyületet 15 liter Rhizobium meliloti tenyészet felülúszóból extraháljuk butanollal (2 extrakció 3 liter butanollal). A butanos fázist 1 liter vízzel mossuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. A kapott maradékot 500 ml vízben oldjuk, majd kétszer extraháljuk etilacetáttal (kétszer 300 ml). A vizes fázist végül betöményítjük, majd fagyasztva szárítjuk.

B.1.2. Fordított fázisú HPLC

A butanos extrakció után kapott maradékot fordított fázisú HPLC-vel kromatografáljuk 10 μ m-es μ -Bondapak C₁₈ oszlopon (Waters Associates, 7,5 x 250 mm, áramlási sebesség 2 ml/perc) lineáris gradiens alkalmazásával, amely 80-20 víz - etanol elegytől (A) tiszta etanolig (B) változik; a detektálást 220 nm-en végezzük. A biológiai aktivitást mutató csúcsokat további tisztítás céljából összegyűjtjük.

B.1.3. Gélpermeációs kromatográfia

A frakciót gélpermeációval tisztítjuk Sephadex LH20 oszlopon (1 x 20 cm-es oszlop, LH20 fázis, Pharmacia) oldószerben, például etanolban, 4 ml/óra áramlási sebesség mellett. A kimutatást 220 nm-en végezzük. Az oszlopot előzőleg polietilénglikol standardokra (PEG) kalibráljuk (lásd az 1.2. ábrákat). Az aktív árnyékolt frakciót gyűjtjük.

B.1.4. Ioncserélő kromatográfia

Az aktív vegyületet (árnyékolt terület) egy ioncserélő oszlopon eluáljuk (1 x 2 cm-es DEAE-Triszakril oszlop; IBF)

lineáris NaCl gradienssel, amely 0 és 0,1 mol/l között változik 5×10^{-3} mol/l TRIS-HCl pH=8,2 pufferben (1.3. ábra).

B.15. Fordított fázisú analitikai HPLC kromatográfia

A végső tisztítási lépés egy fordított fázisú HPLC kromatográfia egy analitikai oszlopon (4,5 x 250 mm; 5 μ m-es Spherisorb/C₁₈ fázis) 80-20 víz-acetonitril elegyet használva oldószerként 1 ml/perc áramlási sebességgel; 300 μ g-ot injektálva (1.4a. ábra). Két olyan csúcsot detektálhatunk így, amelyek 220 nm-en elnyelést mutatnak és biológiai aktivitást mutatnak. A szerkezeti vizsgálat azt mutatja, hogy valójában ez ugyanaz a vegyület, két, egymással egyensúlyban álló formában (szabad α és β anomer forma).

B.2. Az összetevők elemzése

B.2.1. A monoszacharidok elemzése

A vegyület teljes hidrolízise után (3 mol/l HCl, 3 óra, 100°C), majd peracetilezett metil-glikozid származékká való átalakítása után egyetlen monoszacharid figyelhető meg gázfázisú kromatográfiával, amelyet 2-dezoxi-2-acetamidoglükóz-ként, vagy acetyl-glükózaminként (Nac Glc) lehet azonosítani. Erről a cukorról ki lehetett mutatni, hogy D konformációjú, miután elkészítettük a glükozid peracetátot egy királis alkohollal és összehasonlítottuk, VPC alkalmazásával D és L konfigurációjú (-)-2-butanol-N-acetyl-glükózamin standardokkal, amelyeket hasonló módon állítottunk elő.

A vegyületet nátrium-bór-deuteriddel redukálva (1 mol/l NaBD₄, 18 óra, 20°C), majd szabályozott metanolízisnek alávetve

(1 mol/l MeOH/HCl, 80°C, 1 óra), végül víz-diklórmetán megoszlást alkalmazunk. A vizes fázis 1-O-Me-NaCgln-t és 2-dezoxi-2-acetamido-glucitolt tartalmaz, amelyet VPC-vel azonosítunk (2.1. ábra); a VPC-vel való azonosítást egy 0,32 mm x 30 m-es OV1 oszlopon végezzük, héliumot és FID detektort alkalmazva. A szerves fázis tartalmazza a glükózamin metil-glikozidját, amely C_{16:2} zsírsavval van acilezve, és amelyet a per-triszililmetilezett származék elektron-bechapódásos tömegspektruma alapján azonosítunk, a szakirodalomból vett adatok alapján [Demary, M. et al., Nouv. J. Chimie, 2, 373-378 (1977)]; a nitrogénatomon amidált és pertrimetil-szililezett 1-OMe glükózamin elektron-bechapódásos spektrumát a 2.3. ábrán mutatjuk be. Az oldallánc katalitikus hidrogénezése, metanolízis (MeOH, 3 mol/l HCl, 2 óra), majd acetilezés után a peracetilezett származékokon VPC elemzést végzünk, amit egy 0,32 mm x 30 m-es OV1 oszlopon hajtunk végre, héliumot és FID detektort használva, és így lehetséges az N-acil-cukor szerkezetének megerősítése, az 1-OMe-GlcNAc és metil-palmitát láthatóvá tételével (az utóbbit kisebb mennyiségű metil-sztearát is követi) (2.2. ábra).

Ez az elemzés lehetővé teszi, hogy három glükózamin jelenlétét állapítsuk meg: NAcGlc, redukáló NAcGlc és N-acil-Glc, a mellékletben megadott 3. ábrán összefoglalt analitikai eljárás alkalmazásával.

B.2.2. Zsírsav-összetétel

Lehetséges volt a vegyületben levő zsírsavak izolálása szappanosítás után (5% KOH, 18 óra, 80°C), majd VPC-vel

elemeztük - egy 0,32 mm x 30 m-es OV1 oszlopon, héliumot és FID detektort használva - metilészterek formájában (2.4. ábra). Ez a vizsgálat tette lehetővé, hogy azonosítsunk, a túlnyomó többségben levő $C_{16:2}$ zsírsavak mellett más minor komponenseket is: $C_{16:0}$, $C_{16:1}$, $C_{18:0}$, és $C_{18:1}$. A $C_{16:2}$ zsírsav két kettős-kötésének a helyét meg lehetett határozni a perfluorbenzil-észteréből keletkező karboxilát MS-MS tömegspektruma alapján [J.C. Promé et al., Rapid Comm. Mass Spectrom., 1, 80-82 (1987)], és a lánc 2-es és 9-es pozíciójában lokalizáltuk.

B.2.3. Egy szulfát funkciós csoport kimutatása

Miután a baktériumokat ^{35}S -jelzett nátrium-szulfát jelenlétében tenyésztettük, majd a vegyületet megtisztítottuk, az UV-abszorpciós profil és a ^{35}S -beépülés között megfigyelt korreláció lehetővé teszi, hogy megállapítsuk egy szulfátcsoport jelenlétét ebben a vegyületben. Az 1.4b. ábrán látható az említett korreláció, amit azután kaptunk, hogy a sejteket (^{35}S)- Na_2SO_4 -en tenyésztve a ^{35}S beépült, majd az 1.4a. ábrán bemutatott profil alapján frakcionálást végeztünk, és a radioaktivitást folyadék-szcintillációval meghatároztuk.

B.2.4. Az interglikozid kötési mód meghatározása

A különböző glükózaminok közötti kötés módját a NaBD_4 -gyel redukált vegyület permetilezése, hidrolízise és az alditol-acetát elkészítése után határozzuk meg, az előzőleg leírt módszerek alkalmazásával [K. Stellner et al., Arch. Biochem. Biophys., 155, 464-472 (1973)], majd ezt követő VPC elemzéssel; a redukált vegyület permetilezése után kapott alditol-acetátok elektron-beecsapódásos tömegspektrometriájával kapott adatok a

2.5. ábrán láthatók. Ez a vizsgálat tette lehetővé, hogy azonosítsuk azokat az aldol-acetátokat, amelyek tetrametilezve vannak az 1, 2, 3 és 5-ös pozícióban (a spektrum) és a 2, 3, 4 és 6-os pozícióban (b spektrum), valamint tri-O-metilezve vannak a 2, 3 és 6-os pozícióban (c spektrum), amelyek egy megfelelő redukáló glükózaminból származnak, amely a 4-es és 6-os pozícióban van helyettesítve, egy terminális glükózaminból, és egy olyan glükózaminból, amely az 1-es és 2-es pozíciókban tartalmaz kötéseket.

B.3. Tömegspektrometria

B.3.1. Pozitív FAB tömegspektrometria

A vegyület pozitív FAB tömegspektruma (4.1. ábra, szkennelés a 4000 m/z -től a 100-s m/z -ig (névleges tömeg) egy pszeudomolekuláris iont mutat $(M+H)^+$, $mz=1103$, ezt kíséri egy nátrium-tartalmú ion, amely megfelel az $m/z=1125$ -ös értéknek. Fragment-ionok megfigyelhetők az $m/z=1023$ és 802-es értéknél, amelyek megfelelnek a szulfát illetve NAcGükózamin-szulfát vesztésnek. Az $m/z=8-2$ ion lebomlását MS-MS spektrometriával figyeljük meg (4.2 ábra; B/E szkennelés), ami két glikozil-fragmentet eredményez az $m/z=599$ és 396 értéknél, a különböző monoszacharidok közötti törést követően. Ez a két spektrum teszi lehetővé, hogy megállapítsunk egy lineáris tetraszacharid szerkezetet, amelynek a redukáló cukor részét egy szulfát funkciós csoport helyettesíti, és a terminális cukor pedig egy $C_{16:2}$ zsírsavat tartalmaz.

B.3.2. Negatív FAB tömegspektrometria

Az $m/z=1101$ -nél megfigyelt pszeudomolekuláris ion

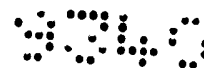
mellett a negatív FAB spektrum olyan fragmenteket is mutat, amelyek a glikozid üregeknek tulajdoníthatók. Ezeknek az ionoknak az elemzése olyan szerkezeti következtetésekre vezet, amelyek hasonlítanak az előzőekben leírtakhoz; lásd a 4.3 ábrát, amely a negatív FAB ionizációjú tömegspektrumot mutatja, hordozóként tioglicerint használva.

B.4. NMR

B.4.1. ^1H NMR és proton homonukleáris 2D-NMR (COSY)

Az ^1H NMR és a COSY-NMR spektrumokra vonatkozó adatok lehetővé teszik, hogy az alábbi szerkezeti elemeket határozzuk meg:

a) Az oldallánc az ^1H NMR-ben két különböző típusú vinil-protont mutat, ami megfelel két kettős kötésnek. Két alacsony térerejű jel ($\delta = 5,95$ ppm; ^1H és $\delta = 6,80$ ppm; ^1H) egy olyan kettős kötéshez rendelhető, amely a karbonil funkciós csoporthoz van konjugálva, és nagy kapcsolási állandóval rendelkeznek ($J = 15$ Hz), ami egy E konfigurációra jellemző; az 5.1. ábrán látható az előzőekben említett ^1H NMR spektrum; oldószerként CD_3OD -t használunk, a használt frekvencia 300 MHz ("Bruker" berendezés). A láncon belüli kettős kötés két, mágneses szempontból ekvivalens protonja egyetlen jelként jelentkezik ($\delta = 5,35$ ppm). Ennek a két kettős kötésnek a protonja 2D-COSY-val egy sorozat korrelációt mutat a többi alifás protonnal, ami egy lineáris láncra jellemző; az 5.2 ábrán a COSY ^1H homonukleáris 2D-NMR spektrumot láthatjuk, amelyet oldószerként CD_3OD -t használva, 300 MHz frekvencián kaptunk ("Bruker" berendezés).



b) Anomer protonok: a szacharid régió COSY ^1H homonukleáris 2D-NMR spektrumát az 5.3. ábrán látjuk; ez a spektrum, amelyet oldószerként CD_3OD -t használva, 300 MHz frekvencián kaptunk ("Bruker" berendezés) azt mutatja a 3,4-től 5,2 ppm-ig terjedő szacharid proton régióban, hogy 5 jelnek csak egy korrelációja van, amelyek az anomer protonokhoz rendelhetők. Továbbá, nincs olyan jel, amelyet egy vízzel képezett, rezolválatlan komplex maszkol, amit az is mutat, hogy ebben a spektrum-régióban nincs korreláció. Ezek az anomer jelek megfelelnek a β kötések három duplettjének (delta = 4,40-től 4,55 ppm-ig terjedő szakasz; 3H; $J=8,5$ Hz), valamint az α és β formák anomer protonjainak tulajdonítható két duplettnak (delta(α) = 5,05 ppm; $J=3,4$ Hz és delta(β) = 4,60 ppm; $J=8,5$ Hz).

c) A gyűrűk protonjai: a szacharid gyűrűket az acetamid csoportok metil-jelei jellemzik, amelyek felhasadnak az oligoszacharid szabad α és β formáinak együtt létezése következtében (delta = 2,0-től 2,15 ppm-ig, 6s; 9H). A gyűrű többi protonja 3,2 és 3,9 ppm között rezonál. Csak három jel, amelyek kevésbé vannak maszkolva, tulajdonítható a szulfát-csoport közelében található hidrogénatomoknak. Ennek a három jelnek 2D-COSY-val megfigyelt korrelációs módja (5.3. ábra) jellemző az 5-ös és 6-os protonokra (H_5/H_{6b} , H_5/H_{6a} és $\text{H}_{6a}/\text{H}_{6b}$ korreláció). Ez az eredmény teszi lehetővé, hogy a szulfát funkciós csoportot a 6-os pozícióban helyezzük el.

