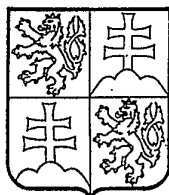


ČESKÁ A SLOVENSKÁ  
FEDERATÍVNA  
REPUBLIKA  
(19)



FEDERÁLNY ÚRAD  
PRE VYNÁLEZY

# POPIS VYNÁLEZU

## K AUTORSKÉMU OSVĚDČENIU

272 963

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>  
C 12 N 1/16,  
C 12 R 1 : 865

(21) PV 2064-87.T

(22) Prihlášené 26 03 87

(40) Zverejnené 12 07 90

(45) Vydané 20 12 91

(75) Autor vynálezu ŠUBÍK JÚLIUS RNDr. CSc., BRATISLAVA

(54)

Mutanty kvasiniek rodu *Saccharomyces cerevisiae*  
defektné v citrátovom cykle a spôsob ich  
získavania

(57)

Riešenie sa týka spôsobu získavania mutantov kvasiniek defektných v množstve, aktivite alebo vlastnostiach enzýmov citrátového cyklu ako aj kmeňov kvasiniek *S. cerevisiae* CCY 22-15-15 a *S. cerevisiae* 22-15-16 vyznačujúcich sa deficienciou v aktivite komplexu 2-oxoglutarát-dehydrogenázy. Selekcia takýchto mutantov je založená na neschopnosti ich buniek rásť na nefermentovateľných zdrojoch uhlíka a energie s výnimkou etanolu ako i na zvýšenej schopnosti ich kolónií znižovať pH okolitého prostredia v dôsledku nadprodukcie organických kyselín.

Vynález sa týka mutantov kvasiniek defektných v citrátovom cykle a spôsobu ich získavania. Jeho predmetom sú i kmene kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* CCY 22-15-15 a CCY 22-15-16 vyznačujúce sa deficienciou v aktivite enzýmového komplexu 2-oxoglutarátdehydrogenázy.

Cyklus trikarboxylových kyselín kvasiniek a iných eukaryotických organizmov je lokalizovaný v mitochondriách. Jeho cyklický sled reakcií je katalyzovaný sériou enzýmov a jeho primárnou funkciou je odbúranie acetylkoenzýmu A na oxid uhličitý a vodu. Počas tohto procesu ako reakčné medziprodukty vznikajú rôzne trikarboxylové a dikarboxylové kyseliny, ako napr. kyselina citrónová, izocitrónová, 2-oxoglutarátová, jantárová, fumárová, jablčná a oxaloctová. Hoci existuje pomerne široká škála mutantov deficitných v rôznych mitochondriálnych funkciách, mutanty kvasiniek s poruchou v citrátovom cykle sú zriedkavé a na rozdiel napríklad od respiračne deficitných sú relatívne ťažko selektovateľné, resp. identifikovateľné.

Mutanty kvasiniek, najmä fakultatívne anaeróbných *S. cerevisiae*, s poruchou v citrátovom cykle sú pripraviteľné postupom podľa tohto vynálezu. Jeho podstata spočíva v tom, že haploidné bunky kvasiniek *S. cerevisiae* sa podrobia účinku fyzikálneho alebo chemického mutagénu, napr. UV žiarenia, dusitanov alebo etylmetánsulfonátu a z populácie prežívajúcich buniek sa selektujú klony schopné dýchať a rásť na pevných pôdach obsahujúcich ako zdroj uhlíka a energie etanol, pričom tieto klony sú nerastúce na iných neskvasiteľných zdrojoch uhlíka ako sú glycerol, pyruvát, laktát alebo acetát. Takéto klony v dôsledku svojej metabolickej poruchy sú schopné vylučovať do okolitého prostredia organické kyseliny a preto sú identifikovateľné aj ako kolónie, ktoré počas rastu na pevných glukózových pôdach v dôsledku poklesu pH v okolí kolónie menia farbu indikátora pH napr. brómkrezolovej purpure z purpurovej do žltá. Analýzou enzýmových aktivít citrátového cyklu v bezbunkových preparátoch, resp. v izolovaných mitochondriách vybraného mutantu, napr. stanovením aktivity 2-oxoglutarátdehydrogenázy sa presne identifikuje defekt v metabolizme selektovaných mutantov. Z takto pripravených mutantov je možné žiadanú mutáciu ďalej preniesť i do iných kmeňov kvasiniek s odlišným genetickým pozadím a to konjugáciou buniek alebo fúziou protoplastov mutantu a vybraného sesterského kmeňa, na čo po sporulácii vzniknutých buniek heterozygótnych v MAT géne sa vyberú klony so žiadaným rekombinovaným genómom obsahujúce i mutáciu v citrátovom cykle.

Takýmito spôsobmi sa pripravili mutanty kvasiniek *S. cerevisiae* CCY 22-15-15 (TS 20-10A genotypu MAT a adel lys2) a CCY 22-15-16 (JS10-3C genotypu MAT a adel leu2) neschopné oxidovať 2-oxoglutarát, v dôsledku čoho sa samotný 2-oxoglutarát, jeho prekursor alebo produkty jeho metabolizmu (napr. kyselina glutamová) hromadia v bunke, resp. sú z nej vo zvýšenej miere vylučované do okolitého prostredia. Bunky týchto mutantov sú schopné rásť na glukóze i za anaeróbnych podmienok v prítomnosti ergosterolu a nenasýtených mastných kyselín. Nie sú schopné asimilovať pyruvát, laktát, acetát ani glycerol. V porovnaní so štandardnými kmeňmi ich aeróbne rastové výťažky na glukóze i etanole sú znížené.

