



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: 7400/90
(22) A bejelentés napja: 1990. 09. 20.
(30) Elsőbbségi adatok:
07/409,769 1989. 09. 20. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 90/05369
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 91/04263

(40) A közzététel napja: 1992. 03. 30.
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1998. 12. 28.

(11) Lajstromszám:

215 148 B

(51) Int. Cl.⁶

C 12 N 15/52

C 12 P 13/22

(72) Feltalálók:

Fotheringham, Ian, Wheeling, Illinois (US)

Nelms, Jennifer, Des Plaines, Illinois (US)

(73) Szabadalmas:

The NutraSweet Co., Deerfield, Illinois (US)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54) **Eljárás fenilalaninnal kiváltott visszacsatolósos gátlással szembeni
rezisztenciát elősegítő anyagok előállítására**

KIVONAT

A találmány tárgya az E. coli által termelt korizmát mutáz/prefenát dehidrogenáz (CMPD) enzim deléciós, szubsztitúciós és/vagy addíciós analógjait kódoló DNS szekvenciák. Az előnyös expressziós termékek közé tartoznak a [dez-Gln³⁰⁷, dez-Ala³⁰⁸, dez-Gly³⁰⁹,

dez-Ala³¹⁰]CMPD; [Leu³⁰⁶]CMPD; [dez-Thr³⁰⁴, Lys³⁰⁵, dez-Gln³⁰⁶]CMPD; és [Cys³⁰⁹]CMPD. A fenti analógok a vad típusú enziméhez hasonló enzimaktivitással bírnak, de fenilalanin jelenlétében annak gátló hatása iránt jóval ellenállóbbak.

A találmány tárgya általában fenilalanin mikrobiológiai szintézise, közelebből az *E. coli* enzimjével, a korizmát mutáz/prefenát dehidrogenáz (CMPD) analóg polipeptideket kódoló új DNS szekvenciák. A vad típusú enzimmel összehasonlítva az analógok enzimaktivitása jóval ellenállóbb fenilalaninnal kiváltott visszacsatolási gátlás iránt. Az analógot kódoló DNS szekvenciák ezért hasznosak a fenilalanin termelésére alkalmazott mikroorganizmus enzimjellemzőinek kiegészítésére.

Az L-fenilalaninnak *E. coli*-ban való mikrobiológiai termelésében számos metabolikus enzim vesz részt. Ezek legfontosabbjai közé tartozik egy bifunkciós enzim, a korizmát mutáz/prefenát dehidrogenáz (CMPD), amely mind korizmának prefenáttá, mind prefenátnak fenil-piruváttá való átalakításában részt vesz. A CMPD-ről megállapították, hogy az az *E. coli* pheA génjének expressziós terméke, nukleotid szekvenciáját Hudson és munkatársai [J. Mol. Biol., 180: 1023–1051 (1984)] írták le.

A CMPD-ről feltételezik, hogy enzimeként dimer formában működik, amely dimer a pheA gén expressziójának két azonos polipeptid termékét foglalja magában. Az enzim aktivitását a metabolikus út végterméke, az L-fenilalanin által kiváltott „visszacsatolási gátlás” befolyásolja. Ha a fenilalanin-szint megközelíti például az 1,0 mmol/l értéket, a prefenát dehidrogenáz aktivitásában rendkívüli csökkenés következik be, ami valószínűleg annak a következménye, hogy a fenilalanin részt vesz az enzimesen inaktív CMPD polipeptid tetramerek reverzibilis képződésében [lásd a Baldwin és munkatársai, Arch. Biochem. Biophys., 211: 66–75 (1981) szakirodalmi helyen]. Mintegy 1,0 mmol/l fenilalanin-koncentrációnál a prefenát dehidrogenáz aktivitása legalább 90%-kal csökken.

A klónozás és a génexpresszió rekombináns technológiáinak alkalmazásbavétele után kísérleteket tettek a fenilalanin-termelésben alkalmazott *E. coli* gazdasejtek endogén CMPD kapacitásának fokozására [Forberg és munkatársai, J. Biotech., 7: 319–332 (1988); Choi és munkatársai, Biotechnol. Lett., 8: 223–228 (1982); Hwang és munkatársai, Appl. Microbiol. Biotechnol., 22:108–113 (1985); Gil és munkatársai, Enzyme Microb. Technol., 7: 370–372 (1985); Park és munkatársai, Chem. Eng. Commun., 45: 185–196 (1986)].

Azt ismertették, hogy *E. coli* mutáns törzsek CMPD enzimtermelése lényegében független a visszacsatolási fenilalanin gátlástól (lásd például a 72 727/81 számú közzétett ausztrál szabadalmi bejelentésben).

