

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 1165

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷ :

C 12 N 15/52

C 12 N 15/81

C 12 N 1/19

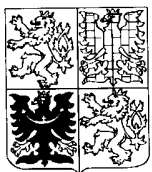
C 12 P 5/02

C 12 P 7/04

C 12 P 7/02

C 12 P 33/00

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **28.09.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **30.09.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/19744212**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.07.2000**
(Věstník č. 7/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/06134**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/16886**

(71) Přihlašovatel:

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT, Berlin, DE;

(72) Původce:

Weber Alfred, Berlin, DE;

Klages Uwe, Berlin, DE;

Kennecke Mario, Berlin, DE;

Lang Christine, Berlin, DE;

Stahl Ulf, Berlin, DE;

Polakowski Thomas, Berlin, DE;

(74) Zástupce:

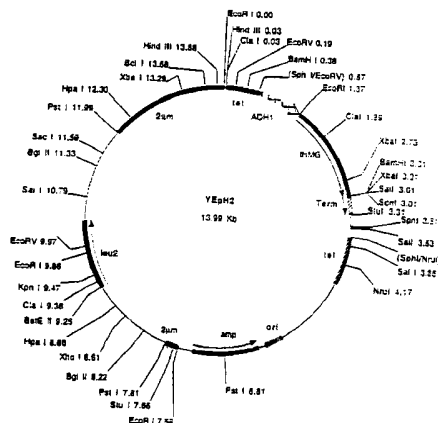
Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob výroby ergosterolu a jeho meziproduktů
pomocí rekombinantních kvasinek**

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu výroby ergosterolu a jeho meziproduktů pomocí rekombinantních kvasinek a plasmidů pro transformaci kvasinek.



25.04.00

JUDr. ANTON VĚTEČKA
advokát
120 00 PRAHA 2, HÁŽKOVA 2

PV 2070-1165

20944

Způsob výroby ergosterolu a jeho meziproduktů pomocí rekombinantních kvasinek

Oblast techniky

Tento vynález se týká postupu výroby ergosterolu a jeho meziproduktů pomocí rekombinantních kvasinek a plasmidů pro transformaci kvasinek.

Dosavadní stav techniky

Ergosterol je konečným produktem syntézy sterolů v kvasinkách a v houbách. Hospodářský význam této látky spočívá jednak v získávání vitamínu D₂ z ergosterolu působením UV-záření a jednak v získávání steroidních hormonů pomocí biotransformace, přičemž se vychází z ergosterolu. Skvalen se používá jako základní syntetický materiál pro syntézu terpenů. Jeho hydrogenovaná forma skvalan se používá v dermatologii a v kosmetice spolu s různými deriváty jako součást prostředků pro péči o pleť a vlasy. Hospodářský význam mají i meziprodukty látkové přeměny ergosterolu. Nejdůležitější z těchto meziproduktů jsou farnesol, geraniol a skvalen. Hospodářsky využitelné jsou i další steroly, jako např. zymosterol a lanosterol, přičemž lanosterol je klíčovou přírodní i syntetickou látkou používanou pro chemickou syntézu saponinů a steroidních hormonů. Lanosterol dobře proniká do pokožky a dobře se roztírá, a proto se používá jako emulgační prostředek a jako účinná složka pleťových krémů.

Geny řídící látkovou přeměnu ergosterolu v kvasinkách

25.04.00

jsou dostatečně známy a klonovány, jako např. HMG-CoA-reduktasa (HMG1) (Basson a spol., 1988), skvalensynthetasa (ERG9) (Fegueur a spol., 1991), Acyl-CoA:sterol-acyltransferasa (SAT1) (Yu a spol., 1996) a skvalenepoxidasa (ERG1) (Jandrositz a spol., 1991). Skvalensynthetasa katalyzuje reakci farnesylpyrofosfátu přes preskvalenpyrofosfát na skvalen. Reakční mechanismy sterolacyltransferasy nejsou dosud zcela prozkoumány. Vysoká exprese genu těchto uvedených enzymů byla již ověřována, nevedla však k žádnému podstatnému zvýšení množství získaného ergosterolu. V případě HMG1-vysoké exprese byla popsána zvýšená produkce skvalenu, při této reakci byly kromě toho zaváděny mutace pro přerušení další reakce po získání skvalenu (EP-0 486 290). Zvýšená produkce geraniolu a farnesolu byla rovněž popsána, zde však nedocházelo k žádné vysoké expresi genů látkové přeměny ergosterolu, nýbrž k přerušení reakčního sledu ve směru tvorby geraniolu a farnesolu (EP-0313 465).

Specifické inhibitory biosyntézy ergosterolu mohou vést i k nahromadění větších množství určitých meziproduktů, například allylaminů, které brání přeměně skvalenu na skvalenepoxid. Tak je možno dosáhnout podstatného zvýšení množství skvalenu (až 600-násobek normálního množství) (Jandrositz a spol., 1991).

Použití inhibitorů sice umožňuje dosáhnout podstatného zvýšení množství např. skvalenu, přesto není přidávání těchto látek výhodné, poněvadž stejné účinky mají v organismu již jejich nepatrná množství, a proto je způsob výroby produktů biosyntézy ergosterolu způsobem zvýšené produkce výhodnější.

Cílem tohoto vynálezu je vypracování mikrobiologického postupu výroby ergosterolu a jeho meziproduktů, k tomu potřebných mikroorganismů jako jsou kmeny kvasinek, které syntetizují zvýšená množství ergosterolu resp. potřebných meziproduktů a příprava plasmidů potřebných k transformaci kmenů kvasinek.

Podstata vynálezu

Nyní bylo zjištěno, že je možno zvýšit množství ergosterolu a jeho meziproduktů, jestliže se vloží geny HMG1 (Basson a spol., 1988), ERG9 (Fegueur a spol., 1991, Current Genetics 20:365-372), SAT1 (Yu a spol., 1996) a ERG1 (Jandrositz a spol., 1991) v přeměněné formě do mikroorganismů jako jsou např. kvasinky, přičemž jsou tyto geny vkládány jednotlivě do jednoho plasmidu nebo v kombinaci do jednoho nebo více plasmidů a do hostitelských buněk se vkládají současně nebo postupně.

Předmětem předloženého vynálezu je způsob, jehož podstata spočívá v tom, že

a) se nejprve vytvoří plasmid, do něhož se vkládá v přeměněné formě několik genů vhodných pro látkovou přeměnu ergosterolu

nebo

b) se nejprve vytvoří plasmid, do něhož se vkládá v přeměněné formě vždy jeden z genů vhodných pro látkovou přeměnu ergosterolu,

- c) takto připraveným plasmidem se transformují mikroorganismy, přičemž se tyto mikroorganismy transformují jedním plasmidem podle a) nebo několika plasmidy podle b) současně nebo postupně,
- d) s takto připravenými mikroorganismy se provede fermentace na ergosterol,
- e) po provedené fermentaci se ergosterol a jeho meziprodukty z buněk extrahují a analyzují a konečně
- f) takto získaný ergosterol a jeho meziprodukty se čistí a izolují pomocí sloupcové chromatografie.