B.4.2. ^{13}C NMR

A proton-szétcsatolt ^{13}C NMR spektrum különböző jeleinek

a hozzárendelése (5.4. ábra) lehetővé tette, hogy megerősítsük egy kettős telítetlenséget tartalmazó zsírsav-lánc jelenlétét, a glükózaminok közötti β 1-4 kötés jelenlétét valamint a szulfátnak a 6-os pozícióban való létét az alábbi elemek alapján: az 5.4 ábra mutatja az 50,4 MHz-nél kapott ^{13}C NMR spektrumot ("Bruker" berendezés), oldószerként D_2 -t használva:

a) Zsírsav-lánc: az oldallánc szénatomjainak (C_2 -től C_{16} -ig) kémiai eltolódásai egy olyan zsírsavra jellemzők, amelyek egy konjugált kettős kötést tartalmaznak (C_2 és C_3 ; $\delta = 125$ és 155 ppm), valamint egy belső kettős kötést (C_9 és C_{10} , $\delta = 133$ ppm).

b) Anomer szenek: egy nagyon erős jel ($\delta = 103,7$ ppm), amely a nem-redukáló monoszacharidok anomer szénatomjaihoz rendelhető hozzá, egy olyan kémiai eltolódást mutat, amely hasonlít a NAcGlc metil-glükopiranozid C_1 szénatomjának kémiai eltolódásához. Két alacsonyabb intenzitású jel az ebben a két szabad anomer formában megjelenő redukáló glükózamin C_1 csoportjához rendelhető hozzá ($\delta_{\text{C}_{1\alpha}} = 93,1$ ppm és $\delta_{\text{C}_{1\beta}} = 97,8$ ppm).

c) Gyűrű: az irodalmi adatokból tudjuk, hogy a különböző jelek hozzájárulása vezet a β 1-4 kötésnek a megerősítéséhez ebben a tetraszacharidban. Ezt a hozzájárulást bonyolítja egy szeparálódás, a redukáló glükózamin szénatomjainak két jelcsoportjára. A szulfát funkciós csoportnak a 6-os pozícióban való meglétét a 6-os szénatom megfigyelt maszkolás-nélkülisége okozza, ami ezt a funkciós csoportot hordozza ($\delta_{\text{C}_{6-1}} = 68,7$ ppm).

2. Példa: A NodRM-1 faktor biológiai aktivitásának kimutatása

A biológiai aktivitásokat a következőképpen mutattuk ki:

(i) a gyökérszőrök bükkönyön megfigyelt deformációjának specifikus aktivitásán keresztül (Had) [Zaat et al., Journal of Bacteriology, 169, 3388-3391],

(ii) a lucerna gyökérszőrök deformációjának és elágazásának specifikus aktivitás tesztjével [Faucher et al., Journal of Bacteriology, 170, 5489-5499; Faucher et al., Molec. Plant-Microbe Interact., 2, 291-300 (1989)], bizonyítva ezzel, hogy a találmány szerinti vegyület egy növény-specifikus szimbiotikus jel, amelynek a termelése a nod gének szabályozása alatt áll.

Tények:

1) Három különböző típusú, eltérő fizikai-kémiai tulajdonságokon alapuló tisztítási eljárás, például ioncsere, gélszűrés, és fordított fázisú kromatográfia, után abszolút korreláció figyelhető meg minden esetben ennek a molekulának a jelenléte - amit a HPLC profillal, tömegspektrometriával és ^1H NMR spektrometriával jellemezhetünk - és a lucernára gyakorolt specifikus Had aktivitása között;

2) A nod gének aktivitásának növekedése, akár a transzkripció indukciójával, akár ezen gének kópiaszámának növelésével, korrelációban van a molekula termelődésének növekedésével, miközben egy Tn5 transzpozon beépülése következtében fellépő mutáció a nodA vagy nodC génekben a

termelődésének elnyomását eredményezi;

3) a NodRm-1 vegyület biológiai aktivitása, amint azt a gyökérszőrök elágazásának biológiai vizsgálatával meghatároztuk, nagyon magas és specifikus.

Egy NodRm-1 oldat 10^{-8} - 10^{-10} mol/l koncentráció-tartományban előidézi a Had reakciókat lucernában, egy homológ gazdában, de bükkönyben nem, ami egy heterológ gazdaszervezet. A NodRm-1 vegyület (lásd a II. általános képletet) aktív marad a lucernára 10^{-11} mol/l koncentrációban is.

Az ^1H NMR spektrum a NodRM-1 vegyület minimum 95%-os tisztaságát mutatja (lásd az 5.1. ábrát).

Egy aromás magot tartalmazó molekulák, ami jellemző a növényi hormonokra, például az auxinra és a citokininre, nem mutatható ki az aktív frakcióban. Ennek következtében a lehetséges hormon szennyeződések 10^{-12} mol/l koncentrációnál kisebb mennyiségben kell hogy jelen legyenek, azaz körülbelül egymilliószor kisebb koncentrációban, mint az a határkoncentráció (10^{-7} mol/l), aminél ezek a hormonok hatni kezdenek, ha exogén úton adjuk be őket, ezzel jelezve azt, hogy a megfigyelt hatás nem tulajdonítható az ilyen szennyeződéseknek.

A gazda-specifikus génekben érintett Rhizobium meliloti mutánsok abszolút korrelációt mutatnak az élő Rhizobium sejtek szimbiotikus tulajdonsága és steril felülúszók Had bioesszéiben mutatott specifitása között, jelezve ezzel, hogy a Nod jelek a specifikus fertőzés és noduláció indukciójában vesznek részt.

A NodRM-1 vegyület mind nagyon magas biológiai aktivitást, mind nagyon magas specifitást mutat. Tény az, hogy

olyan reakciókat okoz, amelyek a gazdanövényben 10^{-12} mol/l koncentrációnál már kimutathatók, míg az ismert növényi hormonok, például az auxinok és citokininek ennél lényegesen magasabb koncentrációban hatnak (10^{-7} - 10^{-8} mol/l). Másrészt pedig a "kierőszakoló" típusú oligoszacharidok, amelyeket a szakirodalomban már leírtak, és amelyek alacsony koncentrációban (10^{-9} mol/l) hatnak, nem specifikusak, míg a találmány szerinti NodRm-1 szignál molekula nagyon specifikus hatású: miközben hat a lucernára, egy homológ növényre 10^{-12} mol/l koncentrációban, inaktív marad egy nem-gazdanövényen, például a bükkönyön, még 10^{-8} mol/l koncentrációban is. Tehát előállít a molekula új és fontos tulajdonságokkal rendelkezik a növényekre gyakorolt hatását illetően.

A baktériumok távollétében és alacsony koncentrációban (10^{-7} - 10^{-9} mol/l) a NodRm-1 szignál-molekula számos mitotikus osztódást okoz a lucerna gyökér-kortexében: ennél fogva a NodRm-1 magas mitotikus aktivitással rendelkezik.

A baktériumok távollétében és alacsony koncentrációban (10^{-7} - 10^{-9} mol/l) a NodRm-1 szignál-molekula gümőképződést okoz a lucerna-gyökereken, amely gümők a szimbiotikus baktériumok által okozott lucerna gümők ontológiai, morfológiai és anatómiai jellemzőit mutatják. A NodRm-1 tehát organogenetikus hatással van a lucerna gyökereire.

A baktériumok távollétében és nagyon alacsony koncentrációban (10^{-9} - 10^{-12} mol/l) a NodRm-1 a lucerna gyökérszőrök deformációját okozza, és a Leguminosák szimbiotikus génjeinek az átírását. Ugyanezekben a dózisokban Rhizobium

meliloti jelenlétében, a NodRm-1 vegyület hozzáadása a fertőzés és a gyökérgümők képződésének felgyorsulását okozza. Ennek a Leguminosakhoz való hozzáadása, például úgy, hogy a vetéssel egyidőben bevonjuk vele a magvakat, felgyorsítja a gümőképződést és a nitrogénkötés létrejöttét.

Fontos azt kihangsúlyozni, hogy ez az első eset, amikor szulfatált hexózaminok oligomerjeit izolálták egy baktériumból. Szulfatált cukrokat izoláltak állatokból, de ezeket sem nem mutatták ki sem nem izolálták, sem növényekből sem baktériumokból.

Továbbá, a jelen találmány szerinti szulfatált és acilezett hexózamin oligomerek jelentős biológiai aktivitással rendelkeznek, amennyiben végtelenül kis dózisban is van aktivitásuk; valójában legalább 100 000-szer aktívabbak mint a növényi hormonok. Az ilyen kis dózisban ilyen aktivitással rendelkező természetes anyagok alkalmazását eddig nem javasolták a növények világában. Ez a nagyon jelentős aktivitás azt sugallja, hogy a találmány szerinti vegyületeknek erős affinitásuk van bizonyos receptorokhoz - ez egy olyan affinitás, ami lényegesen magasabb, mint az eddig leírt termékeké, beleértve a növényi hormonokat is. Azok a receptorok, amelyeknek cukrokra van nagy affinitásuk, általában glikoprotein, főleg lektin szerkezetűek; ilyen receptorok mégis léteznek az állatvilágban; a találmány szerinti anyagokat ezért úgy kell tekinteni, mint amelyek képesek fontos terápiás aktivitások hordozói lenni. Pontosabban a találmány szerinti ágens alkalmas többek között arra is, hogy emberben és az állatokban serkentse a patogénnel

szembeni védekező mechanizmusokat.

3. Példa Az Ac-NodRm-1 és Ac-NodRm-3 anyagok előállítására Rhizobium meliloti tenyészet felülúszójából való tisztítással

A. A vegyületek tisztítása

Abban az esetben, ha a "túltermelést" okozó pGMI149-es plazmid helyett a pMH682 plazmidot juttatjuk be a Rhizobium meliloti 2011-es törzsbe, amely plazmid csak a syrM/NodD3 szabályozó génpárt tartalmazza, akkor az általános és specifikus nod gének transzkripciójának erős emelkedését kapjuk, valamint a termelt Nod faktorok mennyisége is megemelkedik. Egy ilyen törzs felülúszójának butanolos kivonata, HPLC kromatográfiával való frakcionálás után a Rhizobium meliloti 2011 (pGMI149)-es törzs kivonatától eltérő profilt mutat, ami arra utal, hogy új anyagok keletkeztek.

B. A vegyületek szerkezetének meghatározása

1. Tisztítás

A vegyületeket az 1. példában leírtak alapján tisztítjuk. A végső fordított fázisú analitikai HPLC kromatográfiás lépés teszi lehetővé, hogy az Ac-NodRm-1 vegyületet elválasszuk az Ac-NodRM-3 vegyülettől.

2. Szerkezeti vizsgálatok

2.1. Az Ac-NodRm-1 vegyület szerkezete

2.1.1. Nátrium-metanoláttal való kezelés

Nátrium-metanoláttal kezelve az Ac-NodRm-1 NodRm-1-gyé alakul, amelynek szerkezetét az 1. példában leírtak alapján

határozzuk meg.

2.1.2. Tömegspektrometria

Az Ac-NodRm-1 vegyület pozitív FAB tömegspektruma (6A. ábra) egy protonált molekula-iont mutat $m/z=1145$ értéknél, valamint az $(M+Na)^+$ iont $m/z=1167$ értéknél és az $(M+2Na-H)^+$ iont $m/z=1189$ értéknél. A protonált molekula-ion lebomlása MS/MS spektrometriával (6B. ábra: B/E scan) eredményezi az $m/z=1065$, $m/z=844$, $m/z=641$ és $m/z=438$ -as fragment ionokat. Az $m/z=1065$ és $m/z=884$ értékeknél megfigyelhető fragment ionok az SO_3 valamint az N-acetil-D-glükózamin elvesztésének tulajdoníthatók. Az $m/z=641$ és $m/z=438$ értéknél kapott fragmentek megfelelnek az interglikozid kötések törésekor kapott glikozilium ionoknak. Ez a két spektrum azt mutatja, hogy az Ac-NodRm-1 vegyület csak abban különbözik a NodRm-1 vegyülettől, hogy egy acetát csoportot tartalmaz a nem-redukáló terminális glükózaminon.

2.1.3. 1H NMR

Az Ac-NodRm-1 vegyület 1H NMR spektruma teszi lehetővé, hogy az 1. példában leírt szerkezeti elemeket meghatározzuk (B.4.1. pont) a NodRm-1 vegyületre.

- (i) két kettős-kötés, az egyik konjugált, E konfigurációjú;
- (ii) anomer jelek, a β kötésre jellemzőek;
- (iii) a 6-os pozícióban levő szulfát csoportra jellemző jelek.

Emellett két jel ($\delta = 4,16$ ppm és $\delta = 4,46$ ppm), amely hiányzik a NodRm-1 vegyület spektrumából és O-dezacetilezés után eltűnik, teszi lehetővé, hogy az acetát csoportot a

nem-redukáló terminális cukor 6-os pozíciójában helyezzük el.

