



AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 N/ 2518 624
(31) P3222142.8;P3313643.2

(22) 09.06.83
(32) 11.06.82;15.04.83

(44) 23.05.84
(33) DE;DE

(71) siehe (73)
(72) WINNACKER, ERNST L, PROF. DR., DE; ESSER, KARL, PROF. DR., DE; PRAEVE, PAUL, PROF. DR., DE;
STAHL, ULF, DR., AT; MARQUARDT, RUEDIGER, DE; WOEHNER, GERHARD, DR., DE
(73) HOECHST AG, FRANKFURT AM MAIN, DE

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON OLIGAT METHYLOTROPHEN BAKTERIEN

(57) Aus einem Plasmid aus obligat methylotrophen Bakterien, z. B. *Methylomonas*, einerseits und einem Plasmid mit Selektionsmarkern andererseits wird ein Hybridplasmid mit dem dem methylotrophen Bakterium eigenen Replicon erhalten. Dieses Hybridplasmid wird — gegebenenfalls nach vorherigem Einbringen von weiterer genetischer Information — durch Transformation in einen Wirtsorganismus wie *E. coli* eingeführt. Nach Amplifikation und entsprechender Selektion werden die Klonen mit einem geeigneten konjugativen Plasmid behandelt und der Mobilisierbarkreisdefekt durch Einführung eines weiteren geeigneten Plasmids behoben. Die so erhaltenen Klonen werden mit vorzugsweise plasmidfreien obligat methylotrophen Bakterien als Rezipient konjugiert, wobei — nach Selektion — Klonen erhalten werden, die entsprechend der eingebrachten genetischen Information Proteine exprimieren. Man kann auch aus dem als Rezipient dienenden Bakterium Sphäroplasten herstellen und in diese die Hybridplasmide durch Transformation einbringen.

Berlin, den 20.09.1983
AP C 12 N/ 251 862/4
62 463 11

Verfahren zur Herstellung von obligat methylotrophen Bakterien

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die genetische Manipulation von methylotrophen Mikroorganismen, insbesondere Verfahren zur Herstellung von obligat methylotrophen Bakterien, die enthaltene Fremd-DNA exprimieren, Plasmide zur Einführung der Fremd-DNA und Wirtsorganismen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es sind keine Angaben über Verfahren zur Herstellung von obligat methylotrophen Bakterien, die enthaltene Fremd-DNA exprimieren, bekannt.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung von obligat methylotrophen Fremd-DNA exprimierenden Bakterien und dafür geeigneter Plasmide und Wirtsorganismen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, von einem Replicon eines Plasmids aus einem obligat methylotrophen Bakterium mit sehr engem Wirts - bereich Gebrauch zu machen.

- 1a -

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) ein aus einem obligat methylotrophen Bakterium stammendes Plasmid isoliert,
- b) hieraus und aus einem Plasmid mit Selektionsmarkern ein Hybridplasmid mit einem dem obligat methylotrophen Bakterium eigenen Replicon herstellt,
- c) dieses Hybridplasmid durch Transformation in einen Wirtsorganismus einbringt und dort amplifiziert,
- d) nach Selektion die Klone mit einem geeigneten konjugativen Plasmid behandelt und den Mobilisierbarkeitsdefekt des Hybridplasmids behebt,
- e) die so erhaltenen Klone mit obligat methylotrophen Bakterien als Rezipient konjugiert und
- f) die gewünschten Klone selektioniert.

Das im Verfahrensschritt a) eingesetzte Plasmid wird vorzugsweise aus einem Bakterium der Gattung Methylomonas, insbesondere der Art Methylomonas clara isoliert. Besonders bevorzugt ist das Plasmid pBE 3 aus dem Methylomonas clara-Stamm, der bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen unter der Nummer DSM 2397 hinterlegt ist, sowie entsprechende Plasmide mit demselben Replicon.

Das im Verfahrensschritt b) eingesetzte Plasmid mit Selektionsmarkern kann das Plasmid pBR 322 sein, das in Gene 2 (1977) 95 - 113 beschrieben ist. Die so erhaltenen Hybridplasmide werden im folgenden als pRM_x bezeichnet.

Als Plasmid mit Selektionsmarkern, das im Verfahrensschritt b) eingesetzt werden kann, eignet sich auch ein Hybridplasmid, das die genetische Information für die Expression von Insulin enthält, wie es in der europäischen Patentanmeldung 0 032 675 beschrieben ist.

Das nach Verfahrensschritt b) erhaltene Hybridplasmid wird dann durch Transformation in einen geeigneten Wirtsorganismus, vorteilhaft *Escherichia coli*, eingebracht und dort amplifiziert.

Im Verfahrensschritt d) wird in diesen Wirtsorganismus, der das Hybridplasmid enthält, ein geeignetes konjugatives Plasmid, vorteilhaft RP 4, eingebracht. Zusätzlich wird durch Einführen geeigneter Plasmide wie Col K und Col V der Mobilisierbarkeitsdefekt komplementiert.

Der so vorbereitete Wirtsorganismus kann dann im Verfahrensschritt e) das im Verfahrensschritt c) eingebrachte Hybridplasmid durch Konjugation auf ein vorzugsweise plasmidfreies obligat methylotropes Bakterium als Rezipient übertragen. Als Rezipient bevorzugt sind Bakterien der Gattung *Methyloimonas*, insbesondere von der Art *Methyloimonas clara*, vor allem vom Stamm ATCC 31 226. Dieser Stamm ist beispielsweise in der DE-PS 26 33 451 und in der US-PS 4 166 004 beschrieben.

Abschließend werden im Verfahrensschritt f) die gewünschten Klone durch Anzucht in einem Medium, das Methanol als Kohlenstoffquelle enthält, sowie auf Grund der übertragenen Resistenz bzw. Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika selektiert. Die so erhaltenen obligat methylotrophen Bakterien sind in der Lage, die enthaltene Fremd-DNA zu exprimieren, also beispielsweise Insulin zu produzieren.