Předmětem tohoto vynálezu je zejména způsob, jehož podstata spočívá v tom, že

a-i) se nejprve vytvoří plasmid, do něhož se vkládají následující geny:

- i) gen HMG-CoA-reduktasy (t-HMG),
- ii) gen skvalensynthetasy (ERG9)
- iii) gen acyl-CoA:sterol-acyltransferasy (SAT1) a
- iv) gen skvalenepoxidasy (ERG1),

nebo

a-ii) se nejprve vytvoří plasmid, do něhož se vkládají následující geny:

- i) gen HMG-CoA-reduktasy (t-HMG), a
- ii) gen skvalensynthetasy (ERG9),

nebo

a-iii) se nejprve vytvoří plasmid, do něhož se vkládají následující geny:

i) gen HMG-CoA-reduktasy (t-HMG)

a

iii) gen acyl-CoA:sterol-acyltransferasy (SAT1),

nebo

a-iv) se nejprve vytvoří plasmid, do něhož se vkládají následující geny:

i) gen HMG-CoA-reduktasy (t-HMG)

a

iv) gen skvalenepoxidasy (ERG1),

nebo

a-v) se nejprve vytvoří plasmid, do něhož se vkládají následující geny:

ii) gen skvalensynthetasy (ERG9)

a

iii) gen acyl-CoA:sterol-acyltransferasy (SAT1)

nebo

a-vi) se nejprve vytvoří plasmid, do něhož se vkládají následující geny:

ii) gen skvalensynthetasy (ERG9)

a

iv) gen skvalenepoxidasy (ERG1),

nebo

a-vii) se nejprve vytvoří plasmid, do něhož se vkládají následující geny:

iii) gen acyl-CoA:sterol-acyltransferasy (SAT1)

a

iv) gen skvalenepoxidasy (ERG1),

nebo

b) se nejprve vytvoří plasmid, do něhož se vkládá vždy jeden z genů uvedených pod a-i,

a

c) pomocí takto připravených plasmidů se transformují mikroorganismy, přičemž tyto mikroorganismy se transformují jedním plasmidem uvedeným pod a-i) až a-vii) nebo několika plasmidy uvedenými pod b) současně nebo

postupně,

- d) s takto získanými mikroorganismy se provede fermentace na ergosterol,
- e) po provedené fermentaci se ergosterol a jeho meziprodukty vyextrahují z buněk a analyzují a konečně
- f) takto získaný ergosterol a jeho meziprodukty se čistí a izolují pomocí sloupcové chromatografie.

Do plasmidů uvedených v a-ii), a-iii) a a-v) je možno dodatečně vložit gen skvalenepoxidasy (ERG1) a do plasmidu uvedeného v a-ii je možno dodatečně vložit gen acyl-CoA:sterol-acyltransferasy (SAT1). Tyto plasmidy jsou rovněž předmětem tohoto vynálezu.

K meziproduktům patří skvalen, farnesol, geraniol, lanosterol, zymosterol, 4,4-dimethylzymosterol, ergost-7-enol a ergosta-5,7-dienol, zejména steroly s 5,7-dienovou strukturou.

Použitými plasmidy jsou přednostně plasmid YepH2, který obsahuje střední (mittler) ADH-promotor, t-HMG (přeměněná varianta HMG1) a TRP-terminátor (viz obr.1), plasmid YDpUHK3, který obsahuje střední ADH-promotor, t-HMG (přeměněná varianta HMG1) a TRP-terminátor, gen pro kanamycinovou resistenci a gen ura3 (viz obr.2) a plasmid pADL-SAT1, který obsahuje gen SAT1 a gen LEU2 z Yep13.

Tyto plasmidy a jejich použití pro výrobu ergosterolu a jeho meziproduktů, jako jsou skvalen, farnesol, geraniol, lanosterol, zymosterol, 4,4-dimethylzymosterol, 4-methyl-

zymosterol, ergost-7-enol a ergosta-5,7-dienol, zejména steroly s 5,7-dienovou strukturou, jsou rovněž předmětem tohoto vynálezu.

Hostitelem pro zavádění plasmidů podle tohoto vynálezu mohou být v podstatě jakékoli mikroorganismy, zejména však kvasinky.

Přednostně je možno používat druh *S.cerevisiae*, zejména kmen *S.cerevisiae* AH22.

Předmětem tohoto vynálezu je i kmen kvasinek *S.cerevisiae* AH22, který obsahuje plasmid pADL-SAT1.

Rovněž je preferována kombinovaná transformace mikroorganismů s plasmidy pADL-SAT1 a YDpUHK3, zejména transformace kvasinek jako např. *S.cerevisiae* AH22.

Sled látkové přeměny ergosterolu je obecně ovlivňován následovně:

Reakční sled ve směru ergosterol je maximalizován, přičemž aktivita několika úzkoprofilových (flaschenhals) enzymů se zároveň zvyšuje. Rozhodující roli mají přitom různé enzymy, přičemž rozhodující vliv na zvýšení výtěžku ergosterolu má kombinace deregulace resp. vysoké exprese. Jako kombinace se používají enzymy resp. jejich geny HMG1 (Basson a spol., 1988), ERG9 (Fegueur a spol., 1991), acyl-CoA:sterol-acyltransferasa (SAT1) (Yu a spol., 1996) a/nebo skvalenepoxidas (ERG1) (Jandrositz a spol., 1991) vložené v pozměněné formě do kmene kvasinek, přičemž vkládání genů se provádí pomocí jednoho nebo více plasmidů a tento plasmid (tyto plasmidy) obsahují DNA-sekvence buď

jednotlivě, nebo v kombinaci. "Pozměněný" znamená v případě genu HMG1, že z příslušného genu se exprimuje pouze jeho katalytická oblast bez domény vázané na membránu. Tato přeměna již byla popsána (EP-0486 290). Cílem přeměny HMG1 je zabránit zpětné (feed-back) regulaci způsobené meziprodukty biosyntézy ergosterolu. To znamená, že jak u HMG1, tak i u obou ostatních uvedených genů nedojde k transkripční regulaci. Kromě toho je promotor genů nahrazen "středním (mittler)" promotorem ADH1. Tento promotorový fragment ADH1-promotoru se vyznačuje přibližně konstitutivní expresí (Ruohonen a spol., 1995), takže transkripční regulace již dále přes meziprodukty biosyntézy ergosterolu neprobíhá.

Produkty vznikající při vysoké expresi je možno využívat pro biotransformace resp. jiné chemické a terapeutické účely, např. pro získávání vitamínu D₂ z ergosterolu působením UV-záření a pro získávání steroidních hormonů z ergosterolu s použitím biotransformací.

Předmětem tohoto vynálezu jsou i mikroorganismy, zejména kmeny kvasinek, které s použitím vysoké exprese při postupu s geny uvedenými pod a-i) umožňují výrobu zvýšeného množství ergosterolu a ergosterolu v kombinaci se zvýšeným množstvím skvalenu.

Preferována je přeměněná varianta genu HMG1, v němž byla exprimována pouze katalytická oblast bez domény vázané na membránu. Tato přeměna byla popsána (EP-0486 290).

Předmětem tohoto vynálezu je i postup výroby ergosterolu a meziproduktů vznikajících při této reakci, který se vyznačuje tím, že geny uvedené v postupu pod a), zejména

v postupu pod a-i) až a-vii) (dvojnásobná, trojnásobná, čtyřnásobná kombinace genů) se spolu s plasmidy nejprve nezávisle na sobě vloží do mikroorganismů stejného druhu, s nimi se provede fermentace na ergosterol a takto získaný ergosterol se z buněk extrahuje, analyzuje, čistí a izoluje pomocí sloupcové chromatografie.

Předmětem tohoto vynálezu jsou rovněž expresní kazety, zahrnující střední ADH-promotor, gen t-HMG, TRP-terminátor a gen SAT1 se středním ADH-promotorem a TRP-terminátorem a expresní kazety zahrnující střední ADH-promotor, gen t-HMG, TRP-terminátor, gen SAT1 se středním ADH-promotorem a TRP-terminátorem a gen ERG9 se středním ADH-promotorem a TRP-terminátorem.

Předmětem tohoto vynálezu je i kombinace expresních kazet, přičemž tuto kombinaci tvoří

- a) první expresní kazeta, na níž je lokalizován ADH-promotor, gen t-HMG a TRP-terminátor
- b) druhá expresní kazeta, na níž je lokalizován ADH-promotor, gen SAT1 a TRP-terminátor,
- a
- c) třetí expresní kazeta, na níž je lokalizován ADH-promotor, gen ERG9 s TRP-terminátorem.

Dále je předmětem tohoto vynálezu použití těchto expresních kazet pro transformaci mikroorganismů používaných pro fermentaci na ergosterol, přičemž těmito mikroorganismy jsou přednostně kvasinky.

Předmětem tohoto vynálezu jsou i mikroorganismy, jako jsou kvasinky, které obsahují tyto expresní kazety a rovněž jejich použití při fermentaci na ergosterol a jeho mezi-produkty.

Následující příklady jsou určeny pro objasnění prováděných postupů.