Vynález je možné uskutočňovať podľa nasledovných príkladov bez toho, aby sa iba na ne výlučne obmedzoval.

#### Príklad 1

Bunky ( $10^7$  buniek/ml 0,05 M citrát-fosfátového pufru o pH 4,0) haploidného kmeňa kvasiniek *S. cerevisiae* TS 20 (MAT a adel lys2) sa vystavili účinku  $\text{NaNO}_3$  (3 mg/ml) na dobu 20 min. Po premytí a zriedení sa bunky vysiali na pevné glukózové pôdy (glukóza 20 g/l, pepton 20 g/l, kvasničný autolyzát 10 g/l, agar 20 g/l) a vyrastené kolónie (50-150 kolónií/Petriho miska) po troch dňoch rastu pri 30 °C sa replikou preniesli na pevné glycerolové pôdy (glycerol 20 g/l, pepton 10 g/l, kvasničný autolyzát 10 g/l, agar 20 g/l) a pevné etanolové pôdy (etanol 20 g/l, pepton 10 g/l, kvasničný autolyzát

10 g/l, agar 20 g/l). Po siedmich dňoch inkubácie pri 30 °C sa vybral klon nerastúci na glycerole ale slabo rastúci na etanole. U tohto klonu sa potvrdila neschopnosť jeho buniek rásť na acetáte, laktáte a pyruváte. V izolovaných mitochondriách sa zistila neschopnosť oxidovať 2-oxoglutarát tak v polarografických ako aj spektrofotometrických analýzach.

#### Príklad 2

Bunky ( $10^7$  buniek/ml 0,05 M fosfátového pufru o pH 7,0) haploidného kmeňa kvasiniek *S. cerevisiae* TS 20 (MAT a adel lys2) sa vystavili účinku etylmetansulfonátu (15 mg/ml) po dobu dvoch hodín. Bunky sa premyli, zriedili a vysiali v koncentrácii 50-150 kolóniu tvoriacich buniek/Petriho miska na pevné glukózové pôdy s brómkrezolovou purpurou ako indikátorom pH (glukóza 20 g/l, pepton 10 g/l, kvasničný autolýzát 10 g/l, agar 20 g/l, bromkrezolová purpur 30 mg/ml, pH 7,0). Po 3 dňoch rastu pri 30 °C sa vyrastené kolónie replikou preniesli na glycerolové pevné médiá a etanolové pevné médiá zloženia ako v príklade 1. Klony, ktorých kolónie v svojom okolí odfarbovali purpurovú farbu glukózových agarových pôd do žltá a po replike nerástli na glycerole avšak slabo rástli na etanole sa preklonovali a po potvrdení fenotypu sa podrobili analýze aktivity 2-oxoglutarátdehydrogenázy v izolovaných mitochondriách. Bunky dýchajúcich klonov neschopných oxidovať 2-oxoglutarát sa vybrali a skrížili so sesterským kmeňom *S. cerevisiae* GRF18 (MAT  $\Delta$  leu2 his3) opačného párovacieho typu a komplementárnych genetických znakov. Ich prototrofne selektované diploidné potomstvo sa podrobilo sporulácii a tetradovej analýze. Selektovali sa klony žiadaného genotypu schopné tvoriť kolónie na pevných etanolových médiách za súčasnej neschopnosti rastu na pevných glycerolových pôdach.

Mutanty kvasiniek s poruchou v citrátovom cykle sú použiteľné pri štúdiu funkcie a biogenézy enzýmov citrátového cyklu ako aj pri izolácii a klonovaní génov špecifikujúcich odpovedajúce enzýmové systémy. Navyše sú použiteľné i pri fermentačnej príprave karboxylových kyselín, resp. ktoré takéto mutanty v porovnaní so štandardným kmeňom do živného prostredia vylučujú vo zvýšenej miere.

#### P R E D M E T   V Y N Á L E Z U

1. Mutanty kvasiniek rodu *S. cerevisiae*, defektné v citrátovom cykle, obzvlášť v reakcii 2-oxoglutarátdehydrogenázy.
2. Mutant kmeňa kvasinky *S. cerevisiae* CCY 22-15-15.
3. Mutant kmeňa kvasinky *S. cerevisiae* CCY 22-15-16.
4. Spôsob výroby podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že po mutagenéze s fyzikálnymi alebo chemickými mutagénmi sa z populácii kvasiniek selektujú dýchajúce klony, ktoré pri analyzovanej teplote rastú na etanole ale postrádajú schopnosť rásť na iných ne-  
skvasiteľných zdrojoch uhlíka a energie, a a/alebo ktoré z metabolizovateľných zdrojov uhlíka produkujú väčšie množstvo kyselín, a/alebo ktoré na základe výsledkov biochemických analýz sú zmenené v množstve, aktivite alebo vlastnosticha enzýmov mitochondriálneho citrátového cyklu, napríklad v aktivite komplexu 2-oxoglutarátdehydrogenázy.