Backmann és munkatársai a 4 753 883 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben gazdasejteknek CMPD analóg polipeptideket kódoló olyan DNS szekvenciákkal képzett „mutánsait” ismertetik, amelyek kevésbé érzékenyek a fenilalaninnal való gátlásra annak alapján, hogy „...az *E. coli* CMPD katalitikusan kritikus szegmense az N-terminális 337 aminosavban jelölhető meg, a fenilalanin-visszacsatolási érzékenység egyetlenegy aminosavon, a 338-as triptofanon múlik, és hogy a teljes 49 C-terminális aminosavak deléciója nem rontja le a katalitikus aktivitást, de lényegesen csökkenti a visszacsatolási érzékenysé-

get”. Backmann és munkatársai olyan plazmid vektorok kifejlesztését javasolják, amelyek a CMPD Trp³³⁸ deléciót, valamint szubsztitúciós analógokat, köztük a Trp³³⁸-t kódoló DNS szekvenciát tartalmazznak, valamint javasolják az ilyen plazmid vektoroknak fenilalanin-termelésre szolgáló mikrobiális gazdaszervezetek transzformálására való alkalmazását.

A találmány tárgya *E. coli* CMPD analóg polipeptideket kódoló új DNS szekvenciák, amelyeknek prefenát dehidrogenáz és/vagy korizmát mutáz enzimaktivitása kevésbé érzékeny fenilalanin jelenlétében bekövetkező gátlásra, mint a vad típusú *E. coli* CMPD enzimé. A találmány tárgyát képezik továbbá az ezen szekvenciák által kódolt polipeptidek. A találmány szerinti DNS szekvenciák magukban foglalnak olyan szekvenciákat, amelyek az *E. coli* CMPD 301–315 egységeit, előnyösen 304–310 egységeit érintő deléciós, szubsztitúciós és/vagy addíciós analógokat kódolnak. A jelenleg előnyösnek tartott analógekódoló szekvencia a következő polipeptideket határozza meg, ahol, és a továbbiakban is, a „dez” jelölés a vele együtt jelölt egység delécióját vagy hiányát jelöli: [dez-Gln³⁰⁷, dez-Ala³⁰⁸, dez-Gly³⁰⁹, dez-Ala³¹⁰]CMPD; [Leu³⁰⁶]CMPD; [dez-Thr³⁰⁴, Lys³⁰⁵, dez-Gln³⁰⁶]CMPD; és [Cys³⁰⁹]CMPD. A fenti analógekódoló DNS szekvenciák mindegyikének expressziós terméke mind prefenát dehidrogenáz, mind korizmát mutáz aktivitással bír, de a két enzimaktivitás közül egyik, vagy mindkettő kevésbé érzékeny fenilalanin jelenlétében bekövetkező gátlásra. A prefenát dehidrogenáz-aktivitás 100 mmol/l koncentrációjú fenilalanin jelenlétében bekövetkező gátlása iránti ellenállás szempontjából előnyös a [dez-Thr³⁰⁴, Lys³⁰⁵, dez-Gln³⁰⁶]CMPD-t kódoló DNS szekvencia expressziós terméke. A korizmát mutáz aktivitásgátlása iránti ellenállás szempontjából előnyös a [Cys³⁰⁹]CMPD.

A találmány tárgyát képezik továbbá olyan autonóm replikációra képes DNS expressziós vektorok, amelyek a találmány szerinti DNS szekvenciát tartalmazzák operatíván összekapcsolva olyan expressziót szabályozó DNS szekvenciákkal (promoterekkel, operátorokkal és hasonlók), amelyek megkönnyítik a kívánt CMPD analóg polipeptidek ezekkel transzformált kiválasztott gazdasejtben, például *E. coli*-ban való expresszióját (transzkripcióját és transzlációját). Az előnyös expressziós vektorok egy szelektálható marker gént tartalmaznak a gazdasejt transzformációjáról való bizonyosság szerzése érdekében, tartalmaznak továbbá egy promotert, amely az EcoRI és HaeII helyek között az 1. példában bemutatott módon módosított expressziós szabályozó DNS szekvenciát tartalmaz, és a vad típusú *E. coli* CMPD enzim endogén expressziójával operatíván kapcsolatos promoterből származik (például az *E. coli* pheA gén expressziós kontrollszekvenciája).

Bár a találmány szerinti *E. coli* CMPD analógot kódoló DNS szekvencia-prototípusokat kémiai mutációval hoztuk létre vad típusú *E. coli* pheA gén vektorba való beépítésével, a találmány körébe tartozik a találmány szerinti DNS szekvenciáknak helyspecifikus mutagenézissel (amelyet például egy vad típusú pheA

gében hajtunk végre) való létrehozása, valamint a CMPD polipeptidet kódoló szekvencia egy részének vagy egészének kémiai szintézissel való előállítása.