Příklady provedení vynálezu

1. Restrikce

Restrikce plasmidu (1 až 30 μg) byla prováděna v šaržích po 30 μl . Přitom byly k DNA obsažené ve 24 μl H_2O přidány 3 μl příslušného pufru, 1 μl RSA (hovězí sérový albumin) a 2 μl enzymu. Koncentrace enzymu byla 1 jedn./ μl nebo 5 jedn./ μl podle množství DNA. V některých případech byl přidán ještě 1 μl enzymu RNasa, aby se odbourala tRNA. Tato restrikční reakční směs byla inkubována 2 hodiny při teplotě 37 °C. Restrikce byla kontrolována s použitím Minigelu.

2. Gelová elektroforéza

Gelové elektroforézy byly prováděny v aparaturách Minigel (Minigelapparatur) nebo Wide-Minigel. Minigely (ca 20 ml, 8 jamek) a Wide-Minigely (50 ml, 15 nebo 30 jamek) se skládaly z 1% agarosy v TAE. Jako pufr byl použit 1 x TAE. Ke vzorkům (10 μl) byly přidány 3 μl roztoku stoperu a vzorky byly nanесeny. Jako standard byla použita I-DNA s *Hind*III (pásky: 23,1 kb; 9,4 kb; 6,6 kb; 4,4 kb; 2,3 kb;

2,0 kb; 0,6 kb). Dělení bylo prováděno při napětí 80 V po dobu 45 až 60 minut. Potom byl gel vybarven v roztoku ethidiumbromidu a vyhodnocován v UV-světle pomocí videodokumentárního systému INTAS nebo fotografován s použitím oranžového filtru.

3. Eluce gelu

Požadované fragmenty byly izolovány eluováním gelu. Restrikční reakční směs byla nanesena na několik jamek Minigelu a rozdělena. V roztoku ethidiumbromidu byly vybarveny pouze lambda-*Hind*III a stopa nějaké látky, tyto látky byly sledovány v UV-světle a požadovaný fragment byl označen. Tím se zabránilo poškození DNA v ostatních jamkách působením ethidiumbromidu a UV-záření. Požadovaný fragment bylo možno díky označení vyříznout z nevybarveného gelu po položení vybarvených a nevybarvených částí gelu na sebe. Podíl agarosy s izolovaným fragmentem byl vložen do dialyzační trubice, bylo přidáno trochu TAE-pufu bez vzduchových bublin a tento podíl byl vložen do aparatury BioRad Minigel. Jako promývací pufr byl použit 1 x TAE, napětí bylo 100 V po dobu 40 minut. Potom byla na dobu 2 minut změněna polarita elektrického proudu, aby se uvolnila DNA ulpělá na dialyzační trubici. Pufr z dialyzační trubice obsahující DNA-fragmenty byl převeden do reakční nádoby a byl srážen ethanol. Přitom byly k roztoku DNA přidány 1/10 objemu 3M octanu sodného, tRNA (1 μ l na 50 μ l roztoku) a dvaapůlnásobný objem ledově studeného 96%ního ethanolu. Tato reakční směs byla inkubována po dobu 30 minut při teplotě -20 °C a potom byla odstřeďována při 12 000 1/min po dobu 30 minut při teplotě 4 °C. Peleta DNA byla vysušena a vyjmuta do 10 až 50 μ l vody (podle množství DNA).

4. Úprava podle Klenowa

Postupem podle Klenowa byly přečnívající konce DNA-fragmentů vyplněny, takže vznikly "tupé konce" (blunt-ends). Na 1 μg DNA byly pipetovány následující složky:

Peleta DNA + 11 μl H_2O
+ 1,5 μl 10x pufr Klenow
+ 1 μl 0,1 M DTT
+ 1 μl nukleotid (dNTP 2 mM)
+ 1 μl Klenow-polymerasa (1 jedn./ μl)

DNA je třeba připravit srážením ethanolem, aby se zabránilo inhibici Klenow-polymerasy způsobené nečistotami. Inkubace byla prováděna po dobu 30 minut při teplotě 37 $^{\circ}\text{C}$, následujícím záhřevem po dobu 5 minut na teplotu 70 $^{\circ}\text{C}$ byla reakce zastavena. DNA byla z této reakční směsi získána srážením ethanolem a byla vyjmuta do 10 μl H_2O .

5. Ligace

Fragmenty DNA určené k navázání byly spojeny. V konečném objemu 13,1 μl bylo obsaženo cca 0,5 μl DNA s vektorovým poměrem 1 : 5. Tento vzorek byl inkubován po dobu 45 sekund při teplotě 70 $^{\circ}\text{C}$, zchlazen na laboratorní teplotu (cca 3 minuty) a potom byl po dobu 10 minut ochlazován na ledu. Pak byl přidán ligační pufr: 2,6 μl 500 mM Tris.HCl pH 7,5 a 1,3 μl 100 mM MgCl_2 a tato směs byla po dalších 10 minut inkubována na ledu. Po přidavku 1 μl 500 mM DTT a 1 μl 10 mM ATP a dalších 10 minutách inkubace na ledu byl přidán 1 μl ligasy (1 jedn./ μl). Celý reakční postup byl prováděn pokud možno bez otřesů, aby se konce DNA ležící u sebe opět neoddalovaly. Ligace byla prováděna přes noc při

teplotě 14 °C.

6. Transformace *E.coli*

Příslušné buňky *Escherichia coli* (*E.coli*) NM522 byly transformovány DNA z ligační reakce. Jako pozitivní kontrola byla současně provedena reakce s 50 ng plasmidu pScL3 a jako nulová kontrola byla provedena reakce bez přídavku DNA. Při každé transformační reakci bylo pipetováno 100 µl 8% roztoku PEG, 10 µl DNA a 200 µl kompetentních buněk (*E.coli* NM522) do zkumavky stolní odstředivky. Reakční směsi byly na dobu 30 minut vloženy do ledu a občas protřepány. Potom byl proveden tepelný šok: 1 minuta při 42 °C. Pro regeneraci byl k buňkám přidán 1 ml LB-media a reakční směs byla inkubována po dobu 90 minut při teplotě 37 °C na třepačce. Na LB + Ampicilinové desky bylo nanесeno po 100 µl neředěné reakční směsi, reakční směsi zředěné 1 : 10 a 1 : 100 a kultivace byla prováděna přes noc při teplotě 37 °C.

7. Izolace plasmidu z *E.coli* (minipreparace)

Kolonie *E.coli* byly vloženy přes noc do 1,5 ml media LB+Ampicilin do zkumavky do stolní odstředivky při 37 °C a 120 1/min. Následující den byly buňky odstřeďovány po dobu 5 minut při 5000 1/min. a teplotě 4 °C, získaná peleta byla vyjmuta do 50 µl TE-pufu. Ke každé reakční směsi bylo přidáno 100 µl 0,2 N NaOH, 1 % roztoku SDS, směs byla promíchána a vložena na 5 minut na led (lýze buněk). Potom bylo přidáno 400 µl roztoku Na-acetát/NaCl (230 µl H₂O, 130 µl 3 M Na-acetát, 40 µl 5 M NaCl), reakční směs byla promíchána a na dalších 15 minut vložena na led (srážení proteinu). Po 15-timinutovém odstředění při 11 000 1/min. byl supernatant obsahující plasmid-DNA převeden do Eppen-

dorfovy nádobky. Jestliže supernatant nebyl zcela čirý, bylo odstřeďování provedeno znovu. K supernatantu bylo přidáno 360 μ l ledově studeného isopropanolu a směs byla inkubována po dobu 30 minut při teplotě -20°C (srážení DNA). DNA byla odstředěna (15 min., 12000 1/min., 4°C), supernatant byl odstraněn, peleta byla promyta 100 μ l ledového 96% ethanolu, 15 minut inkubována při -20°C a opět odstředěna (15 min., 12 000 1/min., 4°C). Získaná peleta byla vysušena v sušárně Speed Vac a potom byla vyjmuta do 100 μ l H_2O . Plasmid-DNA byl charakterizován restriční analýzou. Přitom byla vždy provedena restrikce s 10 μ l reakční směsi a dělení bylo provedeno elektroforézou na gelu Wide-Minigel (viz dříve).