Einzelheiten dieser Verfahrensschritte werden im Rahmen der Beispiele näher ausgeführt.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine Variante des vorstehend genannten Verfahrens, bei dem die Verfahrensschritte d) und e) wie folgt vereinfacht werden:

- 5 Im Schritt d) wird nach Selektion das Hybridplasmid isoliert und im Schritt e) das isolierte Plasmid durch Transformation im Sphäroplasten des obligat methylo-trophen Bakteriums eingebracht.
- 10 Die Erfindung betrifft somit auch Sphäroplasten aus methylo-trophen Bakterien, vor allem aus obligat methylo-trophen Bakterien, insbesondere aus Bakterien der Gattung Methylo-monas, vorzugsweise der Art Methylomonas clara. Besonders bevorzugt ist der Stamm Methylomonas clara ATCC 31226.
- 15 Die erfindungsgemäßen Sphäroplasten kann man dadurch herstellen, daß man die Bakterien in einem glycinreichen Medium, das einen osmotischen Stabilisator enthält, züchtet. Vorzugsweise ist dieses Medium schwach hypotonisch. Weitere 20 bevorzugte Ausgestaltungen dieses Herstellungsverfahrens werden im folgenden näher erläutert.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der neuen Sphäroplasten zum Einbringen von externer DNA in diese 25 Bakterien. Diese externe DNA wird in erster Linie in Form eines Plasmids eingebracht. Als Plasmide kommen die oben-nannten Hybridplasmide in Betracht.

Zur Bildung der Sphäroplasten werden die methylo-trophen 30 Bakterien in einem geeigneten Medium, vorteilhaft in einem Minimalmedium, bis zu einer geeigneten Zelldichte angezüchtet. Geeignete Zelldichten liegen in einem Bereich der OD 600 von vorzugsweise 0,5 bis 1,8, insbesondere 0,9 bis 1,4. Ein definiertes Volumen dieser Kulturen wird dann in die 35 etwa 5-fache Menge des genannten Mediums eingebracht, das außerdem reich an Glycin ist und einen osmotischen Stabilisator enthält. Der Gehalt an Glycin kann bis zur Sättigungskonzentration gehen, bevorzugt ist ein Gehalt von 2 bis 4 Gew.-%.

Als osmotische Stabilisatoren kommen Zucker wie Saccharose, Zuckeralkohole wie Sorbit und Polyglykole wie Polyethylen-glykol 6000 in Betracht. Das Medium ist vorzugsweise schwach hypotonisch, was durch geeignete Konzentrationen an osmotischen Stabilisator eingestellt wird. Geeignet ist beispielsweise eine Saccharosekonzentration von 10 Gew.-% oder ein-molares Sorbit.

In diesem Medium werden die Bakterien solange geschüttelt, 10 bis unter dem Phasen-Kontrastmikroskop im wesentlichen keine stäbchenförmigen methyloptrophen Bakterien erkennbar sind. Im allgemeinen können nach etwa einer Stunde Schütteln (100 bis 180 Upm) bei etwa 37°C die Bildung der Sphäroplasten als unbewegliche, kugelige Strukturen beobachtet werden. Dieser Prozeß ist im allgemeinen nach etwa 4 15 Stunden abgeschlossen.

Die gebildeten Sphäroplasten werden vorsichtig abzentrifugiert, beispielsweise bei 4°C 10 Minuten bei 2600 g, 20 und in geeigneten Medien resuspendiert. Zur Stabilisierung der Sphäroplasten enthält dieses Resuspendierungsmedium ebenfalls einen osmotischen Stabilisator in geeigneter Konzentration, beispielsweise 15 Gew.-% Polyethylenglykol vom Molgewicht 6000.

25 Diese Suspension wird in einem ungefähren Volumenverhältnis von 5 : 1 mit einer Mischung versetzt, die zu gleichen Teilen aus dem zur Resuspension der Sphäroplasten benutzten Medium und dem Träger der einzubringenden DNA in einem geeigneten Puffer besteht. Als DNA-Träger kommt - wie vorstehend ausgeführt - in erster Linie ein Hybridplasmid in Betracht. Ein geeigneter Puffer hierfür besteht aus einer wässrigen Lösung, die pro Liter 10 mmol TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) und 1 mmol Natrium-Ethylendiamintetraacetat (TE-Puffer) enthält. Zu dieser Mischung wird ein osmotischer Stabilisator gegeben (beispielsweise das dreifache Volumen der Sphäroplasten-Suspension an 4 Gew.-%iger Polyethylenglykol 6000-Lösung) und vorsichtig

durchmischt. Nach kurzem Stehen bei Raumtemperatur wird etwa das 10-fache Volumen der Sphäroplasten-Suspension an Resuspensionsmedium zugegeben und die Mischung vorsichtig zentrifugiert (3600 g).

5

Der Niederschlag wird dann in dem doppelten Volumen der Sphäroplasten-Suspension an Resuspensionsmedium aufgenommen und zur Überprüfung, ob die Transformation stattgefunden hat, auf Agarplatten ausgestrichen. Diese Agarplatten entsprechen in ihrer Zusammensetzung dem Resuspensionsmedium und enthalten neben 1,5 Gew.-% Bacto-Agar noch ein zur Selektion geeignetes Antibiotikum, beispielsweise 50 μ g/ml Ampicillin oder 10 μ g/ml Tetracyclin, falls die eingesetzten Hybridplasmide die entsprechenden Resistenzgene enthielten. Die Platten werden dann bei 37°C für 1 bis 3 Tage bebrütet und resistente Kolonien nach Anzucht in dem genannten Flüssigmedium, das ein geeignetes Antibiotikum enthält, auf das Vorhandensein von Plasmid-DNA untersucht (Humphreys et al., BA 383 (1975) 457-463). Hierbei können die zur Transformation eingesetzten Plasmide aus den methylo-trophen Bakterien isoliert werden.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Plasmide aus dem *Methyloimonas clara*-Stamm DSM 2397 sowie die Hybridplasmide mit einem einem obligat methylo-trophen Bakterium eigenen Replicon, also Plasmide, die in den Bakterien der Gattung *Methyloimonas*, vorzugsweise der Art *Methyloimonas clara*, insbesondere dem Stamm ATCC 31226 repliziert werden, in denen prokaryotische oder eukaryotische DNA integriert ist, insbesondere diejenige für die Expression von Insulin.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin die Wirtsorganismen, die die genannten Plasmide enthalten, sowie die Wirtsorganismen, die zusätzlich das konjugative Plasmid und weiterhin solche, die zusätzlich Plasmide zur Aufhebung des Mobilisierungsdefekts enthalten. Bevorzugte Wirtsorganismen enthalten als konjugatives Plasmid RP 4 und als Plasmide zur Aufhebung des Mobilisierungsdefekts Col K oder Col V.