A CMPD deléciós analógokat kódoló találmány szerinti DNS szekvenciákból hiányoznak az 1–15. kodonok, amelyek a vad típusú enzim aminosav-szekvenciájában a 301–315. helyzeteket áthidaló aminosav-egységeket határozzák meg. A deléciók lehetnek folyamatosak vagy megszakítottak, előnyösen a 304–310. aminosavakat kódoló bázispárok területére terjednek ki. A szubsztitúciós analógokat kódoló találmány szerinti DNS szekvenciák közé tartoznak azok, amelyekben a CMPD aminosav-szekvenciájának 301–315. helyzetű egységei, előnyösen 304–310. helyzetű egységei közül egyet vagy többet meghatározó kodonok 1–3 bázispárja oly módon van kicserélve, hogy abban a helyzetben, ahol a változás történt, olyan aminosav expresszióját teszi lehetővé, amely a vad típusú enzim megfelelő aminosavjától eltérő. Az addíciós analógokat kódoló DNS szekvenciák ennek megfelelően olyan kiegészítő kodonokat tartalmaznak, amelyek az enzim előzőekben megjelölt tartományában további egységek kifejeződését kódolják. Jelenleg előnyösnek tartjuk azokat a DNS szekvenciákat, amelyek deléciós analóg polipeptideket, szubsztitúciós analóg polipeptideket, és olyan polipeptideket kódolnak, amelyek a vad típusú CMPD aminosav-szekvenciájához viszonyítva mind deléciót, mind szubsztitúciót tartalmaznak. A találmány körén belül értjük azt az esetet is, amikor az előzőekben említett módosításokat más olyan ismert vagy később kifejlesztendő DNS szekvenciamódosításokkal „kombinálják”, amelyek megnövekedett korizmat mutáz és/vagy pre-fenát dehidrogenáz-aktivitással bíró, vagy fenilalanin-visszacsatolós gátlás iránt megnövekedett ellenállással rendelkező CMPD polipeptidek expresszióját teszik lehetővé.

A találmány szerinti DNS szekvenciák hasznossága akkor nyilvánul meg, ha ezeket megfelelő *E. coli* gazdaszervezetbe transzformáljuk (vektor segítségével vagy kromoszomális beültetéses eljárással), hogy ezáltal a sejt fenilalanin-szintézisre vonatkozó kapacitását megnöveljük.

A találmány további szempontjai és előnyei a következő részletes leírásból válnak nyilvánvalóvá, amely leírásban a találmány előnyös megvalósítási módját mutatjuk be.

Az ábrán pheA DNS-t tartalmazó pJN302 plazmid restrikciós térképét mutatjuk be.

```

EcoRI                               -35                               -10
GAATTCCTTTTGTGACACGCGTGAAAACA GTACGGGTATAATACTAAA

S.D.      start                               HaeII
GTCACAAAAGGCAACTATGACATCGGA AAACCCGTTA CTGGCGCT

```

A terminális restrikciós helyeket aláhúzással jelöltük, ugyancsak aláhúztuk a promoter és a riboszómakötő hely –35 és –10 régióit (S. D., amelyet az ATG

A következő példák a jelenleg előnyösnek tartott találmány szerinti DNS szekvenciák kifejlesztését mutatják be. Közelebbről, az 1. példa analógot kódoló DNS szekvencia kémiai mutációval való létrehozását mutatja be, a 2. példa a fenilalanin-visszacsatolós gátlás vizsgálatának eredményeire vonatkozik, a 3. példában az 1. példa szerint kifejlesztett DNS szekvencián végrehajtott szekvenciaanalízist mutatjuk be.

1. példa

Kémiai mutációt hajtunk végre a pJN302 plazmidon. A pJN302 plazmid az *E. coli* K12 pheA génjét tartalmazó EcoRI-BamHI inzertet hordozó pLG338 vektort tartalmazza. A pheA gén módosított, a módosítás abban áll, hogy hiányzik belőle a promoterral kapcsolatos reguláló szekvencia, és bele van építve a kódoló szekvenciától a 3' terminális irányában egy BamHI hely. A pheA gén a vad típusú CMPD-t kódolja.