2.2. Az Ac-NodRm-3 vegyület szerkezete

Az Ac-NodRm-3 vegyület szerkezetét pozitív FAB spektrometriával határozzuk meg (ábra). Egy protonált molekula-ion figyelhető meg $m/z=1348$ értéknél, valamint nátrium-tartalmú ionok $(M+Na)^+$ $m/z=1370$ értéknél illetve $(M+2Na-H)^+$ $m/z=1392$ értéknél. Az $m/z=1268$ és $m/z=1047$ értéknél megfigyelt ionok az SO_3 veszteségnek, valamint az $(M+H)^+$ -ből való N-acetilglükózamin-szulfátnak tulajdoníthatók. Az $m/z=844$, $m/z=641$ és $m/z=438$ ionok az interglikozidos hasításból származó glikozilium ionoknak tulajdoníthatók. Ez a spektrum azt mutatja, hogy az Ac-NodRm-3:

- (i) öt D-glükózamin származék lineáris láncát tartalmazza;
- (ii) tartalmaz egy duplán telítetlen, 16 szénatomból és egy O-acetát csoportból álló N-acil láncot a nem-redukáló terminális glükózamin csoporton;
- (iii) egy szulfát funkcionális csoportot tartalmaz a redukáló N-acetil-D-glükózamin csoporton.

Az Ac-NodRm-3 vegyületet exokitinázzal (*Streptococcus griseus*-ból extrahált, Sigma) inkubálva elsősorban egy N-acetil-D-glükózamin és N-acil-O-acetil-D-glükózamin dimer szabadul fel, ami azt mutatja, hogy az első három N-acetil-D-glükózamin közötti kötés β -1,4 típusú. Az Ac-NodRm-3 endokitinázzal (szintén *Streptococcus griseus*-ból extrahálva, Boehringer) emésztve N-acil-O-acetil-D-glükózamint kapunk, ami arra utal, hogy a nem-redukáló terminális csoport is β -1,4 típusú kötéssel

kötődik.

4. Példa - Nod faktorok előállítása egy *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* tenyészléből

A. A Nod faktorok előállítása

Az európai országokban a fehérjében gazdag növények, úgymint a borsó és a szántóföldi bab termesztése sokat fejlődött az utóbbi években. A feltalálók ezért azt vizsgálják, hogy miként termeli a *Rhizobium leguminosarum* b.v. *viciae*, ami ezeknek a fehérjében gazdag növényeknek a szimbiotikus baktériuma, a Nod faktort.

A feltalálók bejuttatták a p1J1089 plazmidot a *Rhizobium leguminosarum* 248-as törzsbe, azzal a céllal, hogy ezeknek a jeleknek a termelésében növekedést idézzenek elő. Ez a plazmid, amely a pLAFR1 vektorból származik, a *Rhizobium leguminosarum* teljes Nod régióját tartalmazza, azaz a *nodD*, *nodABCIJ*, *nodFEL*, *nodMNT*, *nodO* operonokat [Downie et al., EMBO J., 2, 947-952 (1983)].

A 248-as törzset (p1J1089) ugyanabban a táptalajban tenyésztjük mint a *Rhizobium meliloti*-t, de a *nod* gének transzkripciójának indukciójára luteolin helyett egy flavanont, naringenint használtunk. A *nod* gének indukciója után a tenyészet felülúszója nagy aktivitást mutat egy megfelelő bükkönyfajta (*Vicia sativa* subsp. *nigra*) gyökérszőreinek deformációjára. Ez az aktivitás nem mutatható ki a *Rhizobium leguminosarum* 248-as törzs felülúszójában, amely a *nodABC* általános génekben mutációt tartalmaz.

B. Tisztítás

A Nod vegyületeket a tenyészléből extraháljuk, az 1. példában leírtak alapján (B.1.1.1). A kivonatot fagyasztva szárítjuk, majd fordított fázisú HPLC-vel kromatografáljuk, az 1. példában leírtak alapján (B.1.2.). A Nod vegyületeket ezután egy Sep-Pak QMA tölteten tisztítjuk (Waters Millipore) acetát formában. A vegyületeket 5 ml abszolút etanollal tisztítjuk.

C. A szerkezet meghatározása

A pozitív FAB tömegspektrum főleg három protonált molekulaiont mutat $m/z=1067$, $m/z=1069$ és $m/z=1095$ értékeknél, ezeket kísérik a megfelelő nátrium-tartalmú ionok $(M+Na)^+$ $m/z=1089$, $m/z=1091$ és $m/z=1117$ értékeknél. Az ion elbomlása MS/MS spektrometriával $m/z=1089$ értéknél ($m/z=1091$ és $m/z=1117$) adja az $m/z=868$ értéknél a fragment ionokat ($m/z=870$ és $m/z=869$), valamint $m/z=665$ -nél ($m/z=667$ és $m/z=693$) és $m/z=462$ -nél ($m/z=464$ és $m/z=490$) is a fragment ionokat. Ezeket az ionokat interglikozidos törések következtében kapjuk, az ezt követő 203-as fragment-vesztéssel együtt, ami megfelel egy N-acetil-glükózamin csoportnak. Ezek a spektrumok azt mutatják, hogy a NodR1 vegyületek N-acetil-hexózaminok lineáris láncából állnak. Az $m/z=462$, 464 és 490 ionok a különbözőképpen N-acilezett O-acetil-hexózaminok.

A nem-redukáló terminális csoportokon levő zsírsavak elemzését GC/MS módszerrel végezzük, a B.2.2. pontban leírt eljárással végzett szappanosítás után. Ez a vizsgálat tette lehetővé, hogy az alábbi, túlnyomó többségben levő zsírsavakat

azonosítsuk: C₁₆:2, C₁₅:1 és C₁₈:1.

Amint az a fentiekből nyilvánvaló, a találmányt a legkevésbé sem korlátozzák a különböző megvalósítási módok és alkalmazások, amelyeket éppen az előzőekben írtunk le; ezzel ellentétben, a találmány az összes olyan variánsra vonatkozik, amely egy, a szakterületen jártas szakember számára elképzelhető, anélkül, hogy a jelen találmány oltalmi körétől eltérnénk.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás egy lipo-oligoszacharid vagy lipo-oligoszacharidok keverékének alkalmazására a Rhizobiumok Nod faktorainak tulajdonságaival rendelkező termékek előállítására.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett lipo-oligoszacharidokat növény-specifikus szimbiotikus jelekként használjuk, amely képes arra, hogy növelje a baktériumoknak arra a gazdanövényre vonatkozó fertőzési képességét, amellyel együtt él, és/vagy felgyorsítsa a gümők képződését azon a gazdanövényen amellyel együtt él, és/vagy indukálja a Leguminosák szimbiotikus génjeinek transzkripcióját.
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett lipo-oligoszacharid általános szerkezete egy hexózamin oligomer, amelynek nem-redukáló terminális hexózaminja egy zsírsavval N-szubsztituálva van.
4. az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett lipo-oligoszacharid általános szerkezete egy hexózamin oligomer, amelynek nem-redukáló terminális hexózaminja egy legalább 12 szénatomot tartalmazó zsírsavval N-szubsztituálva van.
5. Lipo-oligoszacharid, azzal jellemezve, hogy szerkezete a I általános képlettel írható le, amelyben
- G jelentése egy különbözőképpen szubsztituált hexózamin, például a nitrogénatomon acetil-csoporttal, szulfát-csoporttal, egy acetil-csoporttal és/vagy egy éter-csoporttal az egyik oxigénen;

- R_1, R_2, R_3, R_5, R_6 és R_7 jelentése lehet azonos vagy különböző, lehet hidrogénatom, $\text{CH}_3\text{-CO-}$, $\text{C}_x\text{H}_y\text{CO-}$ csoport, amelyben x értéke 0 és 17 közötti egész szám, y értéke 1 és 35 közötti egész szám, illetve bármely más acil-csoport, például karbamil-csoport;

- R_4 jelentése egy egyszeres, kétszeres vagy háromszoros telítetlenséggel rendelkező alifás szénatom, amely legalább 12 szénatomot tartalmaz, és

- n értéke 1 és 4 közötti egész szám.

6. Az 5. igénypont szerinti lipo-oligoszacharid, azzal jellemezve, hogy G jelentése:

- *Rhizobium meliloti*-ban egy N -acetil- D -glükózamin-6 szulfát;

- *Rhizobium leguminosarum* b.v. *viciae*-ben egy N -acetyl- D -glükózamin.

7. Az 5. vagy 6. igénypont szerinti lipo-oligoszacharid, azzal jellemezve, hogy szerkezete a II általános képlettel írható le, amelyben R jelentése hidrogénatom vagy $\text{CH}_3\text{CO-}$ csoport, n értéke pedig 2 vagy 3.

8. Eljárás az 5-7. igénypontok bármelyike szerinti lipo-oligoszacharidok előállítására, azzal jellemezve, hogy az eljárást az alábbi csoportból választjuk: kiindulási anyagként *Rhizobium* tenyészet felülúszókat használunk tisztítási eljárásokhoz, rutin eljárásokat alkalmazunk, amelyekben szekvenciális vagy konvergens szintéziseket vagy folyamatokat használunk az említett anyagok előállítására génsebészeti módszerekkel, kiindulási anyagként a *Rhizobium* családba tartozó

mikroorganizmusokba klónozott nod géneket használva kiindulási anyagokként, vagy más módon, opcionálisan egy megfelelő promoter szabályozása alatt és/vagy szabályozó gének jelenlétében, amelyeket a megfelelő mutagenézisnek vetettünk alá.

9. Eljárás az 5-7. igénypontok bármelyike szerinti lipo-oligoszacharid előállítására tisztítással, azzal jellemezve, hogy az első lépésben egy klónozásból származó rekombináns plazmidot állítunk elő oly módon hogy egy Rhizobium baktériumban, vagy bármely más baktériumban szaporodni képes plazmidba klónozzunk

(1) vagy egy olyan fragmentet, amely általános és specifikus nod géneket tartalmaz, valamint az adott Rhizobium baktérium szabályozó génjeit, vagy

(2) vagy a nod gének expressziójáért felelős szabályozó géneket.

A Rhizobium baktériumokat, illetve bármely más baktériumot ezután úgy módosítjuk, hogy az említett rekombináns plazmidot bejuttatjuk a sejtekbe, hogy ezzel egy olyan mutáns törzset kapjunk, amely nagy mennyiségben túltermeli a Nod faktorokat és az említett mutáns törzset egy megfelelő táptalajon tenyésztjük; a második lépésben a tenyészet felülúszóját kinyerjük, majd alkalmas alacsony szénatomszámú alkohollal tisztítjuk, vagy szilárd-folyadék extrakcióval és az extrakciós maradék fordított fázisú HPLC kromatográfiájával tisztítjuk, illetve gél-permeációs kromatográfiával, ioncserélő kromatográfiával és egy fordított fázisú analitikai HPLC

kromatográfiával.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a Nod faktor túltermelését kódoló plazmidot a Rhizobium baktériumoknak egy exopoliszacharidot nem termelő mutánsába juttatjuk be.

11. Eljárás az 5-7. igénypontok bármelyike szerinti lipo-oligoszacharidok előállítására, azzal jellemezve, hogy kiindulási anyagként a Rhizobium baktériumoknak egy, a Nod faktorokat nagy mennyiségben termelő vad törzsét használjuk, az említett törzset egy megfelelő táptalajban tenyésztjük, majd a tenyészet felülúszót kinyerjük, és a 9. igénypont szerinti eljárás 2. lépése szerint tisztítjuk.

12. Növények kezelésére alkalmas hatóanyag, azzal jellemezve, hogy aktív komponense egy, az 5-7. igénypontok bármelyike szerinti lipo-oligoszacharid.

13. A 12. igénypont szerinti, növények kezelésére alkalmas hatóanyag, azzal jellemezve, hogy az aktív hatóanyag 10^{-6} - 10^{-14} mol/l koncentrációban van jelen.

14. Emberben és állatokban aktív terápiás hatóanyag, azzal jellemezve, hogy az aktív komponense egy, az 5-7. igénypontok bármelyike szerinti lipo-oligoszacharid.

15. A 14. igénypont szerinti terápiás hatóanyag, azzal jellemezve, hogy egy készítményben 10^{-5} - 10^{-8} mol/l koncentrációban van jelen.