8. Zpracování plasmidu z E.coli (maxipreparace)

Pro izolaci většího množství plasmid-DNA byla použita metoda maxipreparace (Maxipräp). Dvě baňky obsahující po 100 ml media LB+Ampicilin byly zaočkovány kolonií resp. 100 μ l zmrazené kultury nesoucí izolovaný plasmid a byly kultivovány přes noc při 37°C a 120 1/min. Tato kultura (200 ml) byla následující den vlita do GSA-nádobky a odstřeďována při 4000 1/min. (2600 x g) po dobu 10 minut. Peleta buněk byla vyjmuta do 6 ml TE-pufu. Pro natrávení (Abdau) buněčné stěny bylo přidáno 1,2 ml roztoku lysozymu (20 mg/ml TE-pufu) a reakční směs byla inkubována po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Nakonec byla provedena lýza buněk působením 12 ml 0,2 N NaOH, 1 % roztoku SDS a inkubace byla prováděna dalších 5 minut při laboratorní teplotě. Proteiny byly vysráženy přidávkou 9 ml zchlazeného 3 M roztoku Na-acetátu (pH 4,8) při patnáctiminutové inkubaci na ledu. Po odstředění (GSA:13000 1/min. (27500 x g), 20 min., 4°C) byl supernatant obsahující DNA převeden do jiné GSA-nádobky

a DNA byla vysrážena 15 ml ledového isopropanolu při 30-minutové inkubaci při teplotě -20°C . Peleta DNA byla promyta 5 ml ledového ethanolu a vysušena na vzduchu (cca 30 - 60 minut). Potom byla vyjmuta do 1 ml H_2O . Kontrola plasmidu byla provedena restriční analýzou. Koncentrace byla určena nanášením zředovaného roztoku na Minigel. Pro snížení obsahu solí byla provedena 30 až 60-timinutová mikrodialýza (velikost pórů $0,025\ \mu\text{m}$).

9. Transformace kvasinek

Pro transformaci kvasinek byla použita předpěstovaná kultura (Voranzucht) kmene *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*) AH22. Baňka s 20 ml YE-media byla zaočkována 100 μl zmrazené kultury a kultivována přes noc při 28°C a 12 1/min. Hlavní kultivace byla provedena za stejných podmínek v baňce se 100 ml YE-media, zaočkovaného 10 μl , 20 μl nebo 50 μl předpěstované kultury.

9.1 Příprava kompetentních buněk

Následující den byl obsah baňek vyhodnocen pomocí Thomovy komůrky (Thomakammer) a nadále byla zpracována baňka s obsahem $3 - 5 \times 10^7$ buněk/ml. Buňky byly získány odstředěním (GSA: 5000 1/min. ($4000 \times g$), 10 minut). Peleta buněk byla vyjmuta do 10 ml TE-pufu a rozdělena do dvou zkumavek stolní odstředivky (po 5 ml). Buňky byly odstředovány 3 minuty při 6000 1/min. a ještě dvakrát promyty po 5 ml TE-pufu. Nakonec byla peleta buněk vyjmuta do 330 μl lithiumacetátového pufu na 10^9 buněk, převedena do sterilní 50 ml Erlenmeyerovy baňky a jednu hodinu protřepávána při teplotě 28°C . Tímto způsobem byly získány kompetentní buňky pro transformaci.

9.2 Transformace

Při každé transformační reakci bylo do zkumavky stolní odstředivky napipetováno 15 μ l DNA sledího spermatu (Heringssperma DNA) (10 mg/ml), 10 μ l transformované DNA (cca 0,5 μ g) a 330 μ l kompetentních buněk a tato směs byla inkubována po dobu 30 minut při teplotě 28 °C (bez třepání!). Potom bylo přidáno 700 μ l 50 % PEG 6000 a inkubace byla prováděna další hodinu při 28 °C bez třepání. Pak následoval tepelný šok po dobu 5 minut při 42 °C.

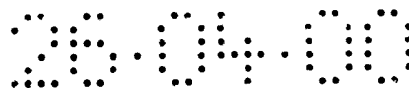
100 μ l této suspenze bylo nanесeno na selekční medium (YNB, Difco), aby bylo možno provést selekci na leucinprototrofii. Při selekci na G418-rezistenci byla po tepelném šoku provedena regenerace buněk (viz Fáze regenerace, část 9.3).

9.3 Fáze regenerace

Vzhledem k tomu, že selekční marker znamená resistenci proti G418, potřebovaly buňky čas pro expresi resistenčního genu. K transformační reakční směsi byly přidány 4 ml YE-media a tato reakční směs byla kultivována přes noc při 28 °C na třepačce (120 1/min.). Následující den byly buňky odstředěny (6000 1/min, 3 min.), vyjmuty do 1 ml YE-media a z této směsi bylo nanесeno 100 μ l resp. 200 μ l na desky YE-G418. Tyto desky byly kultivovány několik dnů při teplotě 28 °C.

10. Reakční podmínky pro PCR

Reakční podmínky pro polymerázovou řetězovou reakci (Polymerase Chain Reaction - PCR) bylo nutno optimalizovat



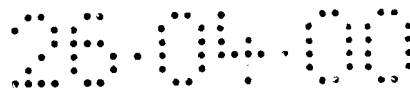
pro každý pokus, takže nejsou všeobecně platné pro každou reakční směs. Kromě jiného je možno měnit množství DNA, koncentraci solí a teplotu rozpouštění (Schmelztemperatur). Pro naše podmínky bylo vhodné použít klobouček Eppendorf, určený pro zařízení Thermocycler, do něhož byly dány následující látky: Ke 2 μ l (cca 0,1 U) polymerasy Super Taq Polymerase bylo přidáno 5 μ l pufru Super Buffer, 8 μ l dNTP (po 0,625 μ M), 5'-primer, 3'-primer a 0,2 μ g matrice DNA rozpuštěné v takovém množství vody, aby se získal celkový objem reakční směsi pro PCR 50 μ l. Tato reakční směs byla krátce odstředěna a převrstvena kapkou oleje. Pro amplifikace bylo používáno 37 až 40 cyklů.

Dále uvedené příklady provedení popisují přípravu plasmidů podle tohoto vynálezu, přípravu kmenů kvasinek a jejich použití, tento vynález se však na uvedené příklady nijak neomezuje.

Příklad 1

Exprese tHMG v *S.cerevisiae* AH22

DNA-sekvence pro tHMG (Basson a spol., 1988) byla amplifikována standardními způsoby pomocí PCR z genomické DNA ze *Saccharomyces cerevisiae* S288C (Mortimer a Johnston, 1986). Použitými priméry byly DNA oligomery tHMG-5' a tHMG-3' (viz sekv. ID č. 1 a 2). Získaný fragment DNA byl po úpravě podle Klenowa vložen do klonovacího vektoru pUC19 (Yanish-Perron a spol., 1985) a poskytl tak vektor pUC19-tHMG. Po izolaci plasmidu a restrikci pUC19-tHMG pomocí endonukleas *Eco*RI a *Bam*HI byl získaný fragment vložen do expresního vektoru kvasinek pPT2b (Lang a Looman, 1995), který byl rovněž upraven pomocí *Eco*RI a *Bam*HI. Vzniklý