A pheA gén *E. coli* K12 kromoszómából izolálható egy 6,3 kb EcoRI-BamHI fragmenszen, amint azt Edwards és munkatársai a WO 87/00202 közzétételi számú PCT bejelentésben leírják (amelyet leírásunkba referenciaként építünk be), valamint amint azt Hudson és munkatársai [J. Mol. Biol., 180: 1023–1051 (1984)] ismertetik. A pheA gén és a leágazó régiók nukleotid-szekvenciájának meghatározását követően egy BamHI restrikciós hely vihető be közvetlenül a géntől a 3' terminális irányában, oly módon, hogy a GGATCC szekvenciától a GGATCC szekvenciáig terjedő gént helyspecifikus mutációval átalakítjuk, amint azt Edwards és munkatársai a WO 87/00202 számon közzétett európai szabadalmi bejelentésben leírják. Ez a szekvencia a pheA gén TGA stop kodonját követő 7. nukleotidnál kezdődik, amint az az alábbiakban látható:

```

Val Asp Pro Thr Stop      BamHI
GTT GAT CGA ACC TGA TGA AAAGGATCCGGATG

```

A pheA gén promoter régiója a promoter és attenuátor szekvenciák olyan szintetikus promoterral való helyettesítésével deregulálható, amely a természetes promoteren alapszik, de amelyből hiányzik a Pribnow-szekvenciát átlapoló kettős szimmetria (–10). Ez a helyettesítés végrehajtható az EcoRI helytől az 5' irányban és a természetes pheA gén N-terminálisában lévő HaeII hely között. A szintetikus helyettesítő tartomány nukleotidszekvenciája a következő lehet:

start kodon követ). A pheA gén az Edwards és munkatársai által leírt konstrukciókból izolálható BamHI és EcoRI hasítással az EcoRI helytől 5' irányban, és a

BamHI helytől 3' irányban, és az EcoRI/BamHI EcoRI- és BamHI-val hasított pLG338-ba klónozzható [Stoker és munkatársai, *Gene*, 18: 335–341 (1982)], így hozható létre a pJN302, amelynek restrikciós térképét az ábrán mutatjuk be. A pLG338 számos laboratóriumból, köztük Stoker és munkatársai laboratóriumából könnyen beszerezhető.

Mintegy 2 µg pJN302 DNS-t 200 µl 50 mmol/l-es pH=4,6-os nátrium-acetátot, 88 mmol/l nátrium-nitritet és 0,25 mmol/l spermint tartalmazó reakcióelegybe viszunk. Az elegyet 30 °C hőmérsékleten inkubáljuk, és 30 perc elteltével 60 µl mintát veszünk belőle. A mintát 30 µl 1 mol/l-es pH=8-as triszbe visszük. Az elegyhez 4,5 µl 4 mol/l-es nátrium-kloridot és 300 µl etanolt adunk. Ezután a DNS-t –20 °C hőmérsékleten 4 órán át való tárolással kicsapjuk, majd Eppendorf mikrocentrifugában való centrifugálással elkülönítjük. 60 perc elteltével a fenti elegyből újabb 70 µl mintát veszünk, és ehhez 35 µl 1 mol/l-es pH=8-as triszt adunk. Az elegyhez 5,25 µl 4 mol/l-es nátrium-kloridot és 350 µl etanolt adunk. A DNS-t kicsapjuk, és az előzőek szerint kinyerjük. A megmaradó 70 µl reakcióelegyet összesen 90 perc inkubálás után a 60 perces inkubálás után vett mintával pontosan azonos módon kezeljük.

A DNS csapadékokat 10 µl vízben szuszpendáljuk, és a szuszpenzióból 3–3 µl-t használunk a HW1012 (*pheA*) baktériumtörzs kompetens sejtjeinek transzformálására. A transzformánsokat 40 µg/ml kanamicint tartalmazó LB lemezekon izoláljuk. Lemezenként mintegy 200–400 transzformánszt nyerünk. Minden telepet belegyűjtünk egy összesen 1,5 ml-es L-táplébe. A sejteket mossuk, és 1:5 arányban sóoldatban hígítjuk. Ez után azokat a sejteket szelektáljuk, amelyek a β-2-tienil-alanin vagy a 3-fluor-tirozin toxikus aminosav-analógokat tartalmazó lemezekon szaporodásra képesek. A mosott sejtekből 100 µl-es alikvot részeket szélesztünk az alábbi tápközegeken:

1. M9 minimál tápközeget, 0,5% glükózt, 40 µg/ml kanamicin és 10 mmol/l β-2-tienil-alanin (az L-fenilalanin egy toxikus analógja).

2. M9 minimál tápközeget, 0,5% glükózt, 40 µg/ml kanamicin és 20 mmol/l β-2-tienil-alanin.

3. M9 minimál tápközeget, 0,5% glükózt, 40 µg/ml kanamicin és 1 mmol/l 3-fluor-tirozin.

A 10 mmol/l β-2-tienil-alanint tartalmazó lemezen néhány ezer telep fejlődött ki. Ezek közül néhányat megvizsgáltunk, ezek alacsony rezisztenciát mutattak visszacsatolási gátlással szemben. Ezért ezeket a telepeket nem vizsgáltuk tovább. A 3-fluor-tirozint tartalmazó lemezen 20 telep nőtt ki. Ezek közül négyet megvizsgáltunk, ezek ugyancsak alacsony rezisztenciát mutattak visszacsatolási gátlással szemben. Ezeket a telepeket sem vizsgáltuk tovább. A 20 mmol/l β-2-tienil-alanint tartalmazó lemezen négy telep nőtt ki. Ezek mindegyike igen magas rezisztenciát mutatott L-fenilalaninnal kiváltott visszacsatolási gátlással szemben. Ezek mindegyikéből izoláltuk a plazmid DNS-t, és ezt friss kompetens HW1012 sejtek retranszformálására alkalmaztuk.