Der Vorteil der Erfindung liegt darin, daß von einem Repli-con eines Plasmids aus einem obligat methylotrophen Bakte-rium, also mit sehr engem Wirtsbereich, Gebrauch gemacht wird. Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich somit durch hohe Sicherheit aus, so daß es auf rekombinante DNA, die risikoreiche Informationen enthält, anwendbar ist.

Ausführungsbeispiel

In den folgenden Beispielen wird die Erfindung näher er-lautert. Prozentangaben beziehen sich hierbei auf das Ge-wicht, sofern nichts anderes angegeben ist.

In den Beispielen wurden die folgenden Abkürzungen verwendet:

ATP = Adenosintriphosphat
EDTA = Ethylendiamin-tetraessigsäure bzw. -acetat (Na)
OD₆₀₀ = Optische Dichte (optical density) bei 600 nm
TE-Puffer = wässrige Lösung, enthaltend pro Liter 10 m Mol
Tris-HCl, auf pH 8 eingestellt, und 1 m Mol
EDTA, ebenfalls auf pH 8,0 eingestellt
Tris (-HCl) = Tris-hydroxymethyl-aminomethan (-Hydrochlorid)

Beispiele

1. Plasmid-Isolierung aus *M. clara* DSM 2397

Die Plasmid-Isolierung erfolgte im wesentlichen nach der Methode von Humphreys et al. (BBA 383 (1975) 457 - 463). Hierzu wurden die Bakterien aus 1 l Kulturmedium bei einer OD₆₀₀ von etwa 1,0 abzentrifugiert und der Bakteriennie-derschlag in 5 ml Sucroselösung (25 % Sucrose in 50 mMol/l Tris-HCl Lösung vom pH 8,0) resuspendiert. Unter Eiskühlung wurden 1 ml Lysozymlösung (5 mg/ml Lysozym in 250 mMol/l Tris-HCl Lösung, pH 8,0) sowie 2 ml 0,2 molare EDTA-Lösung vom pH 8,0 zugegeben. Unter gelegentlichem Umschwenken wurde

die Mischung 5 Minuten lang auf Eis inkubiert. Dann wurde die Lysis durch Zugabe von 8 ml einer Mischung, bestehend aus 50 mMol/l Tris-HCl, 75,5 mMol/l EDTA und 0,2 % eines nichtionischen Tensids (^(R)Triton X-100) vom pH 8,0, herbeigeführt. Die hochviskose Mischung wurde 30 Minuten bei 48 000 g zentrifugiert, wobei als Überstand ein klares Lysat erhalten wurde. Pro 10 ml Überstand wurden 1,1 ml 5-molare Kochsalzlösung sowie 1,1 g Polyethylenglycol vom mittleren Molgewicht 6 000 zugegeben. Die Mischung wurde bei 4°C über 10 Nacht inkubiert. Der flockige Niederschlag wurde durch 5-minütige Zentrifugation bei 1 500 g gesammelt und in 3,5 ml Pufferlösung (50 mMol/l Tris-HCl, 5 mMol/l EDTA, 50 mMol/l NaCl, pH 8,0) gelöst und das Volumen der Lösung gemessen. Nach Zugabe von 1 g CsCl pro ml Lösung sowie von 1/15 ml einer 1 %igen wäßrigen Ethidiumbromid-Lösung wurde 10 Minuten bei 16 000 g zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde ins Gleichgewicht zentrifugiert (20 Stunden bei 47 000 Umdrehungen pro Minute, 18°C, im Vertikalrotor) und wies auch ohne Bestrahlung mit UV-Licht zwei deutlich 15 sichtbare, etwa einen Zentimeter auseinanderliegende Banden auf. Durch Einstrahlen von UV-Licht der Wellenlänge 366 nm wurden die fluoreszierenden Banden hervorgehoben und die untere Plasmid-Bande durch seitliches Anstechen des Gradienten mit einer Nadel und anschließendes Aufziehen der 20 Bande in einer Spritze geerntet. Das Ethidiumbromid wurde durch wiederholtes Ausschütteln mit an CsCl gesättigtem Isopropanol entfernt. Nach 3maliger Dialyse gegen 2 l TE-Puffer für jeweils mindestens 2 Stunden wurde die Plasmid-DNA in einer Reinheit erhalten, die den Einsatz in den 25 folgenden Verfahrensschritten erlaubte.

Zeigten sich in der DNA-Lösung noch Verunreinigungen, so wurde diese zweimal mit gleichen Volumina an mit 0,1 molarer Tris-HCl Lösung vom pH 8,0 gesättigtem Phenol und 35 dann 3mal mit absolutem Ether extrahiert. Der überschüssige Ether wurde abgeblasen, die Lösung mit 1/9 des Volumens an dreimolarer Natriumacetatlösung versetzt und die DNA durch

Zugabe des gleichen Volumens an Isopropanol gefällt. Nach Stehen über Nacht wurde die Mischung 30 Minuten lang bei 12 000 g zentrifugiert und der DNA-Niederschlag mit 90 %igem Ethanol gewaschen. Danach wurde die DNA lyophilisiert und 5 mit TE-Puffer aufgenommen.

2. DNA-Isolierung aus Agarose

Im folgenden Verfahren fand die von Langridge et al. (Analytical Biochemistry 103 (1980) 264 - 271) beschriebene 10 Methode Anwendung.

Die DNA wurde auf ein horizontales 0,5 %iges Agarose-Gel aufgetragen (niedrig schmelzende Agarose, Typ VII, No. 15 A-4018, Sigma). Nach der Elektrophorese wurden die Banden durch Ethidiumbromid-Anfärbung sichtbar gemacht und aus dem Gel ausgeschnitten. Das die DNA enthaltende Agarosescheiben wurde bei 70°C in einem Glasrörchen geschmolzen, das Volumen gemessen und auf 37°C abgekühlt. Hierzu wurden 20 gleiche Volumenmengen der nachstehend beschriebenen Butanol- und Wasserphasen zugegeben.