plasmid pPT2b-tHMG obsahoval ADH1-promotor (Bennetzen a Hall, 1982) a TRP1-terminátor (Tschumper a Carbon, 1980), mezi něž byl vložen fragment tHMG-DNA. Z vektoru pPT2b-tHMG byl pomocí endonukleas *EcoRV* a *NruI* izolován úsek DNA, který obsahoval tzv. střední ADH1-promotor obsahující tHMG a *TRP1*-terminátor. Tento úsek DNA byl vložen do kvasinkového vektoru YEp13 (Fischhoff a spol., 1984), upraveného endonukleasou *SphI* a DNA-polymerasou. Takto vzniklý vektor YEpH2 (obr. 1) byl upraven endonukleasou *EcoRV* a *NruI*. Vznikl tak DNA-fragment s následujícími oblastmi: transkripčně-aktivní oblast z tetracyklin-resistentního genu (Sidhu a Bollon, 1990), ze středního ADH1-promotoru, z tHMG a z TRP-terminátoru (expresní kazeta). Tento DNA-fragment byl vložen do vektoru YdpU (Berben a spol., 1991), upraveného *StuI*. Takto vzniklý vektor YdpUH2/12 byl upraven endonukleasou *SmaI* a navázán na DNA-sekvenci kódující kanamycinovou resistenci (Webster a Dickson, 1983). Tento vzniklý konstrukt (YdpUHK3, obr. 2) byl upraven pomocí *EcoRV*. Tímto konstruktem byl transformován kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* AH22. Tato transformace kvasinek působením linearizovaného vektoru podle tohoto příkladu vede k chromosomální integraci celého vektoru v místě genu (Genlocus) URA3. Aby bylo možno z integrovaného vektoru eliminovat oblasti které nepatří do expresní kazety (pocházející z *E.coli*, *E.coli*-Ampicilinresistentního genu, TEF-promotoru a kanamycinresistentního genu), byly transformované kvasinky vystaveny selekčnímu tlaku (Selektionsdruck) pomocí FOA-selekce (Boeke a spol., 1987), kterou pozitivně ovlivňovaly uracil-auxotrofní kvasinky. Uracil-auxotrofní kmen vzniklý touto selekcí nese označení AH22/tH3ura8 a obsahuje tHMG1-expresní kazetu jako chromosomální integraci v URA2-genu.

Kmen kvasinek AH22/tH3ura8 a výchozí kmen AH22 byly kultivovány po dobu 48 hodin v YE při teplotě 28 °C při 160 1/min v kultivačních baňkách (Schikanekolben).

Podmínky při kultivaci:

Násada pro předpěstovanou kulturu WMVIII byla následující:

směs 20 ml WMVIII + histidin (20 µg/ml) + uracil (20 µg/ml) byla zaočkována 100 µl zmrazené kultury a tato směs byla inkubována 2 dny při 28 °C a 120 1/min (vratný pohyb). Touto předpěstovanou kulturou o objemu 20 ml byla zaočkována směs 100 ml WMVIII + histidin (20 µg/ml) + uracil (20 µg/ml). Při hlavní kultivaci bylo 50 ml YE (ve 250 ml kultivačních baňkách) zaočkováno 1×10^9 buněk. Tyto baňky byly inkubovány při 160 1/min na kruhové třepačce při 28 °C po dobu 48 hodin. Potom byla stanovena HMG-CoA-reduktasová aktivita (postup Quareshi a spol., 1981) a byly získány následující hodnoty:

Tabulka 1

	specifická HMG-CoA-reduktasová aktivita * (jedn./mg proteinu)
AH22	3,99
AH22/tH3ura8	11,12

* Jednotka je definována jako přeměna 1 nmol NADPH za minutu v jednom mililitru reakční směsi. Měření byla prováděna s celými proteinovými izoláty.

Steroly byly vyextrahovány (Parks a spol., 1985) a analyzovány plynovou chromatografií. Byly získány následující hodnoty:

Tabulka 2

	Skvalen (% hmotn.)	Ergosterol (% hmotn.)
AH22	0,01794	1,639
AH22/tH3ura8	0,8361	1,7024

Procentuální údaje jsou vztaženy na sušinu kvasinek.

Příklad 2

Exprese SAT1 v *S.cerevisiae* AH22

Sekvence pro Acyl-CoA:steroltransferasu (*SAT1*; Yang a spol., 1996) byla získána postupem uvedeným dříve pomocí PCR z genomické DNA ze *Saccharomyces cerevisiae* S288C. Použitými priméry byly DNA-oligomery SAT1-5' a SAT1-3' (viz sekv. ID č. 3 a 4). Získaný DNA-fragment byl klonován v klonovacím vektoru pGEM-T (Mezei a Storts, 1994) za vzniku vektoru pGEM-SAT1. Po úpravě pGEM-SAT1 působením *EcoRI* byl získán fragment klonovaný v expresním vektoru kvasinek pADH1001, který byl rovněž upraven *EcoRI*. Takto vzniklý vektor pADH-SAT1 byl upraven působením endonukleasy *NruI* a navázán na fragment z Yep13, který obsahoval *LEU2*-gen.

Tak vznikl expresní vektor kvasinek pADL-SAT1

(obr.3), který byl vložen do kmene kvasinek AH22. Takto připravený kmen AH22/pADL-SAT1 byl inkubován po dobu 7 dnů v VMVIII (Lang a Looman, 1995) na Minimalmediu. Podmínky kultivace: (předpěstovaná kultura viz dříve). Hlavní kultivace: směs 50 ml VMVIII + histidin (20 µg/ml) + uracil (20 µg/ml) (ve 250 ml kultivačních baňkách) byla zaočkována 1×10^9 buněk. Baňky byly inkubovány při 160 1/min na kruhové třepačce při 28 °C po dobu 7 dnů. Vzniklé steroly byly analyzovány plynovou chromatografií (viz Tab.3).

Tabulka 3

	Skvalen (% hmotn.)	Ergosterol (% hmotn.)
AH22	nelze stanovit	1,254
AH22/pADL-SAT1	nelze stanovit	1,831

Procentuální údaje jsou vztaženy na sušinu kvasinek.

Příklad 3

Kombinovaná exprese zkrácené 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reduktasy (*tHMG*) a acyl-CoA:sterol-acyltransferasy (*SAT1*)

Příklad 3.1

Kmen kvasinek AH22/tH3ura8 byl transformován *SAT1*-expresním vektorem pADL-SAT1 za vzniku AH22/tH3ura8/pADL-SAT1. Tento kombinovaný kmen byl kultivován po dobu 7 dnů v VMVIII. Steroly byly vyextra-

hovány (viz dříve) a analyzovány plynovou chromatografií. Byly získány následující hodnoty (viz Tab.4).

Tabulka 4

	Skvalen (% hmotn.)	Ergosterol (% hmotn.)
AH22/tH3ura8	1,602	3,798
AH22/tH3ura/pADL-SAT1	1,049	5,540

Procentuální údaje jsou vztaženy na sušinu kvasinek.

Příklad 3.2

Kvasinkové kultury byly kultivovány po dobu 7 dnů v WMVIII, ke kulturám však byla přidávána různá množství uracilu. Množství uracilu v mediu bylo nastaveno na 10, 20, 40 a 100 µg/ml. Množství ergosterolu a skvalenu bylo maximální při suplementaci 20 µg/ml uracilu. Výsledky jsou uvedeny v obr. 4. Z výsledků vyplývá, že výtěžky ergosterolu a skvalenu v kmeni AH22/tH3ura/pADL-SAT1 byly značně závislé na množství uracilu přidaného do media WMVIII.

Příklad 3.3

Kvasinkové kultury byly kultivovány po dobu 7 dnů v WMVIII. Potom bylo postupem uvedeným dříve stanoveno celkové množství sterolů. Volné steroly byly extrahovány n-hexanem z kvasinek rozrušených pomocí skleněných perel.

Výsledky jsou uvedeny v Tab.5.

Z těchto výsledků vyplývá, že enzym sterol-acyl-transferasa (Sat1) způsobuje vysoce efektivní reesterifikaci především u těch sterolů, které nemají 4,4-dimethylskupinu. To znamená, že tento postup by bylo možno použít pro oddělování 4,4-dimethylsterolů od jejich příslušných demethylovaných forem.

Tabulka 5

Procentuální podíl volných sterolů. Každý sterol byl stanovován jako volný sterol (bez zmýdelnění) a tato hodnota byla vztažena na celkové množství tohoto sterolu V závorkách jsou uvedeny příslušné absolutní hodnoty celkového obsahu sterolů vztažené na plochu/g sušiny. Lanosterol a 4,4-dimethylzymosterol jsou steroly obsahující 4,4-dimethylskupinu.

	% volných sterolů	
	Kontrola	AH22/tH3ura/pADL-SAT1
Lanosterol	54 (0,99)	59 (2,90)
4,4-dimethylzymosterol	58 (0,77)	84 (2,37)
4-methylzymosterol	7 (2,43)	10 (7,62)
zymosterol	10 (1,67)	11 (5,85)
ergost-7-enol, ergosta-5,7-dienol	24 (4,55)	12 (9,00)

Vysvětlení obrázků na výkresech

V obr. 1 je zobrazen plasmid YEpH2 s příslušnými místy rozhraní.