A négy telep bármelyikéből retranszformált plazmidokat tartalmazó sejtek szaporodásra képesek, ha

M9 minimál tápközeget, 0,5% glükózt, 40 µg/ml kanamicint és 20 mmol/l β-2-tienil-alanint tartalmazó lemezekre szélesztjük őket. A retranszformánsok ugyancsak olyan CMPD-t termeltek, amelyek rezisztenciája L-fenilalaninnal kiváltott visszacsatolási gátlásra az eredeti izolátumokénak megfelelő. Minden retranszformánsból izoláltuk a plazmid DNS-t, és a *pheA* génben bekövetkezett mutáció természetének meghatározására jellemeztük. A négy mutáns plazmid jelölése a következő: pJN305, pJN306, pJN307 és pJN308.

2. példa

A négy, mutációval létrehozott, plazmidban foglalt CMPD DNS szekvencia által kódolt várható CMPD analóg, fenilalaninnal kiváltott visszacsatolási gátlás elleni rezisztenciáját vizsgáltuk *pheA* gén expressziójának termékeként kapott vad típusú CMPD-hez hasonlítva, a következő módon.

Sejtkivonatok készítése

A CMPD vizsgálatokhoz szükséges enzim izolálására 25 ml-es térfogatban pJN302, pJN305, pJN306, pJN307 vagy pJN308 valamelyikét tartalmazó HW1012 sejteket szaporítunk mintegy 1,0 optikai sűrűségig 40 µg/ml kanamicint tartalmazó L folyékony tápközegekben. A sejteket centrifugálással kinyerjük, 10 ml 200 mmol/l-es pH=8-as triszszel mossuk, majd 1 ml 200 mmol/l-es pH=8-as triszben újra szuszpendáljuk. A sejteket francia nyomáskamrában lizáljuk. A lizátumot 15 percig 14 k fordulat/perc mellett centrifugáljuk, és a felülúszót vizsgálatra kinyerjük. A prefenát dehidratáz(PD)-vizsgálat céljára 50 µl felülúszót alkalmazunk, a korizmát mutáz (CM)-vizsgálatot 20 µl felülúszó alkalmazásával végzzük.

35 Prefenát dehidrogenáz(PD)-aktivitás vizsgálata

A PD-aktivitást 1,25 ml reakcióelegyben vizsgáljuk, amely reakcióelegy 27 mmol/l-es triszre nézve, pH=8, 1 mmol/l kálium-prefenátot, 50 µl vizsgálandó sejtkivonatot és az 1. táblázatban megjelölt különböző koncentrációjú L-fenilalanint tartalmaz. A reakciót a prefenát beadásával indítjuk meg. A reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten 1 percig inkubáljuk, ekkor 0,25 ml mintát veszünk az elegyből, és a mintát 0,75 ml 1 mol/l-es nátrium-hidroxiddal elegyítjük. A minta abszorpcióját 320 nm-nél mérjük, vakpróbaként vizet használva. További mintákat veszünk az elegyből 5 és 9 perc elteltével, a mintákat az 1 perc után vett mintával azonos módon kezeljük.

A 320 nm-nél mért abszorpció növekedési sebességét kiszámoljuk, és az extraktum jelenléte nélkül készített kontrollsebességgel korrigáljuk. A prefenát dehidrogenáz-aktivitás egységeként azt az enzimmennységet jelöljük meg, amely 1 perc alatt katalizálja 1,0 µmol prefenát fenil-piruváttá való alakulását a vizsgálati körülmények között, fenil-piruvátra 17 500 mol×l⁻¹×cm⁻¹ extinkciós koefficiens alkalmazva.

A prefenát dehidrogenáz-aktivitást az 1. táblázatban mutatjuk be egység/ml extraktumértékben és az L-fenilalanin hiányában meghatározott aktivitás százalékában megadva.