150 ml n-Butanol wurden mit 150 ml Wasser im Scheidetrichter geschüttelt und nach Trennung der Phasen in 100 ml der 25 wassergesättigten Butanolphase 1 g Hexadecyl-trimethylammoniumbromid gelöst. Diese Lösung wurde mit 100 ml der Wasserphase ausgeschüttelt, wobei ein Entschäumer zugegeben werden kann (50 µl Antifoam A, Sigma). Nach Trennung der Phasen über Nacht wurden diese getrennt aufgefangen.

30 Die nach Zugabe dieser Butanol- und Wasserphasen erhaltene Mischung wurde durch vorsichtiges Drehen des Röhrchens gründlich durchmischt und die Trennung der Phasen bei 37°C abgewartet. Die obere, die DNA enthaltende Butanolphase 35 wurde abgetrennt und die verbleibende wäßrige Phase noch zweimal in der beschriebenen Weise mit Butanol extrahiert. Die vereinigten Butanolphasen wurden mit 1/4 des Volumens

an 0,2 molarer NaCl-Lösung versetzt und wieder gründlich durchgemischt. Nach Abtrennung der wäßrigen Phase erfolgte eine erneute Salzextraktion und die vereinigten wäßrigen Phasen wurden tropfenweise mit dem gleichen Volumen an

5 Chloroform versetzt (das über eine Aluminiumoxidsäule gereinigt worden war). Nach halbstündigem Stehen auf Eis wurde die untere Chloroformphase verworfen und verbliebenes Chloroform mit Luft ausgeblasen. Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt und nach Abtrennung in TE-Puffer resuspendiert.

10

3. Elektrophorese an Polyacrylamid-Gel

Zur Sichtbarmachung und Charakterisierung von DNA-Fragmenten unter 0,3 MD fanden 8 - 15 %ige Polyacrylamid-(PAA)-Gele

15 Anwendung. Die Gele waren 1 mm dick, 30 cm lang und 14 cm breit. Als Puffer diente eine Mischung, die pro Liter 89 mMol Borsäure, 89 mMol Tris-HCl und 2,5 mMol EDTA enthielt und den pH 8,2 aufwies.

20 Zur Herstellung eines 8 %igen PAA-Gels wurden 33 ml einer 24 %igen PAA-Stocklösung (23,22 g Acrylamid und 0,78 g N,N'-Methylenbisacrylamid in 100 g wäßriger Lösung), 10 ml des genannten Elektrophoresepuffers, der jedoch alle Komponenten in 10-facher Konzentration enthielt, 6,25 ml einer 25 6,4 %igen 3-Ethylamino-propionitril-Lösung und 50,75 ml Wasser zusammengegeben. Die Mischung wurde an der Wasserstrahlpumpe entgast und die Polymerisation mit festem Ammoniumperoxodisulfat gestartet. Sofort anschließend wurde das Gel gegossen und bis zum Beginn der Elektrophorese mindestens 2 Stunden gewartet. Vor dem Auftragen der Proben wurde an das Gel zur Entfernung von restlichem Ammoniumperoxodisulfat etwa eine Stunde lang eine Spannung von 30 100 V angelegt.

35 Die Elektrophoresen wurden bei 100 V und einem Stromfluß von 12 mA durchgeführt.

4. Charakterisierung des Plasmids pBE 3 aus dem Methyloimonas
clara-Stamm DSM 2397

Das Plasmid pBE 3 wurde mit den in der Tabelle 1 genannten
5 Restriktionsendonukleasen verdaut und die entstandenen
Fragmente geelektrophoretisch aufgetrennt. Durch Doppel-
verdauungen und durch Charakterisierung einzelner, in pBR
322 klonierter Fragmente - wie nachstehend beschrieben -
wurden die in Tabelle 2 und Figur 1 niedergelegten Er-
10 gebnisse erhalten.

Das Plasmid pBE 3 ist eine Deletionsmutante aus einem
größeren Plasmid. Daneben existieren noch kleinere Plasmide.
Alle diese Plasmide sind im Sinne dieser Erfindung äquiva-
15 lent, sofern sie das methyloimonas-eigene Replicon enthalten.

Tabelle 1:

Übersicht der zur Charakterisierung von pBE 3 verwendeten Enzyme:

Enzym Zahl der Fragmente

Acc I	1
Xor II	1
Eco RI	5
Hinc II	5
Ava I	12
Bal I	mind. 19

Keine Spaltung mit

Bam HI
Bgl II
Bst EII
Eco RV
Hind III
Hpa I
Kpn I
Nru I
Pst I
Pvu II
Sal I
Sma I
Sph I
Sst I
Sst II
Stu I
Xba I
Xho I
Xmn I

Tabelle 2:

Größe der Fragmente (in MD), die durch Spaltung von pBE 3 mit Restriktionsnucleasen erhalten wurden:

EcoR I:

F1 : 4,14
F2 : 3,09
F3 : 1,27
F4 : 0,91
F5 : 0,63

Hinc II:

H1 : 6,8
H2 : 1,42
H3 : 0,87
H4 : 0,31
H5 : 0,28

Ava I:

A1 : 2,0
A2 : 1,72
A3 : 1,26
A4a: 1,03
A4 : 1,03
A5 : 0,85
A6 : 0,66
A7 : 0,55
A8 : 0,50
A9 : 0,13
A10: 0,08
A11: 0,07

EcoR I +

Ava I :

D1 : 1,35
D2 : 1,22
D3a: 1,03
D3 : 1,03
D4 : 0,85
D5 : 0,70
D6 : 0,63
D7 : 0,55
D8 : 0,54
D9 : 0,53
D10: 0,50
D11: 0,40
D12: 0,14
D13: 0,12
D14: < 0,1
D15: < 0,1
D16: < 0,1

EcoR I +

Hinc II:

E1 : 2,29
E2 : 1,83
E3 : 1,42
E4 : 1,27
E5 : 0,91
E6 : 0,63
E7 : 0,46
E8 : 0,40
E9 : 0,31
E10: 0,28

5. Restriktionsverdauungen

Einzelverdauungen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 bis 100 μ l mit den von den Herstellern empfohlenen Puffern durchgeführt. Um eine vollständige Verdauung der DNA zu gewährleisten, wurden die Proben über Nacht inkubiert.