V obr. 2 je zobrazen plasmid YDpUHK3 s příslušnými místy rozhraní.

25.04.00

V obr. 3 je zobrazen plasmid pADL-SAT1 s příslušnými místy rozhraní.

V obr. 4 je zachyceno chování při kultivaci a obsahy ergosterolu a skvalenu při různém dávkování uracilu. V tomto obrázku znamená:

OD =	optická hustota,
cultivation time =	doba kultivace,
yeast dry weight =	sušina kvasinek,
uracil supplementation =	dávkování uracilu.

PŘEHLED SEKVENCÍ

(1) VŠEOBECNÉ INFORMACE

(i) ŽADATEL:

(A)	NÁZEV:	Schering AG
(B)	ULICE:	Müllerstrasse 178
(C)	MĚSTO:	Berlín
(E)	ZEMĚ:	Německo
(F)	PSČ:	D-13342
(G)	TELEFON:	(030)-4681 2085
(H)	FAX:	(030)-4681 2058

(ii) NÁZEV VYNÁLEZU:

26.04.00

POSTUP VÝROBY ERGOSTEROLU A JEHO MEZIPRODUKTŮ
POMOCÍ REKOMBINANTNÍCH KVASINEK

(iii) POČET SEKVENCÍ: 4

(iv) FORMA ZPRACOVATELNÁ NA POČÍTAČI:

- (A) TYP MEDIA: disketa
- (B) POČÍTAČ: IBM PC kompatibilní
- (C) OPERAČNÍ SYSTÉM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: Patentin Release # 1.0,
Verze # 1.25 (EPO)

(2) INFORMACE PRO SEKV. ID Č.1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 25 bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) USPOŘÁDÁNÍ ŘETĚZCŮ
(strandedness): jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) HYPOTETICKÁ SEKVENCE (HYPOTHETICAL): ne

(iii) POPIS SEKVENCE: SEKV. ID Č.1:

5' - ACTATGGACCAATTGGTGAAAAC TG

(2) INFORMACE PRO SEKV. ID Č.2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 23 bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) USPOŘÁDÁNÍ ŘETĚZCŮ: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) HYPOTETICKÁ SEKVENCE: ne

(iii) POPIS SEKVENCE: SEKV. ID Č.2:

5' - AGTCACATGGTGCTGTTGTGCTT

(2) INFORMACE PRO SEKV. ID Č.3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 25 bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) USPOŘÁDÁNÍ ŘETĚZCŮ: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) HYPOTETICKÁ SEKVENCE: ne

(iii) POPIS SEKVENCE: SEKV. ID Č.3:

5' - GAATTCAACCATGGACAAGAAGAAG

(2) INFORMACE PRO SEKV. ID Č.4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 24 bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) USPOŘÁDÁNÍ ŘETĚZCŮ: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) HYPOTETICKÁ SEKVENCE: ne

(iii) POPIS SEKVENCE: SEKV. ID Č.4:

5' - AGAATTCCACAGAACAGTTGCAGG

Přehled citované literatury

Basson, M.E., Thorsness, M., Finer-Moore, J., Stroud, R.M., Rine, J. (1988) Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis. Mol. Cell. Biol. 8: 3793-3808.

Bennetzen, J. L., Hall, B. D. (1982) The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase. J. Biol. Chem. 257: 3018-3025.

Berben, G., Dumont, J., Gilliquet, V., Bolle, P. A., Hilger, F. (1991) The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 7: 475-477.

Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., Fink, G. (1987) 5-Fluorootic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. Methods in Enzymology 154: 164-175.

Fegueur, M., Richard, L., Charles, A.D., Karst, F. (1991) isolation and primary structure of the ERG9 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding squalene synthetase. Current Genetics 20: 365-372.

Fischhoff, D. A., Waterston, R. H., Olson, M. V. (1984) The yeast cloning vector YEp13 contains a tRNA^{Leu3} gene that can mutate to an amber suppressor. Gene 27: 239-251.

Jandrositz, A., Turnowsky, F., Högenauer, G. (1991) The gene encoding squalen epoxidase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. Gene 107: 155-160.

Mezei, L. M., Storts, D. R. (1994) in: PCR technology: current innovations, Griffin, H. G. and Griffin, A. M., eds. CRC Press, Boca Raton, 21.

Mortimer, R. K., Johnston, J. R. (1986) Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. Genetics 113: 35-43.

Lang C., Looman A.C. (1995) Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44: 147-156.

Parks LW, Bottema CDK, Rodriguez RJ, Lewis TA (1985) Yeast sterols: yeast mutants as tools for the study of sterol metabolism. Meth. Enzymol. 111: 333-346.

Qureshi, N., Nimmannit, S., Porter, J. W. (1981) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from Yeast. Meth. Enzymol. 71: 455-461.

Ruohonen, L., Aalto, M.K., Keranen, S. (1995) Modifications to the ADH1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of heterologous proteins. Journal of Biotechnology 39: 193-203.

Siduh, R. S., Bollon, A. P. (1990) Bacterial plasmid pBR322 sequences serve as upstream activating sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 6: 221-229.

Tschumper, G., Carbon, J. (1980) Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and the TRP1

gene. Gene 10: 157-166.

Webster, T. D., Dickson, R. C. (1983) Direct selection of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the antiobiotic G418 following transformation with a DNA vector carrying the kanamycin-resistance gene of Tn903. Gene 26: 243-252.

Yang, H., Bard, M., Bruner, D. A., Gleeson, A., Deckelbaum, R. J., Aljinovic, G., Pohl, T. M., Rothstein, R., Sturley, S. L. (1996) Sterol esterification in yeast: a two-gene process. Science 272: 1353-1356.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. Gene 33 (1985) 103-119.

Yu, C., Rothblatt, J.A. Cloning and characterisation of the *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA:sterol acyltransferase (1996), The Journal of Biological Chemistry, 271: 24157-24163.

28.04.00

PV 2070-1165

30944

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby ergosterolu a jeho meziproduktů,
v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e

a) se nejprve provede konstrukce plasmidu, do něhož se
vkládá několik genů vhodných pro látkovou přeměnu
ergosterolu

nebo

b) se nejprve provede konstrukce plasmidu, do něhož se
vkládá vždy jeden z genů vhodných pro látkovou přeměnu
ergosterolu,

c) takto připraveným plasmidem se transformují mikroorga-
nismy, přičemž se tyto mikroorganismy transformují
jedním plasmidem podle a) nebo několika plasmidy podle
b) současně nebo postupně,

d) s takto připravenými mikroorganismy se provede fermen-
tace na ergosterol,

e) po provedené fermentaci se ergosterol a jeho mezipro-
dukty z buněk extrahují a analyzují a konečně

f) takto získaný ergosterol a jeho meziprodukty se čistí
a izolují pomocí sloupcové chromatografie.