1. táblázat
 Prefenát dehidrogenáz-aktivitás egység/ml (megmaradt %)

Phe konc. mmol/l	Vad típusú pJN302		pJN305		pJN306		pJN307		pJN308	
0	0,61	(100%)	0,28	(100%)	0,39	(100%)	0,62	(100%)	0,34	(100%)
2	0,1	(16%)	0,33	(118%)	0,34	(87%)	0,68	(110%)	0,33	(97%)
10	0,035	(5,7%)	0,3	(107%)	0,4	(102%)	0,63	(102%)	0,32	(94%)
20	0,032	(5,2%)	0,27	(96%)	0,36	(92%)	0,66	(106%)	0,31	(91%)
50	0,029	(4,7%)	0,23	(82%)	0,22	(56%)	0,6	(97%)	0,28	(82%)
100	0,023	(3,8%)	0,24	(86%)	0,1	(26%)	0,57	(92%)	0,26	(76%)
200	0,026	(4,2%)	0,2	(71%)	0,076	(19%)	0,52	(84%)	0,26	(76%)

Korizmat mutázaktivitás vizsgálata

A korizmat mutáz(CM)-aktivitást 0,8 ml reakció-elegyben vizsgáljuk, amely 1 mmol/l korizmatot, 100 mmol/l pH=7,5-es triszt, 0,5 mmol/l EDTA-t, 0,01% BSA-t és 20 µl sejtextraktumot tartalmaz, ezenkívül a 2. táblázatban megadott változó koncentrációjú L-fenilalanint tartalmaz.

A reagáltatást a sejtextraktum beadásával indítjuk be. A reakcióelegyet 5 percig 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk, majd a reakciót 0,1 ml 4,5 mol/l-es hidrogén-klorid hozzáadásával leállítjuk. Az elegyet további 10 percig 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk minden prefenátnak fenil-piruváttá való átalakulására, majd ekkor 0,1 ml 12 mol/l-es nátrium-hidroxidot adunk az

elegyhez, majd abszorpcióját 320 nm-nél mérjük. Vak-próbaként olyan mintát alkalmazunk, amely nem tartalmaz sejt kivonatot, ezzel korrigáljuk a szubsztát abszorpcióját. A CM-aktivitás értékeit a gazdaszervezet CM/prefenát dehidrogenáz értékeivel is korrigáljuk. Minden vizsgálatot párhuzamosan végzünk, és a táblázatban az átlagértékeket adjuk meg. Egy egységen azt az enzim mennyiséget értjük, amely 1 perc alatt katalizálja 1,0 µmol korizmatnak a vizsgálati körülmények között történő átalakulását. Az extinkciós koefficiens a PD-vizsgálatra megadott.

A CM-aktivitást a 2. táblázatban adjuk meg egység/ml extraktumértékben, és az L-fenilalanin hiányában meghatározott aktivitás százalékában.

2. táblázat
 Korizmat mutázaktivitás egység/ml (megmaradt %)

Phe konc. mmol/l	Vad típusú pJN302		pJN305		pJN306		pJN307		pJN308	
0	0,944	(100%)	0,838	(100%)	0,878	(100%)	0,646	(100%)	0,555	(100%)
10	0,712	(75%)	0,924	(110%)	0,961	(109%)	0,722	(119%)	0,643	(116%)
50	0,741	(78%)	0,706	(84%)	0,546	(62%)	0,541	(84%)	0,455	(82%)
100	0,672	(71%)	0,649	(77%)	0,440	(50%)	0,409	(63%)	0,478	(86%)

Az 1. és 2. táblázatokból egyértelműen látható, hogy a vad típusú enzimnek mind a prefenát dehidrogenáz (PD), mind a korizmat mutáz(CM)-aktivitását gátolja az L-fenilalanin. Míg a PD-aktivitást alacsony szint (10 mmol/l) szinte teljesen gátolja, a CM-aktivitást még az olyan magas szint, mint a 100 mmol/l sem gátolja többen, mint mintegy 30%-kal. Ez az eredmény összhangban áll a fenilalanin mikrobiológiai fermentációs előállítás során végzett vizsgálati eredményekkel, amelyek a PD szubsztát, a prefenát lényeges felgyűlését mutatják, míg 50–100 mmol/l-es L-fenilalanin szintig lényegében nem következik be a CM szubsztát, a korizmat felgyűlése. Ennek megfelelően míg a CMPD analóg expressziós termékek PD-aktivitásgátlás iránti ellenállása meglehetősen határozott, a CM-aktivitásgátlás iránti rezisztencia nem nagy mértékű. Említésre méltó azonban, hogy az alacsony (10 mmol/l-es) fenil-

alanin-koncentráció az analógok CM-aktivitását kis mértékben mindig fokozza, amely eredményt a vad típusú enzim kapcsán korábban nem írtak le.