Bei Doppel- und Mehrfachverdauungen wurden die entsprechenden Enzyme meist gleichzeitig zur DNA zugesetzt. Der Puffer bestand in diesen Fällen aus einer Lösung, die pro Liter 10 50 mMol Kochsalz, 5 mMol Tris-HCl (auf pH 7,5 eingestellt), 6 mMol Magnesiumchlorid, 6 mMol 2-Mercaptoethanol und 100 mg Rinderserumalbumin enthielt. Kontrollversuche zeigten, daß die Enzyme in diesem Puffer die gleichen Ergebnisse liefern 15 wie in den von den Herstellern empfohlenen. Ausnahmen bildeten Enzyme, die einen überdurchschnittlich hohen Salzbedarf haben. In diesen Fällen wurde zunächst bei geringer Salzkonzentration mit dem einen Enzym verdaut und erst nach Erhöhung der Salzkonzentration das zweite Enzym 20 zugegeben.

6. Partielle Verdauungen mit Eco R I

2 μ g Plasmid-DNA wurden mit 1 U des Restriktionsenzyms in 25 einem Gesamtvolumen von 50 μ l bei 37°C inkubiert. Gleiche Ansätze wurden unterschiedlich lang inkubiert und die Reaktion zu den verschiedenen Zeiten durch zehnminütiges Erhitzen des Ansatzes auf 70°C abgestoppt. Eine gelelektrophoretische Analyse des jeweiligen Bandenmusters zeigte, 30 wie weit die Verdauung nach den definierten Zeiten fortgeschritten war.

7. Wachstumsbedingungen

35 Alle verwendeten *Escherichia coli*-Stämme wurden in L-Broth (10 g Bacto Trypton, 5 g Hefe-Extrakt und 5 g Kochsalz pro

1 Liter Wasser) gezüchtet. Die Methyloimonas clara-Stämme wurden in einem der beiden folgenden Minimal-Medien gezüchtet:

5	M 36:	1,5 % Methanol 0,1 % H_3PO_4 0,083 % K_2SO_4 0,018 % $Na_2SO_4 \times 10 H_2O$ 0,036 % $MgSO_4 \times 7 H_2O$ 10 0,004 % $CaCO_3$ 0,015 % Citronensäure 0,005 % $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \times 6 H_2O$ 80 μ l/l Spurenelementelösung
15	V 135 L:	1,5 % Methanol 0,16 % K_2SO_4 0,06 % $MgSO_4 \times 7 H_2O$ 0,025 % Na_2SO_4 20 0,014 % $CaCO_3$ 0,01 % $Fe_2(SO_4)_3$ 0,2 % H_3PO_4 0,28 % NH_3 (25 %) 0,3 % KNO_3 25 0,3 % $NaHCO_3$ 1 ml/l Spurenelementelösung
30	Spurenelementelösung:	0,05 g/l H_3BO_3 0,01 g/l KJ 0,04 g/l $MnSO_4 \times 4 H_2O$ 0,04 g/l $ZnSO_4 \times 7 H_2O$ 0,02 g/l $(NH_4)_6Mo_7O_24$

8. Konstruktion der Hybridvektoren

Das Plasmid pBE 3 wurde mit dem Restriktionsenzym Eco R I partiell verdaut, so daß der Hauptteil des Plasmids nur 5 einmal geschnitten wurde und in der linearisierten Form vorlag. pBR 322-DNA wurde mit Eco R I total verdaut und anschließend einer Behandlung mit alkalischer Phosphatase unterzogen. Die so vorbereiteten DNAs wurden zusammengegeben und mit T4-DNA-Ligase bei 14°C über Nacht inkubiert. 50 µg 10 dieser ligierten Mischung dienten sodann zur Transformation in den durch CaCl_2 -Behandlung kompetent gemachten *E. coli*-Stamm HB 101.

Die Bakterien wurden auf L-Broth-Platten mit 20 µg/ml Tetracyclin ausgestrichen und über Nacht bebrütet. Resistente 15 Kolonien wurden auf frische Platten überimpft und gut ausgewachsene Klone durch "single colony lysis" auf das Vorhandensein von Plasmid-DNA mit höherem Molekulargewicht als pBR 322 untersucht. Klone, die eine solche Plasmid-DNA 20 enthielten, wurden schließlich in 100 ml L-Broth mit oder ohne Tetracyclin angezüchtet und nach Chloramphenicol-Stimulierung der Bakterien die Plasmid-DNA gewonnen.

Restriktionsverdauungen mit den Enzymen Eco R I und Ava I 25 zeigten, daß das in der Figur 2 gezeigte Hybridplasmid pRM 21 und das in der Figur 3 gezeigte Hybridplasmid pRM 54 erhalten worden waren.

Daneben können Hybridplasmide identifiziert werden, die 30 Fraktionen von pBE 3 enthalten.

9. Ligase-Reaktion

Ligase-Reaktionen wurden in 50 µl Volumen bei einer Gesamt- 35 DNA-Konzentration von 20 µg/ml ausgeführt. Der Puffer enthielt pro Liter 30 mMol Tris-HCl (auf pH 7,5 eingestellt), 4 mMol Magnesiumchlorid, 10 mMol Dithioerythrit und 0,2 mMol ATP. Zu diesen Ansätzen wurde 1 µl T4-Ligase entsprechend 400 U zugegeben (1 U entspricht hier der Menge Enzym, die

nötig ist, um 50 % einer Hind III-verdauten lambda-DNA in 30 Minuten bei -16°C in einem Volumen von 20 μ l zu ligieren. Die Konzentration der DNA in diesem Ansatz beträgt dabei etwa 330 μ g/ml). Das für ein bestimmtes Ligase-Experiment optimale Verhältnis der beiden DNAs zueinander wurde nach den Verfahren von Dugaiczyk et al., JMB 96 (1975) 171 errechnet. Inkubiert wurde bei 14°C für mindestens 16 Stunden.