37 oldal
17 ábraválasz

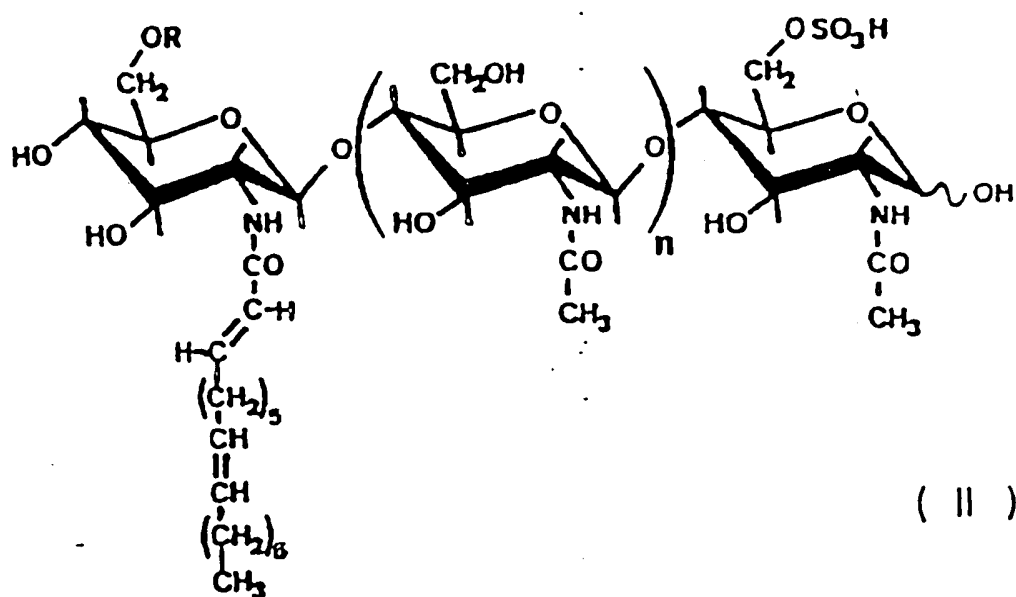
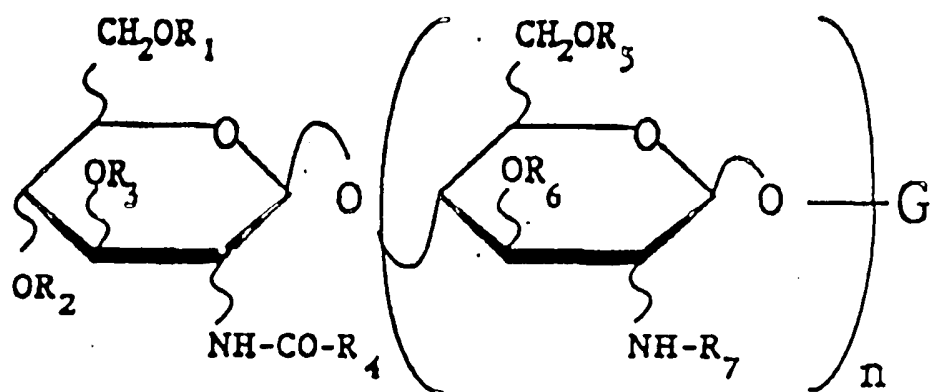
54

A meghatalmazott:

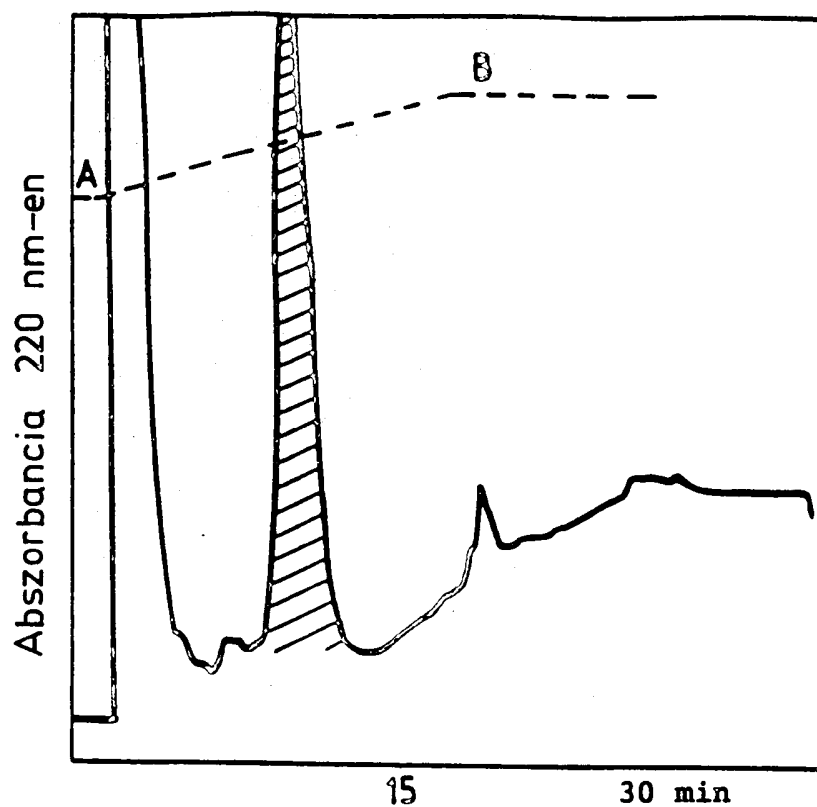
Dr. László E.

[Handwritten signature]

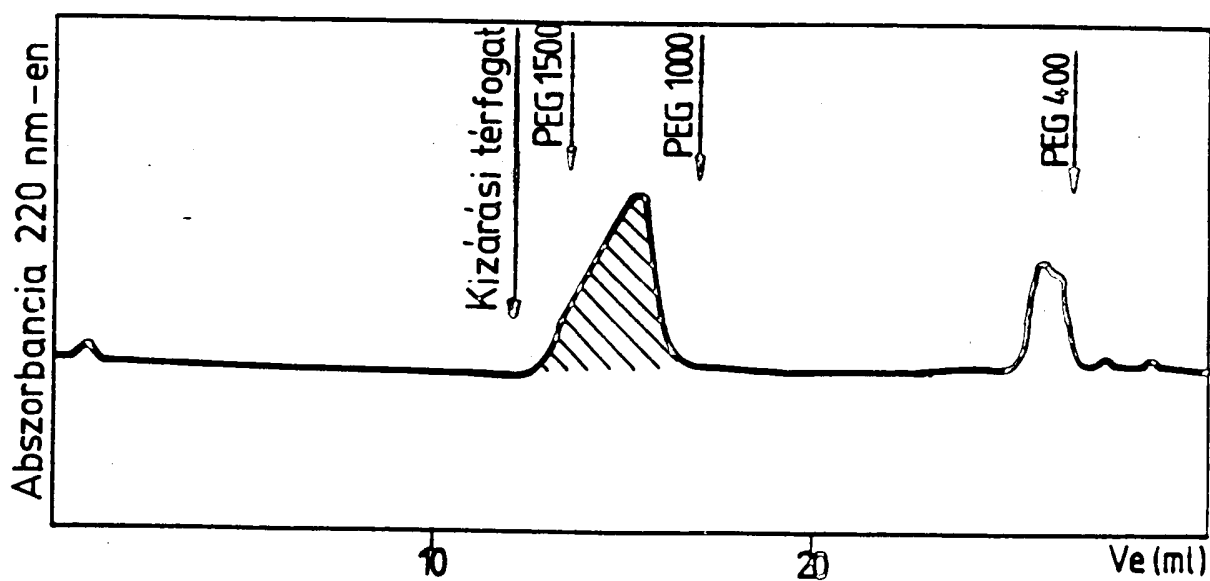
[Handwritten signature]



Handwritten marks: A stylized signature or mark on the left and a checkmark-like mark on the right.

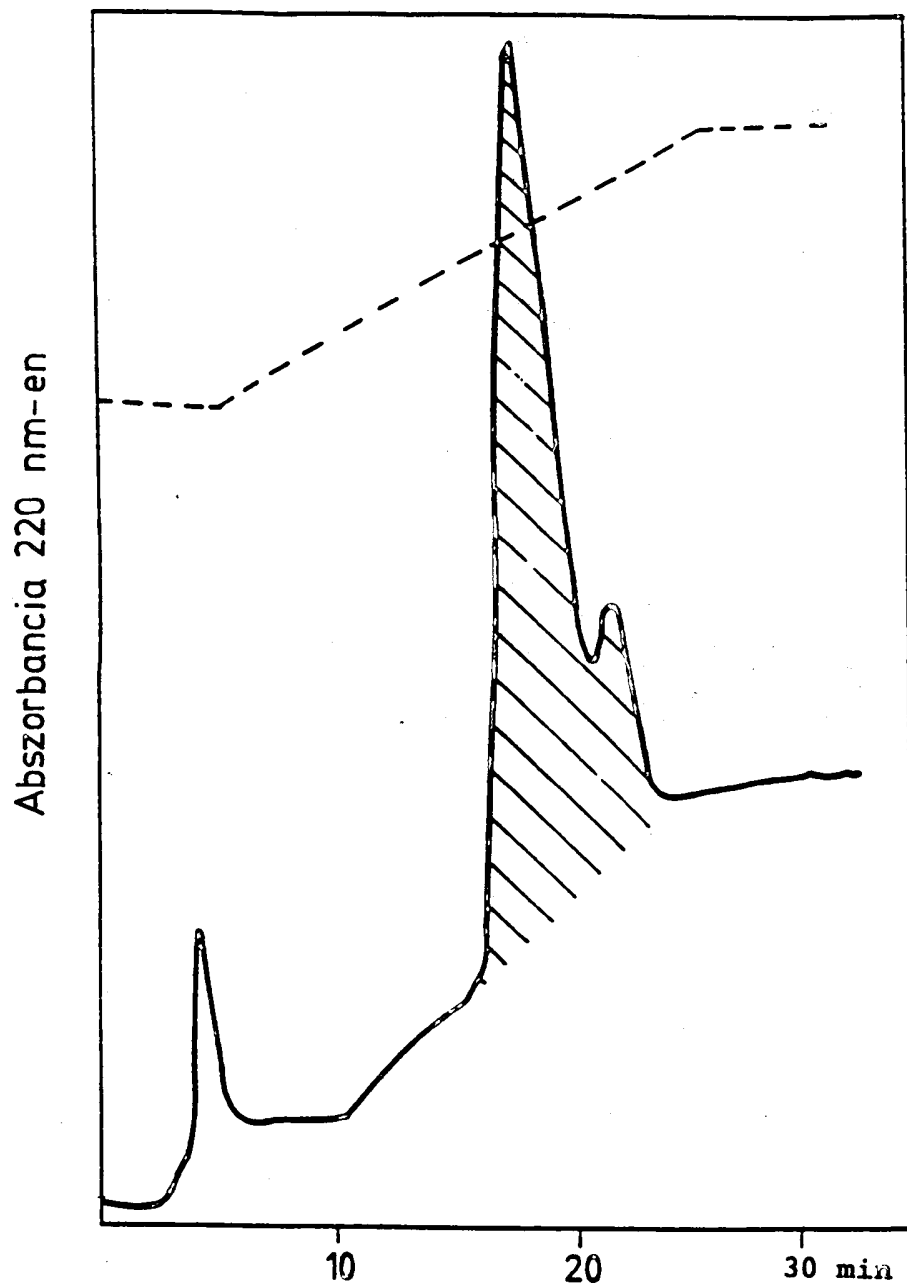


1.1 ábra



1.2 ábra

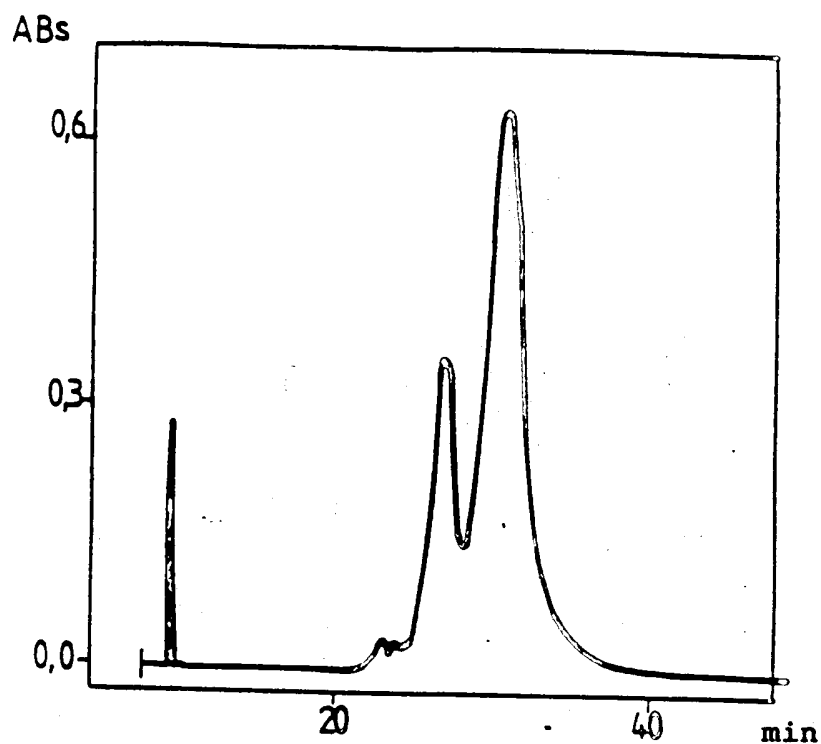
841



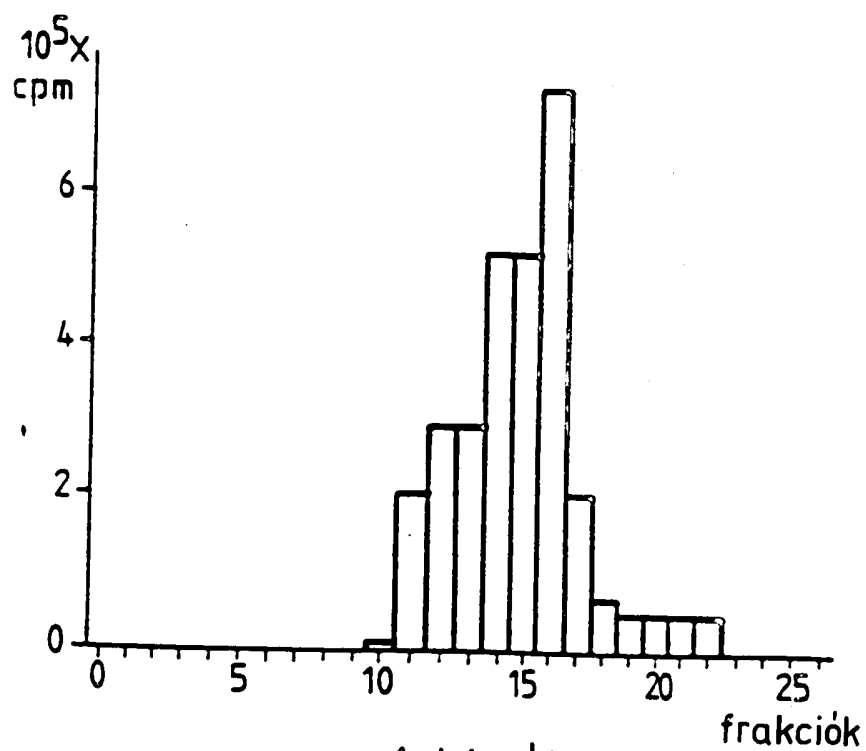
1.3 ábra

Dr.