3. példa

A pJN305, pJN306, pJN307 és pJN308 plazmidok szubklónanalízise felfedte, hogy a plazmidok mind-egyikéből nyert 221 bázispárból álló AlwNI/NcoI restrikciós fragment (amely a vad típusú enzim CMPD 266–337 egységeinek megfelelő kodonokat öleli fel) helyettesíthette a pJN302 plazmid AlwNI-NcoI fragmentjét, és hogy a kapott plazmid lehetővé teszi a megfelelő, fenilalanin-gátlással szemben rezisztens CMPD aktivitás expresszióját. A pJN305 teljes szekvenálása nem mutatott semmiféle mutációt a CMPD 301–315 egységeket meghatározó régiókon kívül.

A négy AlwNI/NcoI fragment DNS szekvencia analízise során nem találtunk változást a DNS szekvenciában a CMPD 301–315 egységeket meghatározó kodonokat tartalmazó régió kivül. A 3. táblázat-

ban a pJN302 (vad típusú) és a pJN305, pJN306, pJN307, pJN308 plazmidok fenti tartományának nukleotid és ebből levezetett aminosav-szekvenciáját mutatjuk be.

3. táblázat

pJN302	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315
	TTA	ATG	GCG	ACC	GGG	CAA	CAA	GCC	GGT	GCG	CTG	GTT	GAA	GCG	TTG
	Leu	Met	Ala	Thr	Gly	Gln	Gln	Ala	Gly	Ala	Leu	Val	Glu	Ala	Leu
pJN305	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315
	TTA	ATG	GCG	ACC	GGG	CAG					CTG	GTT	GAA	GCG	TTG
	Leu	Met	Ala	Thr	Gly	Gln	-	-	-	-	Leu	Val	Glu	Ala	Leu
pJN306	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315
	TTA	ATG	GCG	ACC	GGG	CTA	CAA	GCC	GGT	GCG	CTG	GTT	GAA	GCG	TTG
	Leu	Met	Ala	Thr	Gly	Leu	Gln	Ala	Gly	Ala	Leu	Val	Glu	Ala	Leu
pJN307	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315
	TTA	ATG	GCG		AAA		CAA	GCC	GGT	GCG	CTG	GTT	GAA	GCG	TTG
	Leu	Met	Ala	-	Lys	-	Gln	Ala	Gly	Ala	Leu	Val	Glu	Ala	Leu
pJN308	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315
	TTA	ATG	GCG	ACC	GGG	CAA	CAA	GCC	TGT	GCG	CTG	GTT	GAA	GCG	TTG
	Leu	Met	Ala	Thr	Gly	Gln	Gln	Ala	Cys	Ala	Leu	Val	Glu	Ala	Leu

Jelenleg az AG077 jelű törzset tartjuk a legjobb gazdatörzsnek a találmány szerinti mutáns pheA gén legjobb titerje szempontjából, ez a törzs egy pJN307 plazmiddal transzformált E. coli törzs.

A 3. táblázatban közölt információkból nyilvánvaló, hogy az elsőként elkészített CMPD analógok a vad típusú CMPD-től csak egy kis tartományban különböznek, amely tartomány a 304–310 egységeket öleli föl. A pJN306 és pJN308 plazmidok DNS-ei a [Leu³⁰⁶]CMPD és [Cys³⁰⁹]CMPD szubsztitúciós analógokat határozzák meg; a pJN305 plazmid a [dez-Gln³⁰⁷, dez-Ala³⁰⁸, dez-Gly³⁰⁹, dez-Ala³¹⁰]CMPD deléciós analógot határozza meg, és a pJN307 plazmid a [dez-Thr³⁰⁴, Lys³⁰⁵, dez-Gln³⁰⁶]CMPD kombinációs deléciós és szubsztitúciós analógot határozza meg.

Amint azt az előzőekben megjelöltük, bár kiindulási módszerünk bizonyos előnyös találmány szerinti DNS szekvenciák nyerésére a plazmidban hordozott pheA gén kémiai mutációja volt, a specifikus mutált klónok szekvenálása révén nyert információk, amelyek az előző példákban szerepelnek, könnyen lehetővé teszik mind a mutált szekvenciák duplikációját (a pheA gén-kópiák helyspecifikus mutagenézisével, vagy a pheA gén egy részének vagy egészének kémiai szintézisével), mind más analóghódoló DNS-ek kifejlesztését. Említésre méltó például, hogy a CMPD 301–315 egységeit meghatározó DNS régió a 221 bázispárból álló restri-

ciós fragmensben foglaltatik, amely pheA génnek AlwNI és NcoI endonukleázokkal való emésztésével állítható elő. Az ilyen fragment könnyen szintetizálható úgy, hogy egyetlen restriktív endonukleáz emésztési helyet tartalmazzon, közelebb a CMPD 301–315 egységeket meghatározó kodonokhoz, és a szintetikus fragment felhasználható a pheA génben a természetes szekvenciájú AlwNI/NcoI fragment helyett. Ez után könnyen alkalmazható rövid szintetikus DNS duplexek alkalmazásával „kazetta” formájú mutagenézis. Potenciálisan használható az emergens polimeráz láncreakció (PCR) technológia a találmány szerinti fenilalanin és fenilalanin-származék visszacsatolós gátlással szemben ellenálló analógot kódoló szekvencia előállítására.