10 10. Konjugation

Rezipient und Donor wurden über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 - 1,2 (Rezipient) bzw. 1,4 - 1,6 (Donor) angezüchtet und gleiche Volumina von Rezipient und Donor so zusammen gegeben, daß der Mischung eine große Oberfläche zur Verfügung stand. Die Mischung wurde 2 Stunden lang ohne zu Schütteln bei 37°C inkubiert und anschließend 200 μ l davon auf Agarplatten ausgestrichen, deren Zusammensetzung eine Selektion gegen den Donor und für den mit einer neuen, durch das zu übertragende Plasmid vermittelten, Eigenschaft ausgestatteten Rezeptor erlaubte. Bei der Konjugation zwischen *E. coli* HB 101 und *M. clara* DSM 2397 waren dies Methanol-Minimalmedium-Platten mit Zusatz eines (durch die Art des zu übertragenden Plasmids bestimmten) Antibiotikums.

25 In anderen Experimenten wurden Rezipient und Donor wie oben beschrieben inkubiert und 200 μ l dieser Mischung auf Methanol-Minimalmedium-Platten ohne Antibiotikum ausgestrichen. Diese Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet und der 30 entstandene Bakterienrasen mit 2 ml Methanol-Minimalmedium abgeschwemmt. 200 μ l dieser Suspension kamen dann wieder zum Ausstrich auf Methanol-Minimalmedium-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum. Klone zeigten sich nach 48 - 72stündigem Bebrüten der Platten bei 37°C.

35

11. Expression eukaryotischer DNA in *M. clara*

a) Das Plasmid pBE 3 wurde nach den beschriebenen Verfahren in Derivaten von pBR 322 kloniert bzw. umkloniert, die als

c-DNA-Sequenz eines eukaryotischen Gens die des Affen-Insulins enthielten.

Affeninsulin-c-DNA ist in die Pst I-Schnittstelle von pBR 322 derart eingebaut worden, daß diese fremde Information unter der Kontrolle des β -Lactamase-Promotors in *E. coli* exprimiert wurde. Dabei entstand ein Fusionsprotein, das mit Antiinsulin-Antikörpern nachgewiesen werden konnte (Europäische Patentanmeldung 0 032 675).

10

Die Affeninsulin-c-DNA enthält zwei interne Pst I-Schnittstellen. Die kodierende Information kann daher durch Pst I-Verdauung nicht in intakter Form aus dem Plasmid entfernt werden. Um eine Replikation dieses Plasmids in *M. clara* zu ermöglichen, wurde daher so vorgegangen, daß DNA-Sequenzen aus dem *M. clara*-Plasmid pBE 3 in dieses Insulininformation exprimierende pBR 322-Derivat eingebaut wurde. Die experimentelle Durchführung erfolgte wie vorstehend beschrieben. Hierbei konnte eine Reihe von hybriden Plasmiden erhalten werden, die sich in ihrer Struktur nur durch die in den pBR 322-Anteil eingebaute Affeninsulin-c-DNA von den zuvor beschriebenen Hybridvektoren unterscheiden. Die Anordnung des Insulingens im pBR 322-Anteil dieser Vektoren bleibt dabei unverändert in Phase, so daß auch diese Klone Insulin-antigene Determinanten in *E. coli* exprimieren. Einer dieser Klone, der die gesamte pBE 3-Sequenz enthält, erhielt die Bezeichnung pInMc 68.

30 b) Der festgestellte Mobilisierbarkeitsdefekt von pBR 322 kann durch Plasmide wie Col K und Col V komplementiert werden (Young und Poulis, Gene 4 (1978) 175 - 179). Daher wurde in die oben beschriebenen, durch Calciumchlorid-Behandlung kompetent gemachten Donorstämme mit dem konjugativen Plasmid RP 4 und den Hybridvektoren der pRM-Reihe noch zusätzlich das Plasmid Col K durch Transformation eingeführt. Als Indikatorstamm zum Nachweis des Plasmids Col K wurde der

- Colicin-empfindliches Stamm AB 1157 verwendet (Warren et al., MGG 170 (1979) 103 - 107). Um in Konjugationsexperimenten zwischen den *E. coli*-Donorstämmen HB 101 (RP 4, Col K, pRM 54) bzw. HB 101 (RP 4, Col K, pRM 21) und dem Rezipienten *M. clara* ATCC 31226 auf Klone zu selektieren, die den Hybridvektor enthielten, wurde in Gegenwart hoher Dosen Tetracyclin (50 µg/ml) auf Methanol-Minimalmedium (M 36) selektioniert.
- 10 Eine Analyse zahlreicher *M. clara*-Klone ergab, daß in ca. 10 % der Fälle Klone erhalten worden waren, die nur den Hybridvektor enthielten. In einem Konjugationsexperiment zwischen dem *E. coli*-Donorstamm HB 101 (RP 4, Col K, pInMc 68) und dem *M. clara*-Rezipienten ATCC 31226 konnten 15 in gleicher Weise *M. clara*-Klone erhalten werden, die nur das Plasmid pInMc 68 enthielten.
- c) Die erhaltenen *M. clara*-Klone mit dem Plasmid pInMc 68 wurden in der Folge gezüchtet und über einen Radioimmunoassay bzw. einen Fettzellassay auf ihren Insulingehalt überprüft. Entsprechend dem in der Europäischen Patentanmeldung 0 032 675 mit *E. coli* gemachten Beobachtungen konnten auch im Falle von *M. clara* ATCC 31226 Insulinwerte zwischen 1 und 5 IE pro Liter gemessen werden. 25 Somit wird also die im pBR 322-Anteil des Hybridvektors pInMc 68 enthaltene Insulininformation auch in *M. clara* korrekt und effizient exprimiert.
12. Der Stamm *Methylomonas clara* ATCC 31226 wird in dem Minimal-Medium M 36 bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9 bis 1,4 30 angezüchtet. 20 ml dieser Kulturen werden in 100 ml M 36-Medium eingebracht, das außerdem 4 % Glycin und 10 % Saccharose enthält. In diesem Medium werden die Bakterien 4 Stunden bei 37°C und 100 bis 180 Upm geschüttelt. 35 Unter dem Phasenkontrastmikroskop sind dann keine länglichen, beweglichen Bakterien mehr zu erkennen.

Die gebildeten Sphäroplasten werden bei 4°C 10 Minuten bei 2600 g abzentrifugiert und in 1 ml M 36-Medium resuspendiert, das zusätzlich 10 % Saccharose enthält.