2. Způsob podle nároku 1,

25.04.00

v y z n a č u j í c í s e t í m , že

a-i) se nejprve provede konstrukce plasmidu, do něhož se vkládají následující geny:

- i) gen HMG-CoA-reduktasy (t-HMG),
- ii) gen skvalensynthetasy (ERG9)
- iii) gen acyl-CoA:sterol-acyltransferasy (SAT1) a
- iv) gen skvalenepoxidasy (ERG1),

nebo

a-ii) se nejprve provede konstrukce plasmidu, do něhož se vkládají následující geny:

- i) gen HMG-CoA-reduktasy (t-HMG),

a

- ii) gen skvalensynthetasy (ERG9),

nebo

a-iii) se nejprve provede konstrukce plasmidu, do něhož se vkládají následující geny:

- i) gen HMG-CoA-reduktasy (t-HMG)

a

- iii) gen acyl-CoA:sterol-acyltransferasy (SAT1),

nebo

a-iv) se nejprve provede konstrukce plasmidu, do něhož se vkládají následující geny:

i) gen HMG-CoA-reduktasy (t-HMG)

a

iv) gen skvalenepoxidasy (ERG1),

nebo

a-v) se nejprve provede konstrukce plasmidu, do něhož se vkládají následující geny:

ii) gen skvalensynthetasy (ERG9)

a

iii) gen acyl-CoA:sterol-acyltransferasy (SAT1)

nebo

a-vi) se nejprve provede konstrukce plasmidu, do něhož se vkládají následující geny:

ii) gen skvalensynthetasy (ERG9)

a

iv) gen skvalenepoxidasy (ERG1),

nebo

26.04.00

a-vii) se nejprve provede konstrukce plasmidu, do něhož se vkládají následující geny:

iii) gen acyl-CoA:sterol-acyltransferasy (SAT1)

a

iv) gen skvalenepoxidasy (ERG1),

nebo

b) se nejprve provede konstrukce plasmidu, do něhož se vkládá vždy jeden z genů uvedených pod a-i,

a

c) pomocí takto připravených plasmidů se transformují mikroorganismy, přičemž tyto mikroorganismy se transformují jedním plasmidem uvedeným pod a-i) až a-vii) nebo několika plasmidy uvedenými pod b) současně nebo postupně,

d) s takto získanými mikroorganismy se provede fermentace na ergosterol,

e) po provedené fermentaci se ergosterol a jeho meziprodukty vyextrahují z buněk a analyzují a konečně

f) takto získaný ergosterol a jeho meziprodukty se čistí a izolují pomocí sloupcové chromatografie.

3. Způsob podle nároku 2 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se do plasmidu pod
a-ii), a-iii) a a-v) navíc vkládá gen skvalenepoxidasy
(ERG1) a do plasmidu a-ii) se vkládá navíc gen
acyl-CoA:sterol-acyl-transferasy.
4. Způsob výroby ergosterolu a jeho meziproduktů,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že geny s plasmidy,
uvedené v nároku 1 pod a), v nároku 2 pod a-i) až a-vii)
a v nároku 3 pod a-ii), a-iii) a a-v) , se nejprve nezávisle
na sobě zavedou do mikroorganismů stejného druhu a spolu
s nimi se provede fermentace na ergosterol a takto získaný
ergosterol se z buněk extrahuje, analyzuje, čistí a izoluje
pomocí sloupcové chromatografie.
5. Způsob podle nároků 1 až 4 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že meziprodukty jsou
skvalen, farnesol, geraniol, lanosterol, zymosterol,
4,4-dimethylzymosterol, 4-methylzymosterol, ergost-7-enol
a ergosta-5,7-dienol.
6. Způsob podle nároků 1 až 4 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že meziprodukty jsou
steroly s 5,7-dienovou strukturou.
7. Způsob podle nároků 1 až 4 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že plasmidy jsou
YEpH2 (obr. 1), YDpUHK3 (obr. 2) a pADL-SAT1 (obr. 3).
8. Způsob podle nároků 1 až 4 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že mikroorganismy jsou
kvasinky.

9. Způsob podle nároku 8 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že použitým druhem
jsou *S.cerevisiae*.
10. Způsob podle nároku 9 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že použitým kmenem je
S.cerevisiae AH22.
11. Kmen kvasinek *S.cerevisiae* AH22, obsahující jeden nebo
více genů uvedených ve způsobu pod a-i).
12. Plasmid pADL-SAT1 (obr. 3), skládající se z genu SAT1
a z genu LEU2 z YEp13.
13. Použití plasmidu podle nároku 12 pro výrobu
ergosterolu.
14. Použití plasmidu podle nároku 12 pro výrobu mezipro-
duktů při výrobě ergosterolu, kterými jsou skvalen,
farnesol, geraniol, lanosterol, zymosterol,
4,4-dimethylzymosterol, 4-methylzymosterol, ergost-7-enol,
a ergosta-5,7-dienol.
15. Použití plasmidu podle nároku 12 pro výrobu sterolů
s 5-7-dienovou strukturou.
16. Expresní kazety zahrnující střední ADH-promotor,
t-HMG-gen a TRP-terminátor a SAT1-gen se středním
ADH-promotorem a TRP-terminátorem.
17. Expresní kazety zahrnující střední ADH-promotor,
t-HMG-gen, TRP-terminátor, SAT1-gen se středním ADH-pro-
motorem a TRP-terminátorem a ERG9-gen se středním

ADH-promotorem a TRP-terminátorem.

18. Kombinace expresních kazet, přičemž tuto kombinaci tvoří

- a) první kazeta, na níž je lokalizován ADH-promotor, t-HMG-gen a TRP-terminátor
- b) druhá expresní kazeta, na níž je lokalizován ADH-promotor, SAT1-gen a TRP-terminátor
- a
- c) třetí expresní kazeta, na níž je lokalizován ADH-promotor, ERG9-gen s TRP-terminátorem.

19. Použití expresních kazet podle nároků 16 až 18 pro transformaci mikroorganismů, použitých pro fermentaci na ergosterol.

20. Použití podle nároku 19 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že mikroorganismem
jsou kvasinky.

21. Mikroorganismy obsahující expresní kazety podle nároků
16 až 18.

22. Mikroorganismus podle nároku 21 ,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se jedná
o kvasinky.

23. Použití mikroorganismu podle nároků 21 a 22 pro fer-

26.04.00

mentaci na ergosterol.

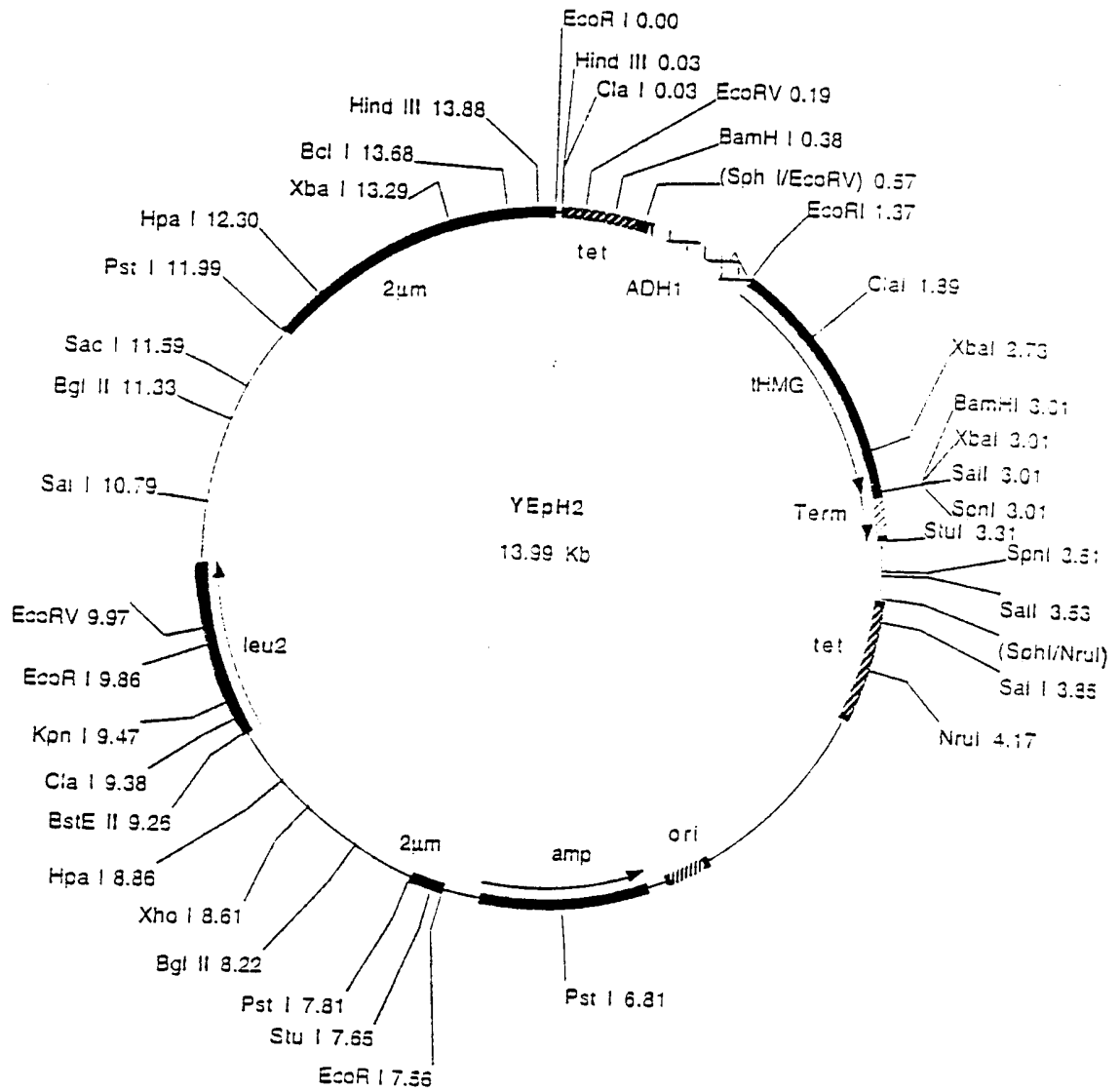
24. Použití mikroorganismu podle nároků 21 a 22 pro fermentaci na meziprodukty ergosterolu.