A találmány szerinti előnyös megvalósítási mód ismeretében szakember számára a találmány számos módosítás és variáció formájában megvalósítható. Ezért az előnyös megvalósítási módot nem korlátozó szándékkal ismertettük.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás mutáns E. coli CMPD-t kódoló DNS előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a CMPD-t kódoló DNS kémiai mutagenézise, helyspecifikus mutagenézise és/vagy a mutáció(kat) hordozó DNS szintézise útján

[dez-Gln³⁰⁷, dez-Ala³⁰⁸, dez-Gly³⁰⁹, dez-Ala³¹⁰], [Leu³⁰⁶], [dez-Thr³⁰⁴, Lys³⁰⁵, dez-Gln³⁰⁶] vagy [Cys³⁰⁹] mutációt tartalmazó CMPD-t kódoló DNS-t állítunk elő.

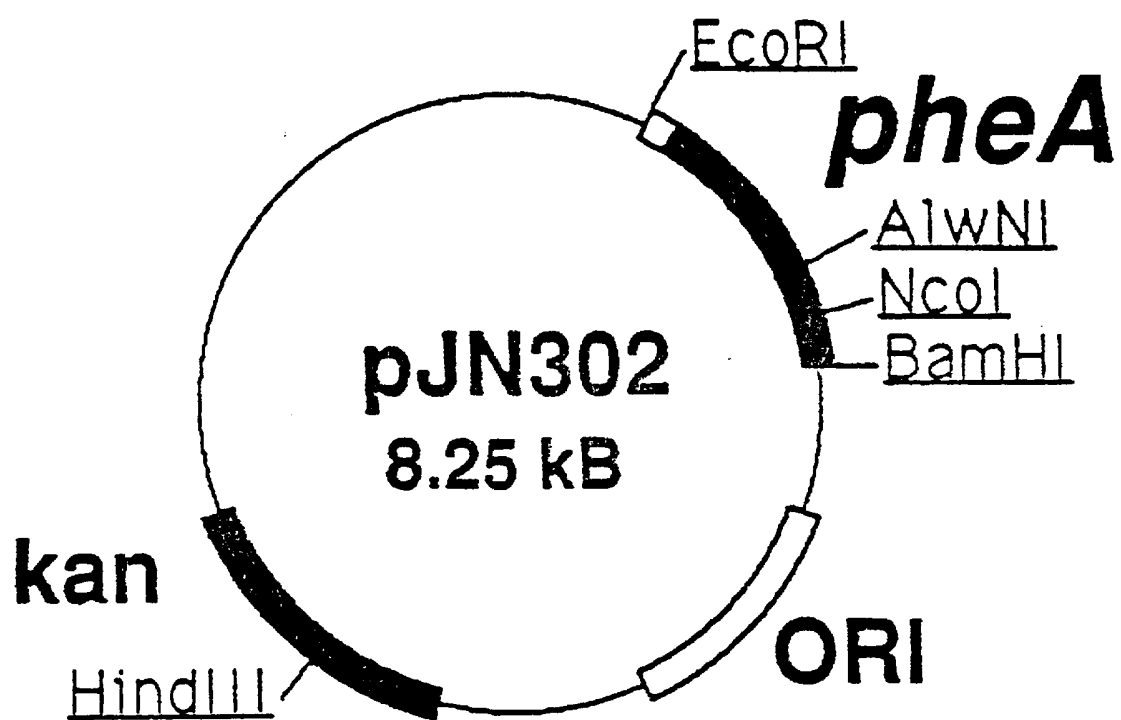
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy [dez-Gln³⁰⁷, dez-Ala³⁰⁸, dez-Gly³⁰⁹, dez-Ala³¹⁰] mutációt tartalmazó CMPD-t kódoló DNS-t állítunk elő.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy [Leu³⁰⁶] mutációt tartalmazó CMPD-t kódoló DNS-t állítunk elő.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy [dez-Thr³⁰⁴, Lys³⁰⁵, dez-Gln³⁰⁶] mutációt tartalmazó CMPD-t kódoló DNS-t állítunk elő.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy [Cys³⁰⁹] mutációt tartalmazó CMPD-t kódoló DNS-t állítunk elő.

6. Eljárás mutáns *E. coli* CMPD előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1–5. igénypontok bármelyike szerint előállított DNS-t gazdasejtben vagy sejtmentes rendszerben expresszáltatunk, és a mutáns enzimet a gazdasejtből és/vagy a tápközegből kinyerjük.



1. ábra