5 Die genannten Medien können anstelle der 10 % Saccharose auch 1 Mol pro Liter Sorbit oder 15 % Polyethylenglykol vom mittleren Molgewicht 6000 enthalten.

10 Die Abtrennung der Sphäroplasten kann auch durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 3600 g erfolgen.

13. 0,5 ml der nach Beispiel 12 erhaltenen Suspension werden mit 0,1 ml einer Mischung versetzt, die zu gleichen Teilen aus Resuspensionsmedium und TE-Puffer besteht, in dem das Plasmid pRM 21 enthalten ist. Zu dieser Mischung gibt man 1,5 ml 4 %ige Polyethylenglykol-6000-Lösung und durchmischt vorsichtig. Diese Mischung lässt man 2 Minuten bei Raumtemperatur stehen, gibt 5 ml Resuspensionsmedium zu und zentrifugiert bei 3600 g.

20 Der Niederschlag wird in 1 ml Resuspensionsmedium aufgenommen und auf Agarplatten ausgestrichen, die in ihrer Zusammensetzung dem Resuspensionsmedium entsprechen und zusätzlich 1,5 % Bakto-Agar und 50 ,ug/ml Ampicillin enthalten. Die Platten werden bei 37°C 3 Tage bebrütet und die Kolonien in M 36-Medium, das 50 ,ug/ml Ampicillin enthält, gezüchtet. Aus den so erhaltenen Bakterien konnte das zur Transformation eingesetzte Plasmid pRM 21 isoliert werden.

30 Anstelle von Ampicillin kann bei diesem Verfahren auch jeweils Tetracyclin in einer Konzentration von 10 ,ug/ml eingesetzt werden.

35 Das gleiche Ergebnis erhält man auch, wenn man anstelle des genannten Plasmids das Plasmid pRM 54 einsetzt.

40 14. Arbeitet man nach Beispiel 13, setzt jedoch als Plasmid pINMc 68 ein, und selektioniert mit 50 ,ug/ml Tetracyclin, so erhält man Methylomonas clara-Klone mit diesem Plasmid, die Insulin produzieren.

Erfindungsanspruch

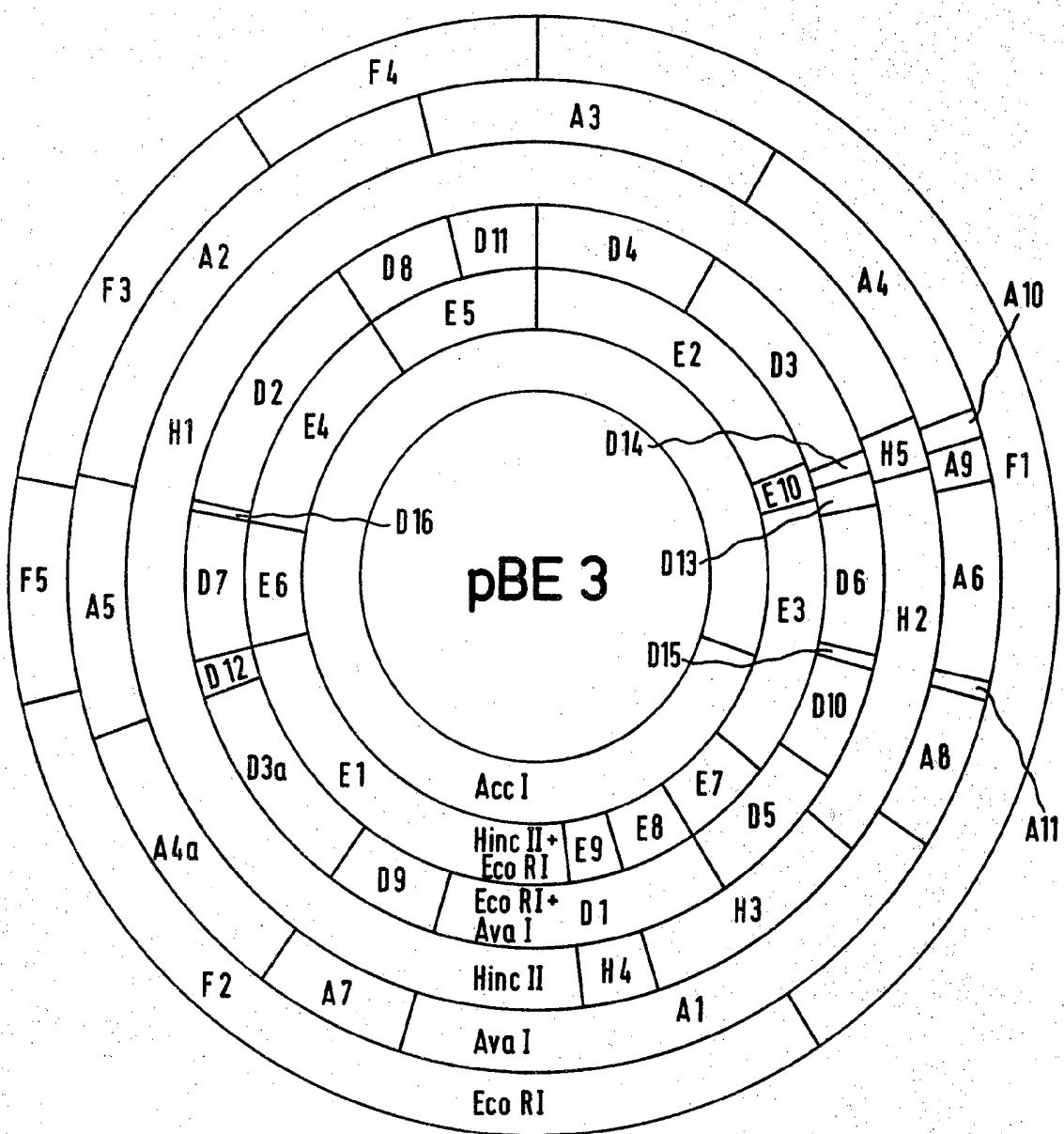
1. Verfahren zur Herstellung von obligat methylotrophen Bakterien, die enthaltene Fremd-DNA exprimieren, gekennzeichnet dadurch, daß man
 - a) aus einem obligat methylotrophen Bakterium ein Plasmid isoliert,
 - b) hieraus und aus einem Plasmid mit Selektionsmarkern ein Hybridplasmid mit einem dem obligat methylotrophen Bakterium eigenen Replicon herstellt,
 - c) dieses Hybridplasmid durch Transformation in einen Wirtsorganismus einbringt und dort amplifiziert,
 - d) nach Selektion die Klone mit einem geeigneten konjugativen Plasmid behandelt und den Mobilisierbarkeitsdefekt behebt,
 - e) die so erhaltenen Klone mit vorzugsweise plasmidfreien obligat methylotrophen Bakterien als Rezipient konjugiert und
 - f) die gewünschten Klone selektioniert.
2. Verfahren zur Herstellung des in Punkt 1 genannten Hybridplasmids, gekennzeichnet dadurch, daß man aus einem obligat methylotrophen Bakterium ein Plasmid isoliert und hieraus und aus einem Plasmid mit Selektionsmarkern ein Hybridplasmid mit einem dem obligat methylotrophen Bakterium eigenen Replicon herstellt.
3. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß das obligat methylotrophe Bakterium eines der Gattung Methyloimonas, vorzugsweise von der Art Methyloimonas clara, insbesondere von Stamm ATCC 31 226 ist.