11-

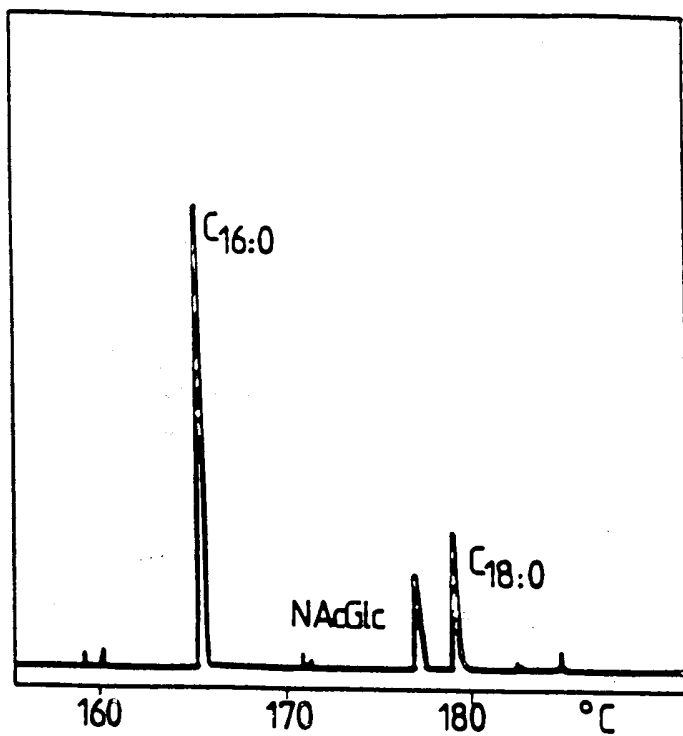


1.4 a ábra

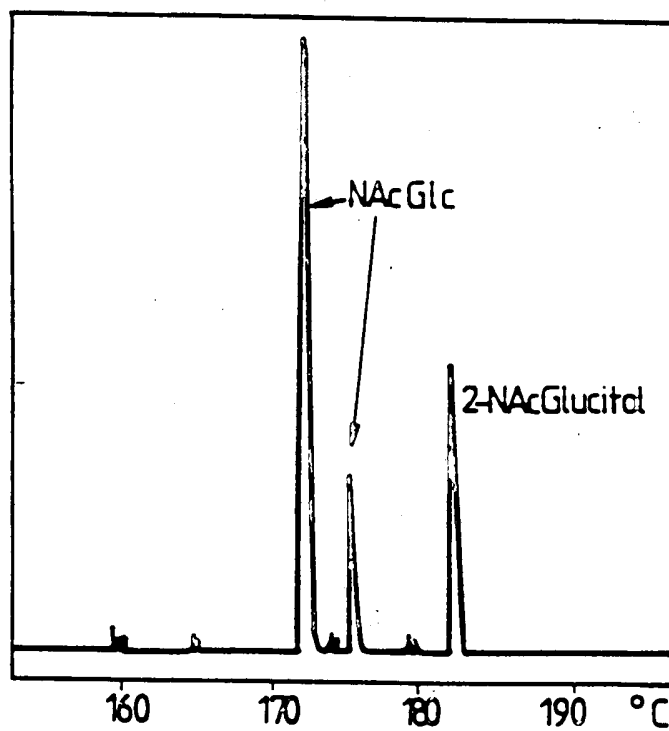


1.4 b ábra

[Handwritten signature]