28.04.00

PU 1010-1165

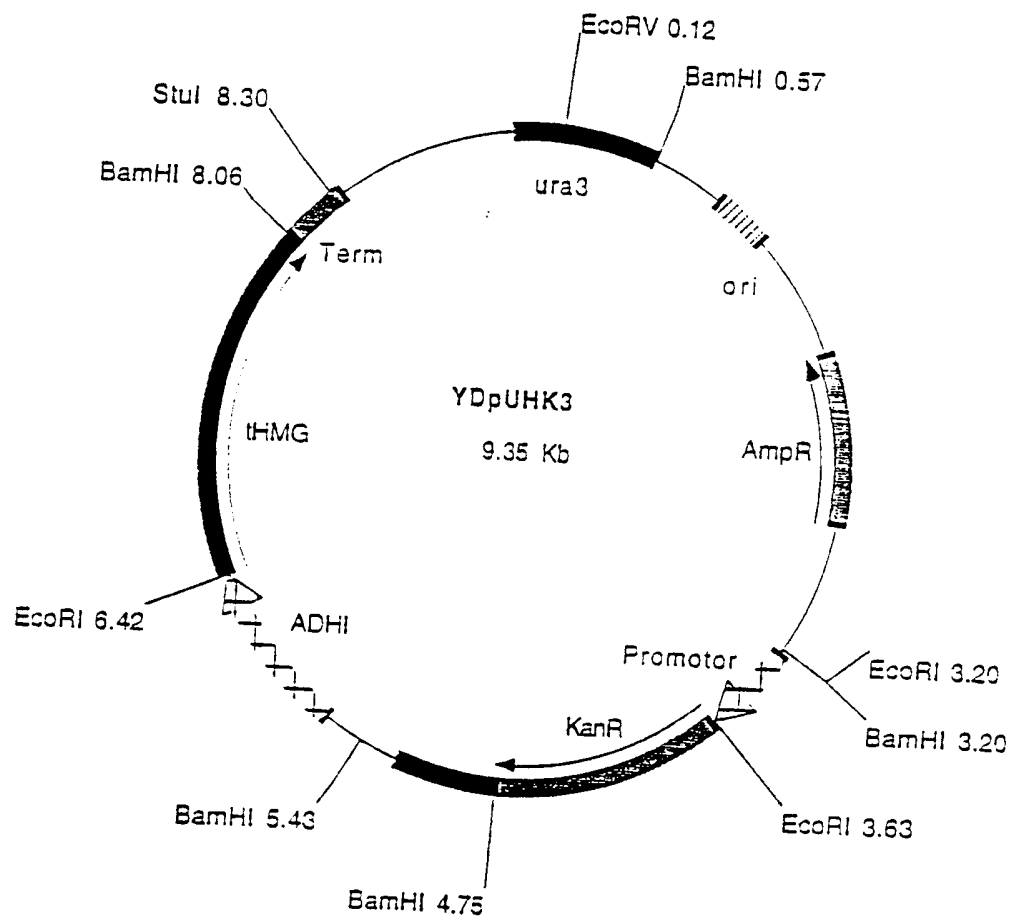
30944

obr. 1

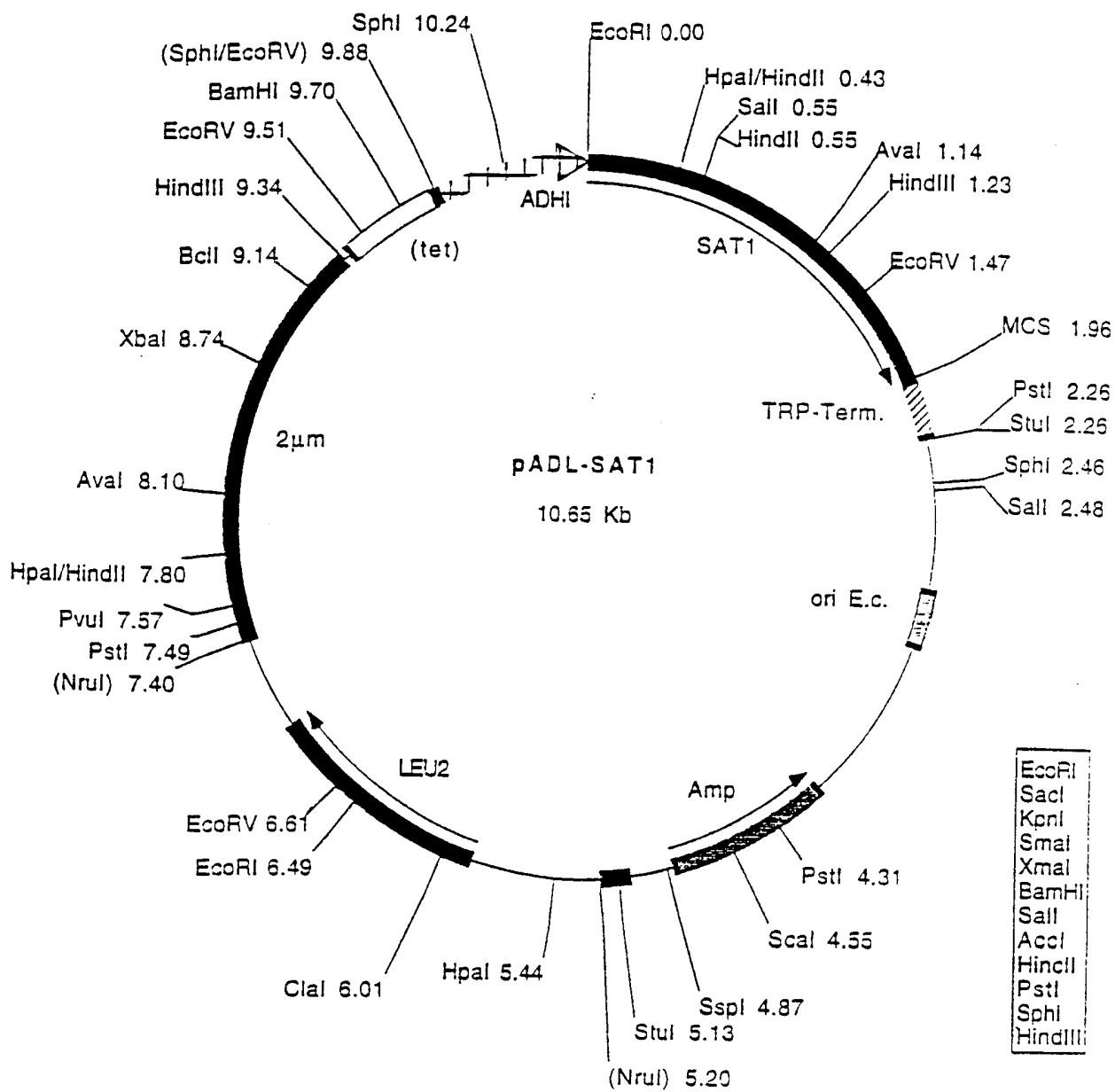


26.04.00

obr. 2



28.04.00



obr. 3

26.04.00

obr. 4