- 21 -

4. Verfahren nach einem oder mehreren der Punkte 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß das Bakterium, aus dem das Plasmid isoliert wird, vom Stamm DSM 2397 ist.
5. Verfahren nach einem oder mehreren der Punkte 1, 3 oder 4, gekennzeichnet dadurch, daß das Plasmid mit Selektionsmarkern pBR 322 ist und/oder die genetische Information für die Expression von Insulin enthält.
6. Verfahren nach einem oder mehreren der Punkte 1 oder 3 bis 5, gekennzeichnet dadurch, daß der Wirtsorganismus *Escherichia coli* ist, das konjugative Plasmid RP 4 ist und der Mobilisierbarkeitsdefekt durch Einführung des Plasmids *Col K* oder *Col V* behoben wird.
7. Verfahren nach einem oder mehreren der Punkte 1 oder 3 bis 6, gekennzeichnet dadurch, daß man anstelle der Verfahrensschritte d) und e) das als Rezipient dienende obligat methylo trophe Bakterium in die Sphäroplasten überführt und das Hybridplasmid durch Transformation einbringt.
8. Verfahren zur Herstellung der in Punkt 7 genannten Sphäroplasten aus methylo tropen Bakterien, gekennzeichnet dadurch, daß man die Bakterien in einem glycin-reichen Medium, das einen osmotischen Stabilisator enthält, züchtet, wobei das Medium vorzugsweise schwach hypotonisch ist und 2 bis 4 Gew.-% Glycin enthält.

Hierzu 2 Seiten Zeichnungen

FIG. 1



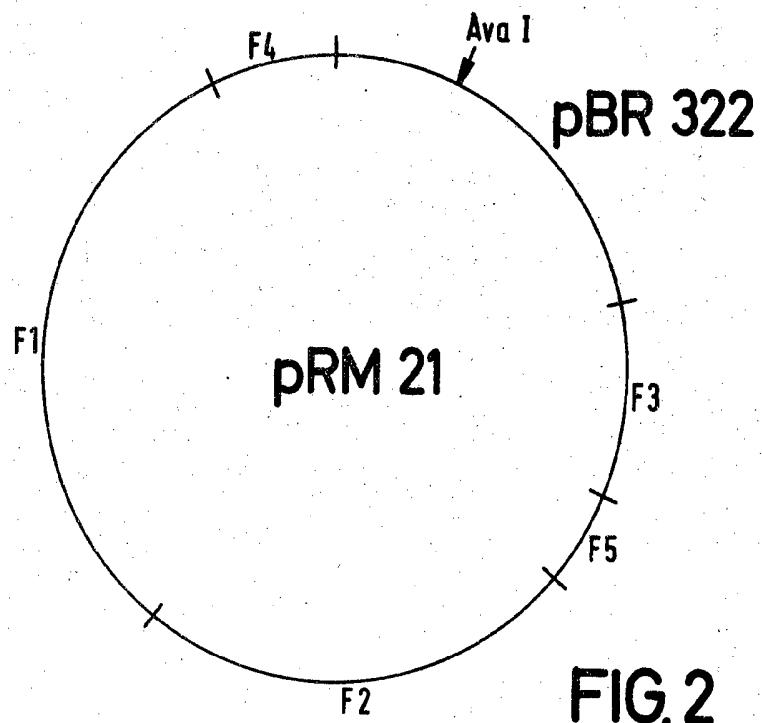


FIG. 2

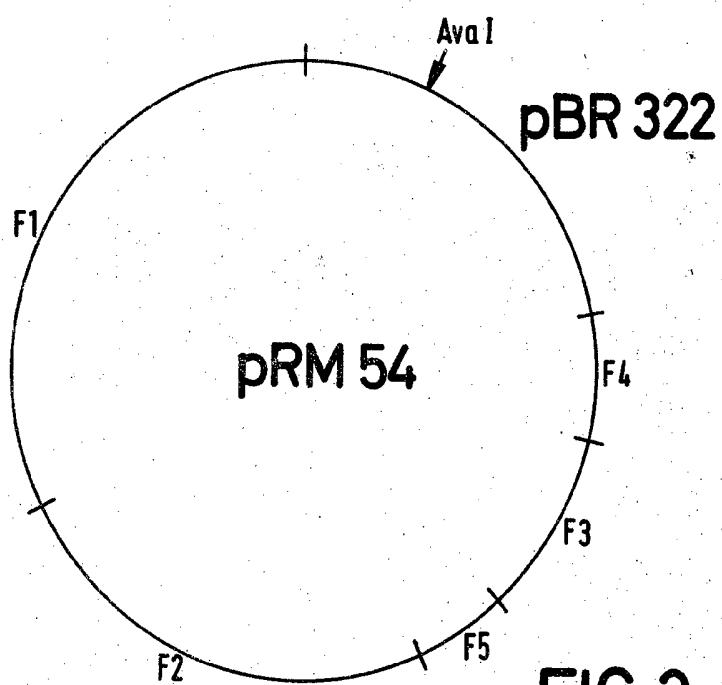


FIG. 3