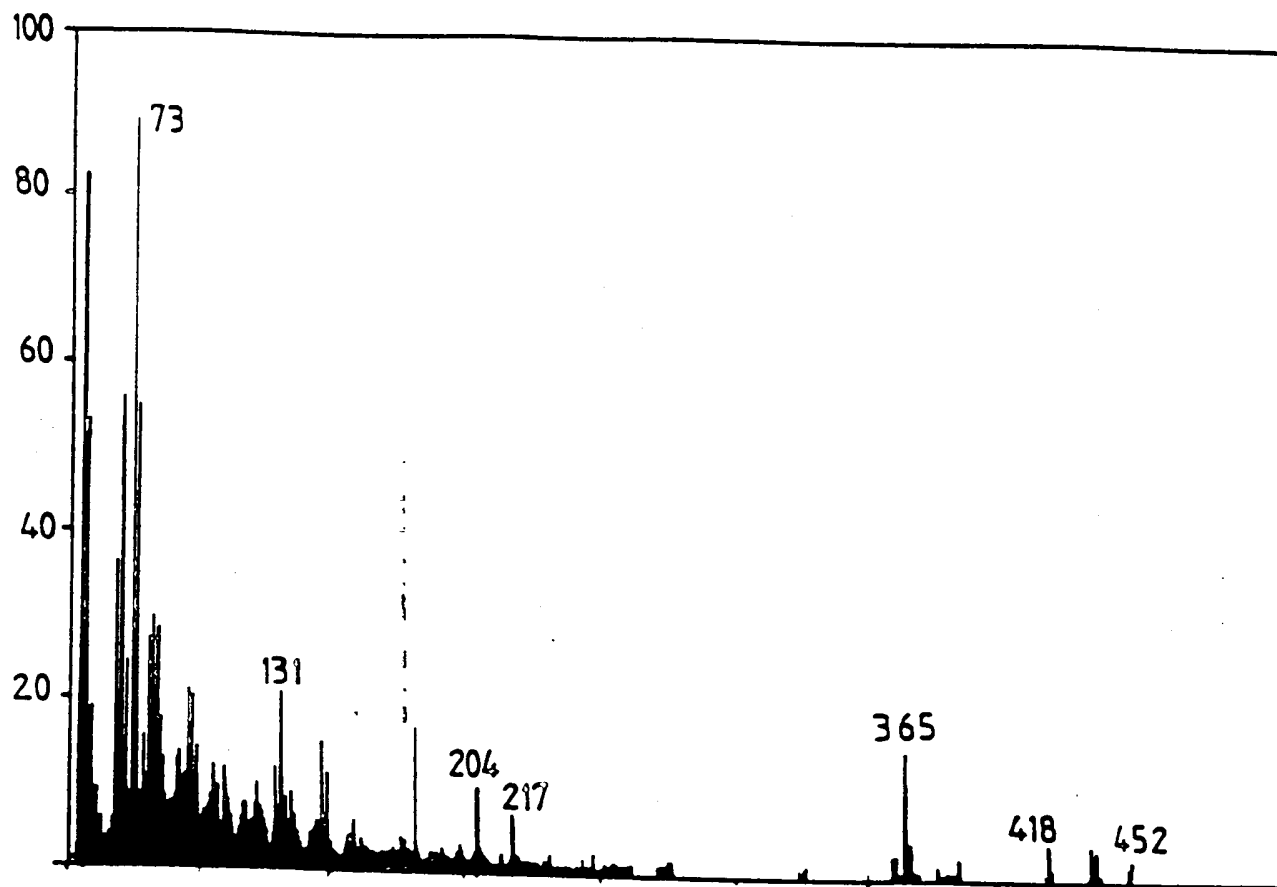


2.2 ábra

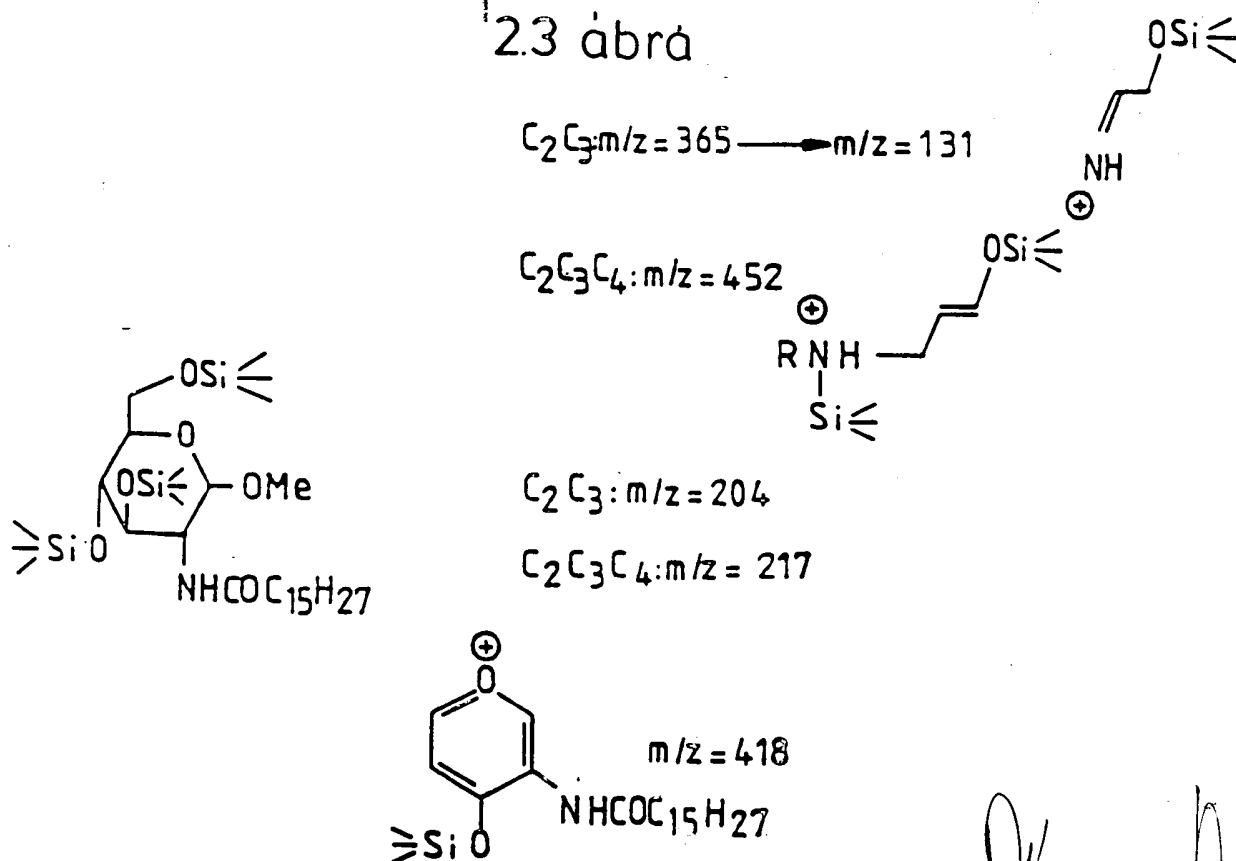


2.1 ábra

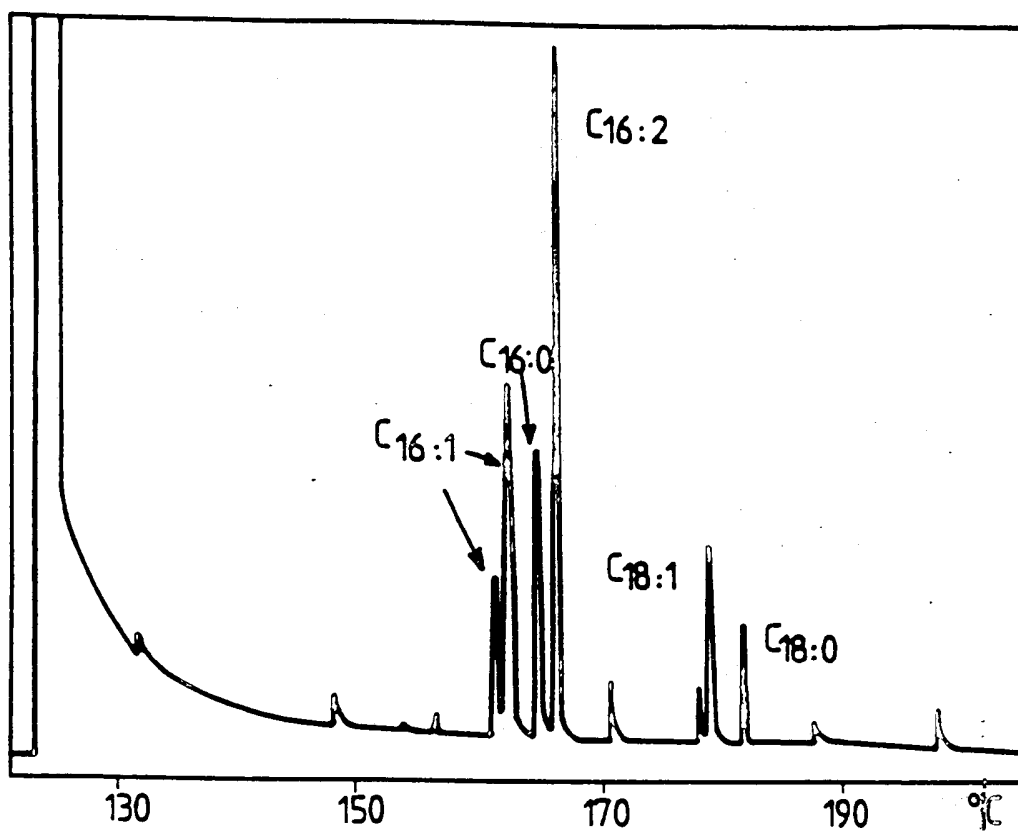
8V M



2.3 ábra



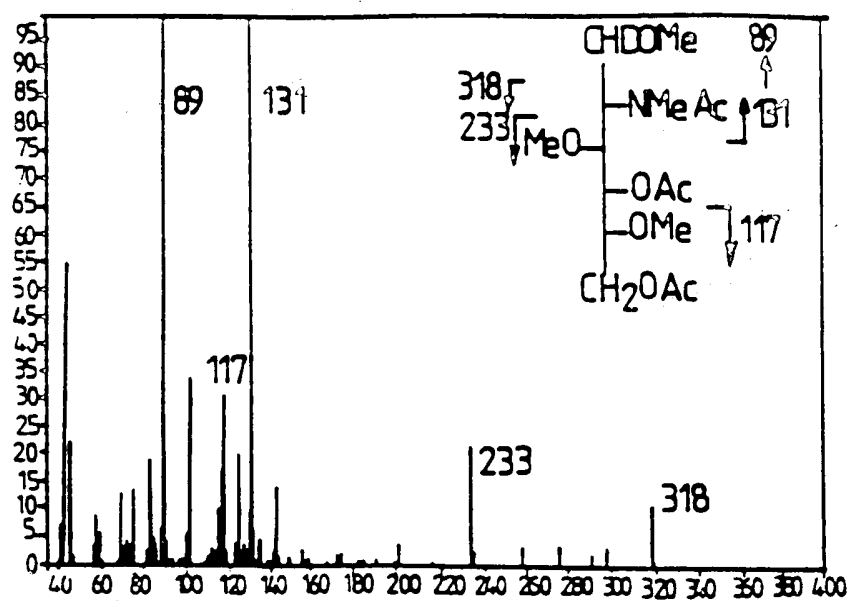
01 h-



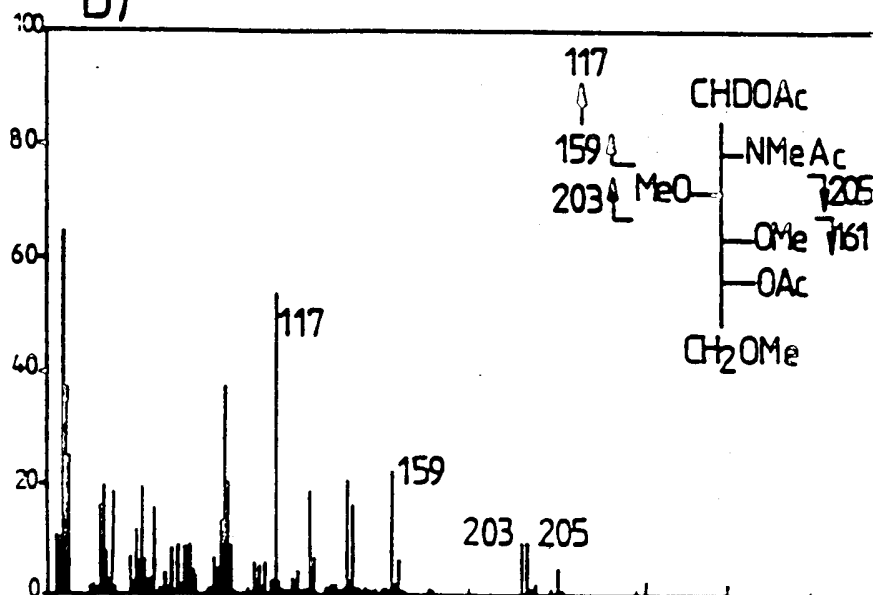
2.4 ábra

Di 11

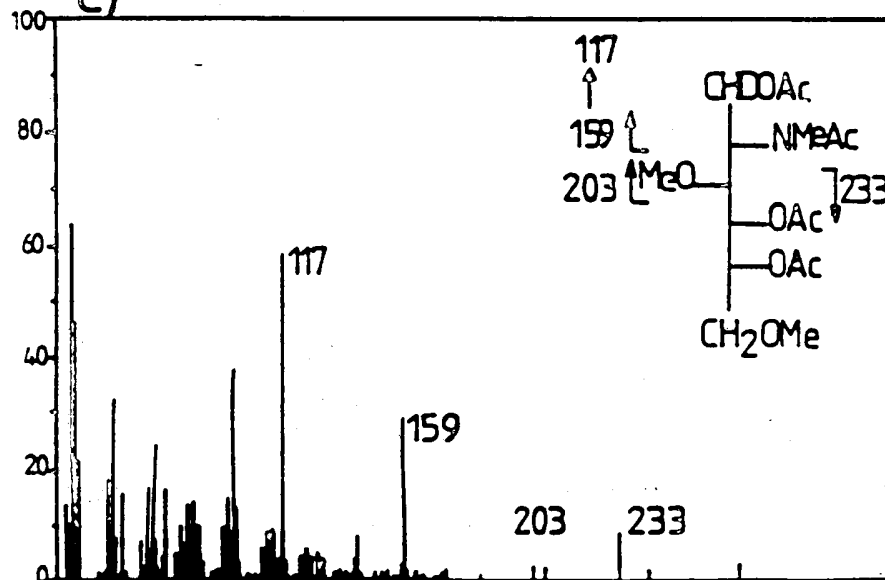
a)



b)

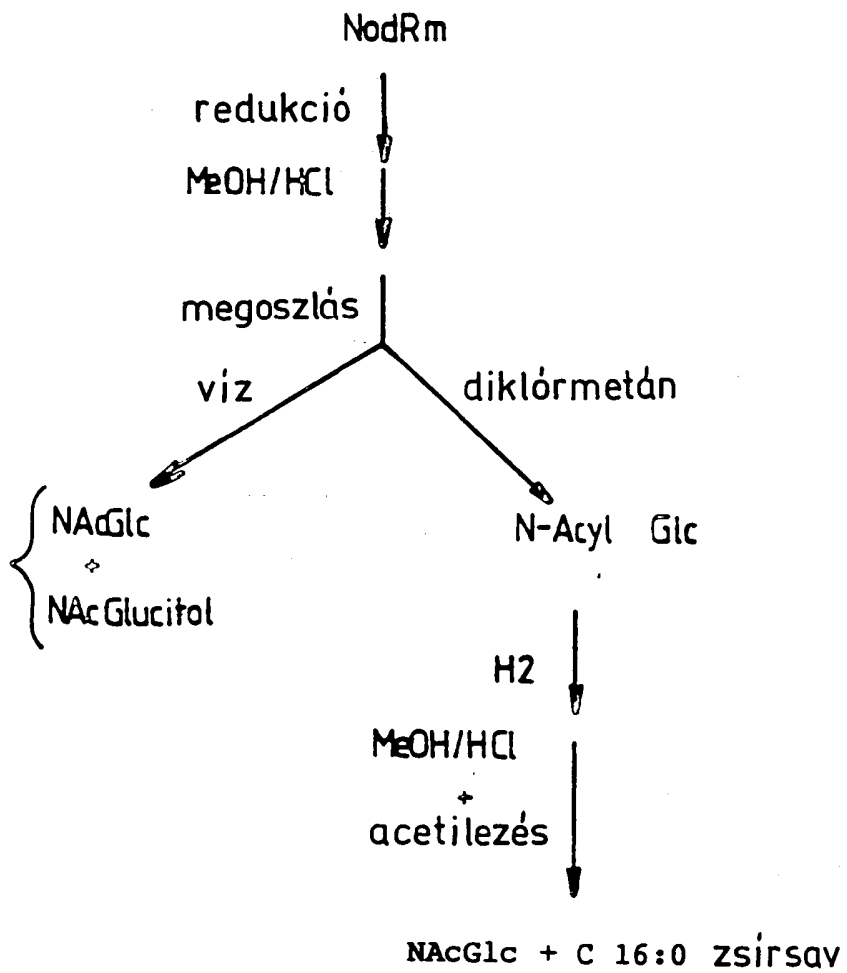


c)



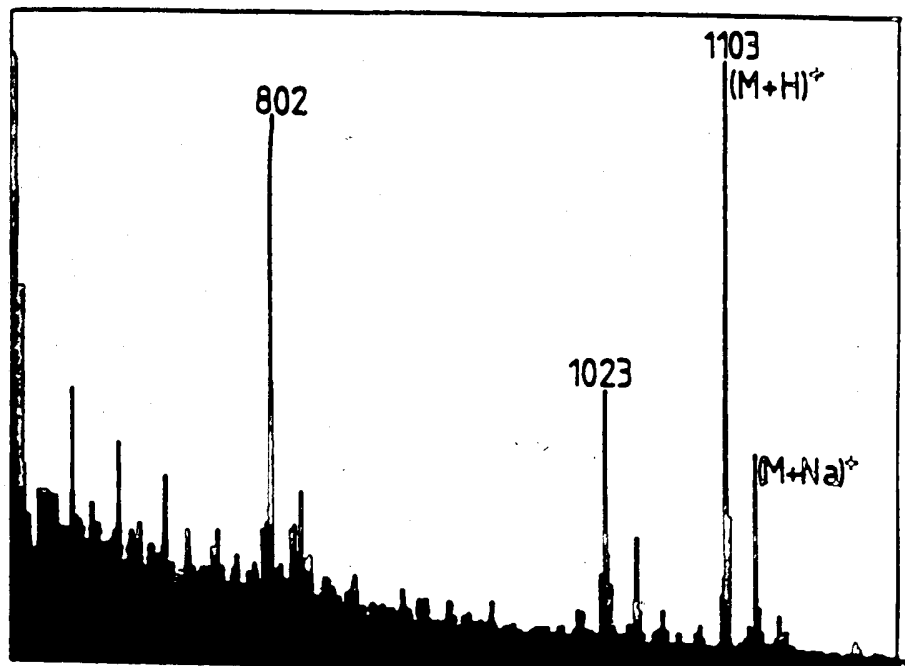
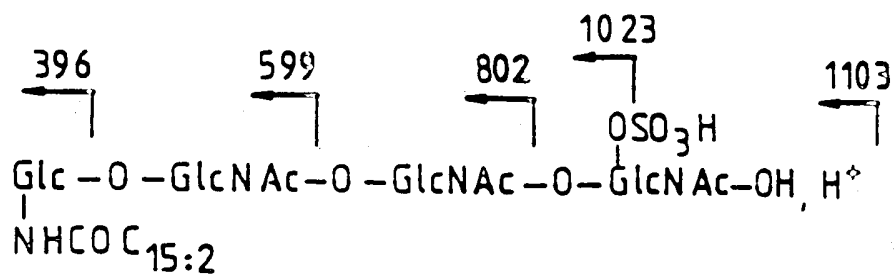
2.5 ábra

Q n

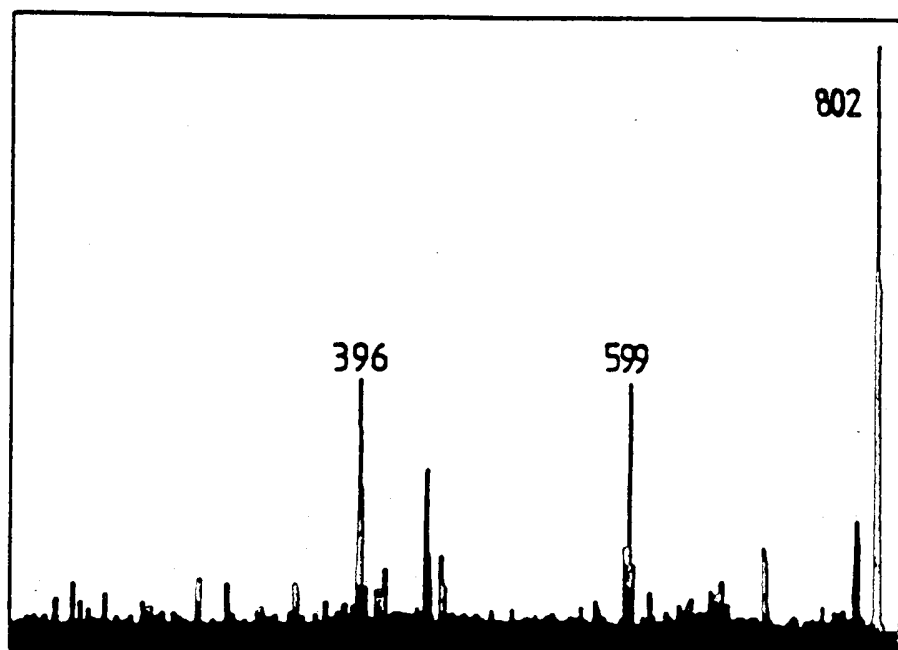


3. ábra

Dr. H.

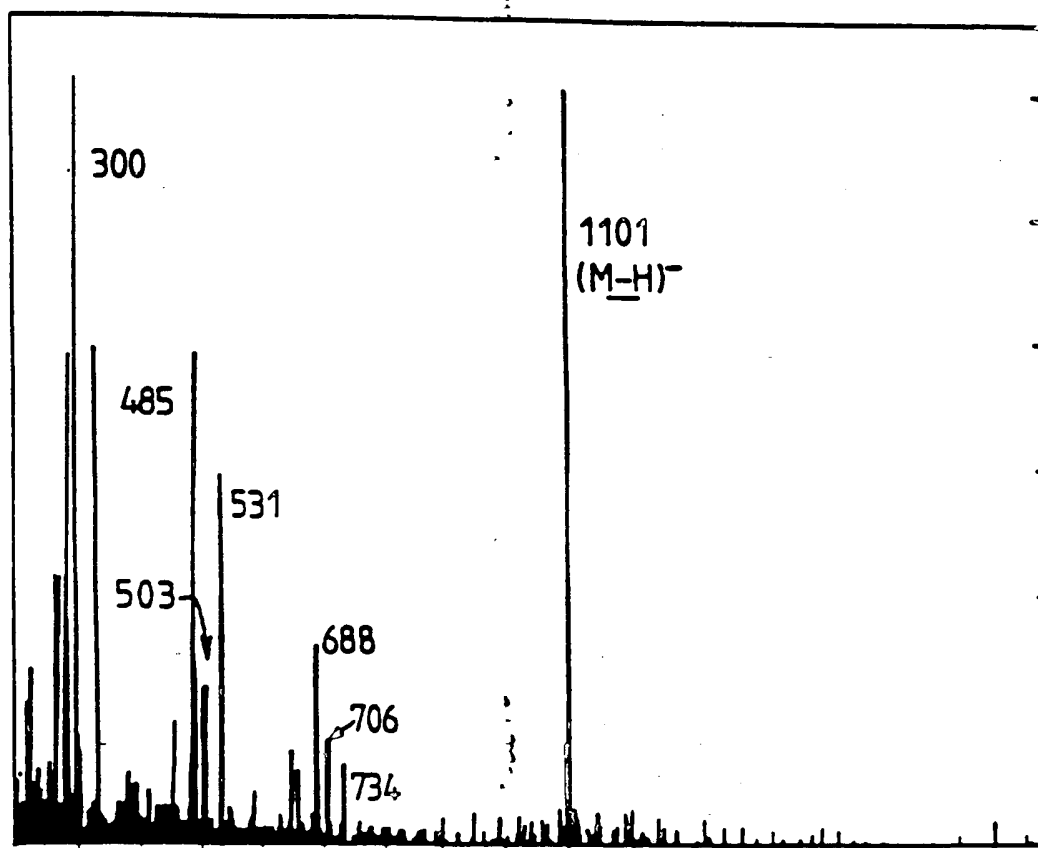
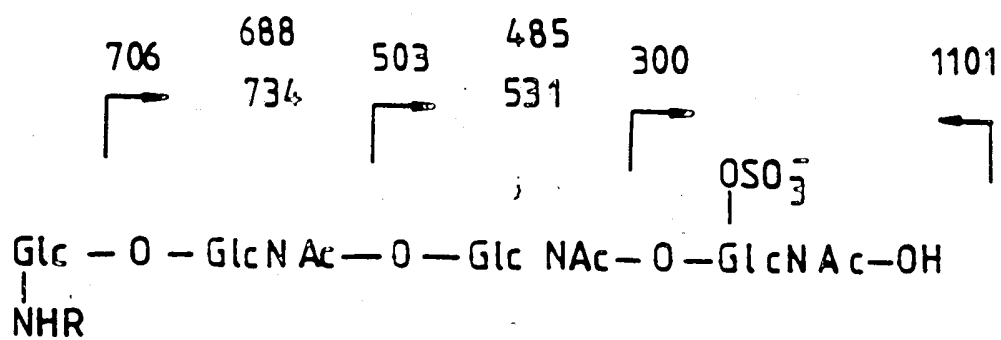


4.1 ábra



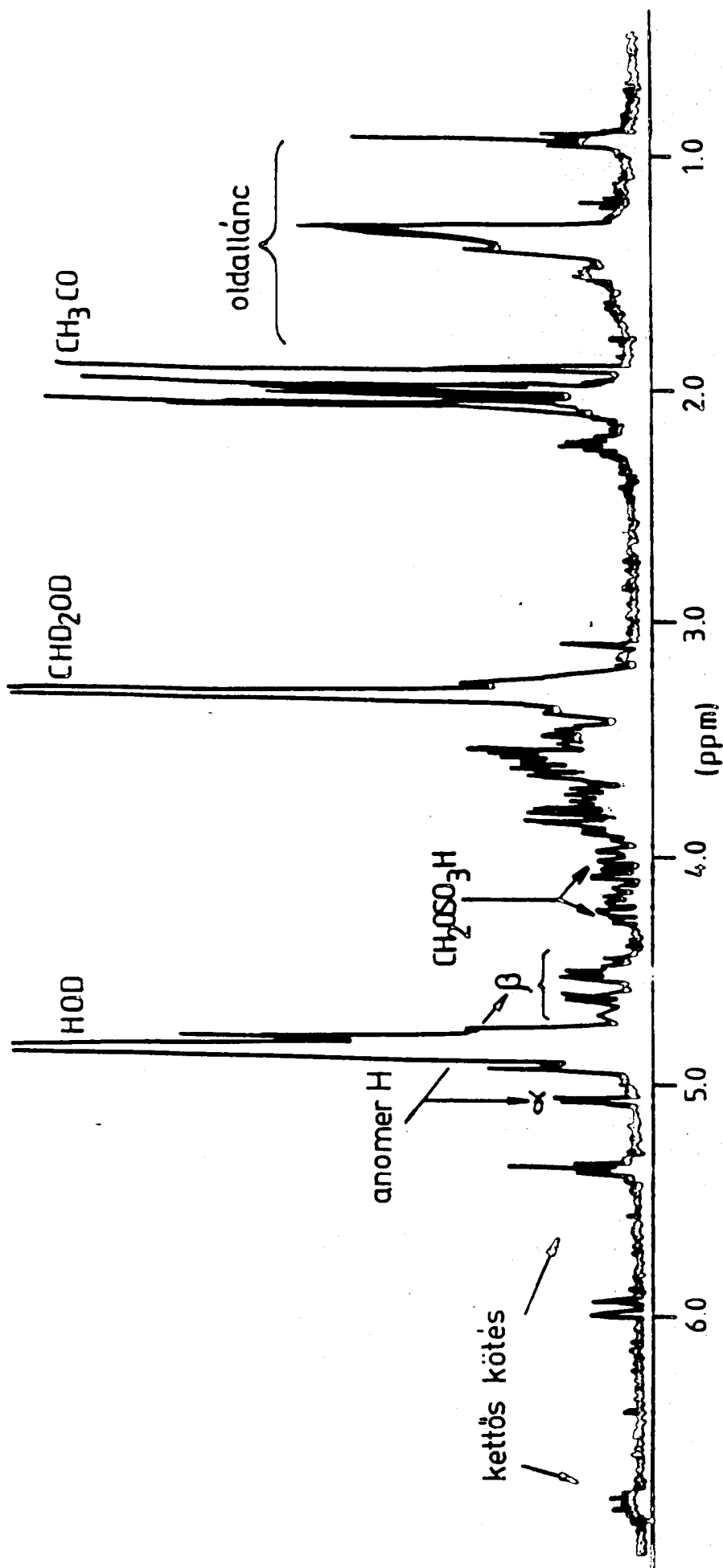
4.2 ábra

Handwritten signature or initials.



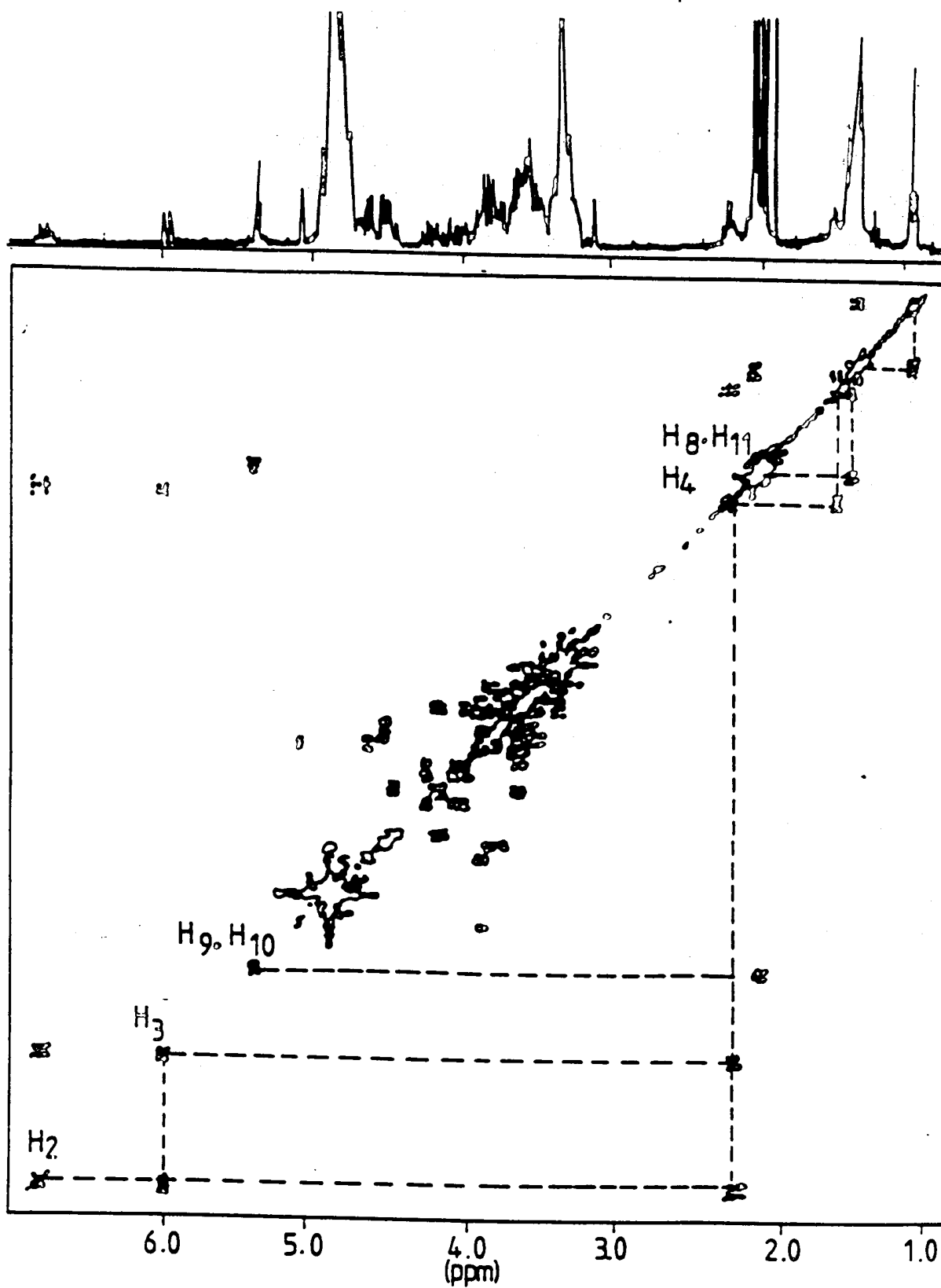
4.3 ábra

DW M.



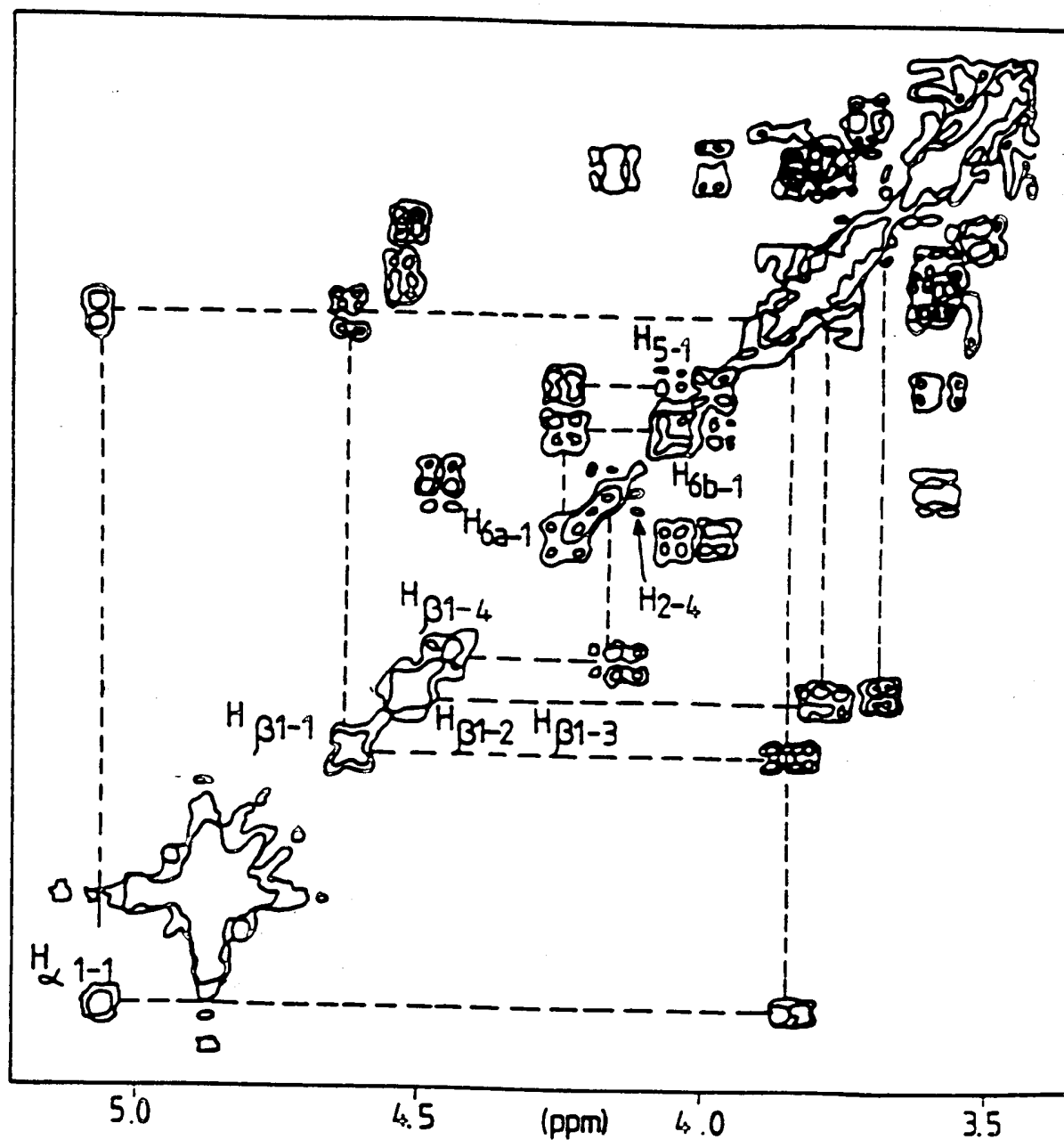
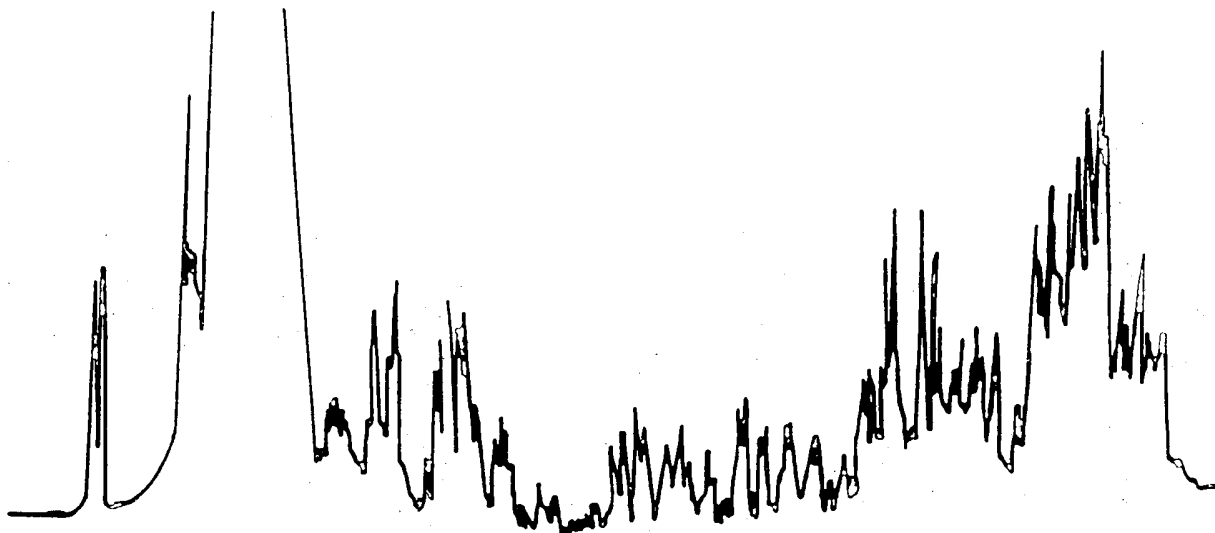
5.1 ábra

De



5.2 ábra

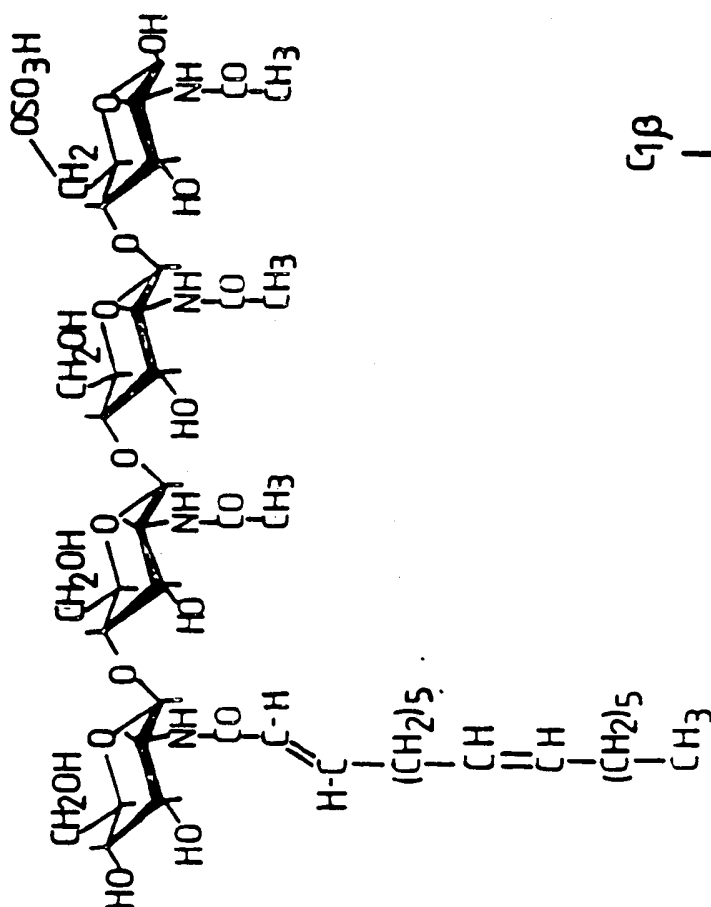
DW



5.3 ábra

Di

CH₃CO



C₆₋₁

C_{1β}

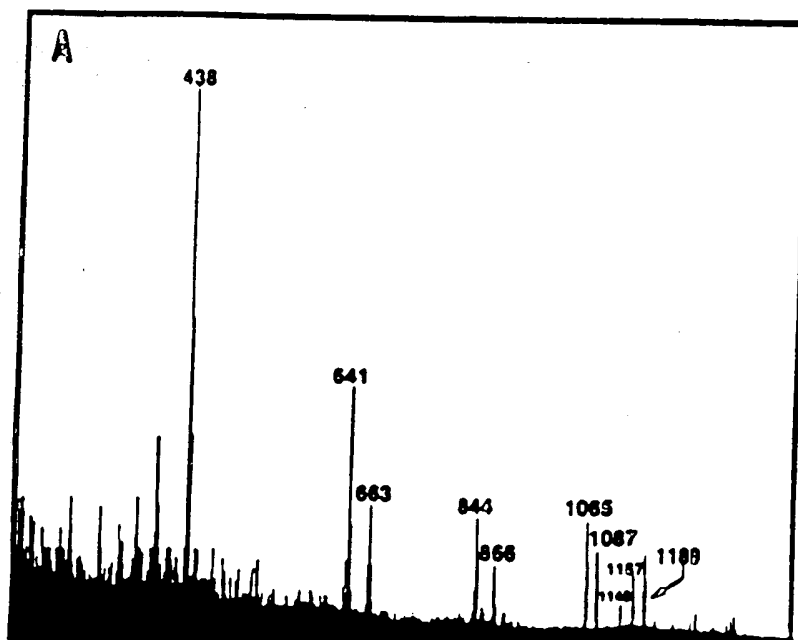
C_{9'-C_{10'}}

C_{3'}

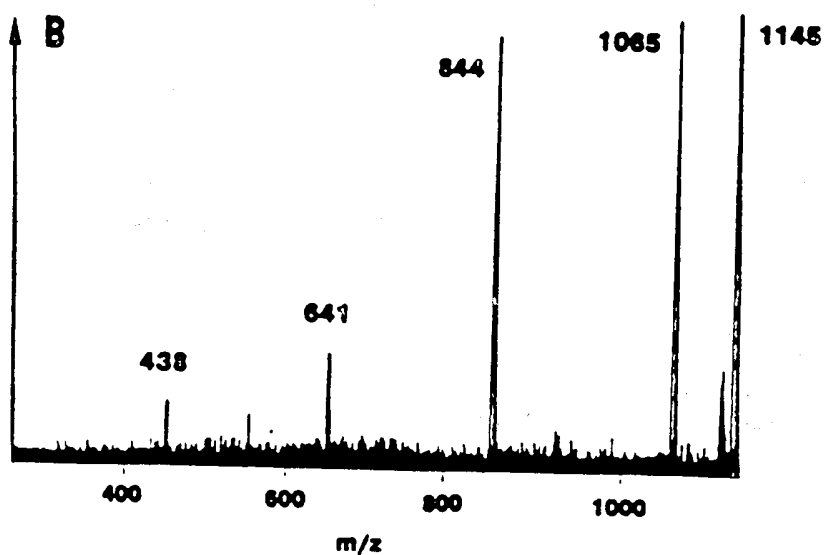
C_{2'}

CH₃CO

5.4 ábra

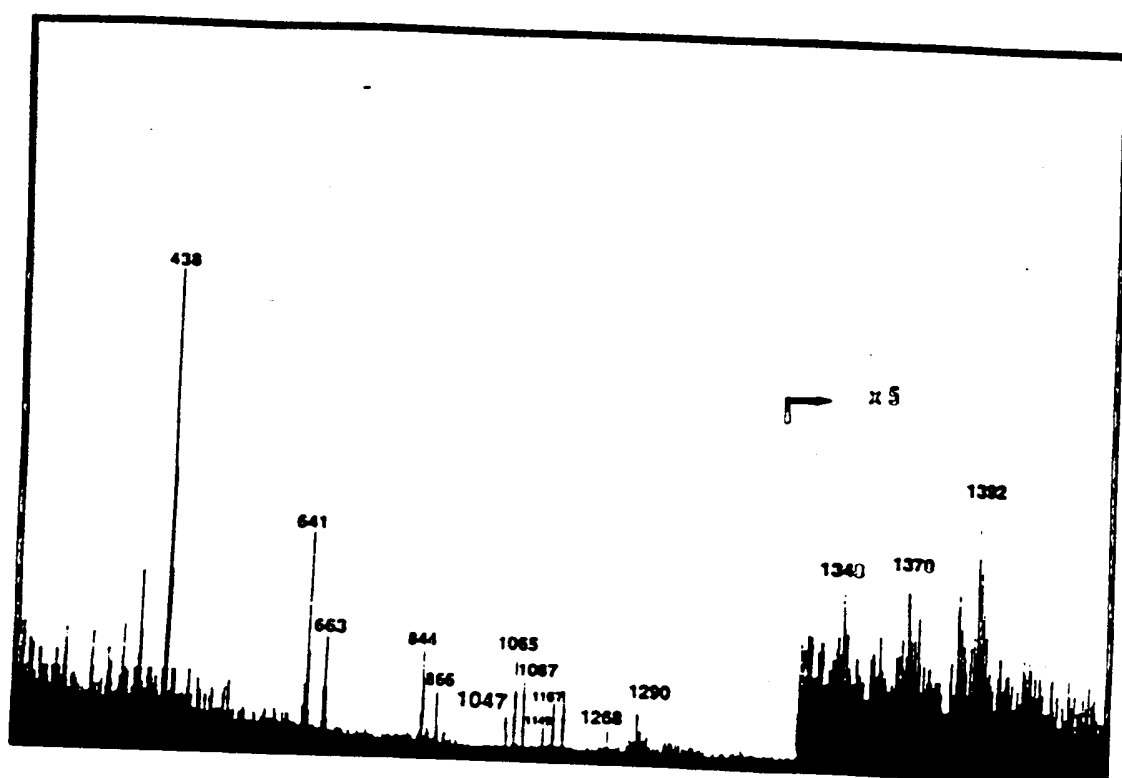


6-A ábra



6.-B ábra

Dr. M



7. ábra

Ph N-