

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

294 539

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1998-1269
(22) Přihlášeno: 24.10.1996
(30) Právo přednosti: 26.10.1995 DE 1995/19539952
(40) Zveřejněno: 15.07.1998
(Věstník č. 07/1998)
(47) Uděleno: 29.11.04
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: 12.01.2005
(Věstník č. 1/2005)
(86) PCT číslo: PCT/EP1996/004613
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 1997/015673

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl. :⁷
C 12 N 15/54
C 12 N 9/10
C 12 N 1/21
C 12 P 13/12

- (73) Majitel patentu:
CONSORTIUM FÜR ELEKTROCHEMISCHE
INDUSTRIE GMBH, München, DE
- (72) Původce:
Leinfelder Walfred Dr., München, DE
Heinrich Peter Dr., Todtenweis, DE
- (74) Zástupce:
JUDr. Miloš Všeček, Hájkova 2, Praha 2, 12000

- (54) Název vynálezu:
**Serin-acetyltransferáza, sekvence DNA, která
kóduje serin-acetyltransferázu,
mikroorganismus, který má metabolismus
cysteinu deregulovaný a způsob výroby O-
acetylserinu, L-cysteinu a produktů příbuzných
L-cysteinu**

- (57) Anotace:
Řešení se týká serin-acetyltransferázy, která vykazuje ve srovnání a divokým typem enzymu sníženou citlivost vůči inhibitoru L-cysteinu a proteinovou sekvenci, která ve srovnání se sekvencí divokého typu vykazuje nejméně jednu mutaci nebo delecí, přičemž mutace se nachází v sekvenční oblasti od aminokyseliny v pozici 97 až včetně aminokyseliny v pozici 273 nebo delecí v sekvenční oblasti karboxylového konce od aminokyseliny v pozici 227, přičemž pozice 1 je iniciační methionin z obrázku 5 (SEQ ID č.: 1) a přičemž je vyloučena mutace Met na Ile v pozici 256. Dále se týká sekvence DNA, která kóduje serin-acetyltransferázu, mikroorganismu, který má metabolismus cysteinu deregulovaný nejméně jednou uvedenou sekvencí DNA a způsobu výroby O-acetylserinu, L-cysteinu a sloučenin odvozených od L-cysteinu, při kterém se uvedené mikroorganismy kultivují v živném médiu.

CZ 294539 B6

Serin–acetyltransferáza, sekvence DNA, která kóduje serin–acetyltransferázu, mikroorganismus, který má metabolismus cysteinu deregulovaný a způsob výroby O–acetylserinu, L–cysteinu a produktů příbuzných L–cysteinu

5

Oblast techniky

Vynález se týká serin–acetyltransferáza, sekvence DNA, která kóduje serin–acetyltransferázu, mikroorganismu, který má metabolismus cysteinu deregulovaný a způsob výroby O–acetylserinu, L–cysteinu a od něj odvozených sloučenin obsahujících síru.

10

Dosavadní stav techniky

L–cystein a jeho deriváty se používají ve farmacii (ošetřování bronchiálních onemocnění), v kosmetice (jako součást vlasových šamponů a přípravků pro trvalou ondulaci) a v potravinářství (jako antioxidant, zesilovač chutě a jako adjuvans při zpracování těsta). L–cystein se dosud získává extrakcí z materiálů obsahujících keratin, jako vlasy, štětiny, rohy, kopyta a pera nebo enzymatickou přeměnou prekurzorů. Nadprodukce L–cysteinu mikroorganismy je velmi žádoucí, protože hospodářsky zajímavou sloučeninou je nejenom L–cystein, ale protože navíc představuje, jak vyplývá z obrázků 1–3, důležitou mezisloučeninou pro syntézu glutathionu, methioninu a biotinu.

20

L–cystein zaujímá ve všech organismech klíčovou pozici při metabolismu síry a používá se při syntéze proteinů, glutathionu, biotinu, methioninu a dalších metabolitů obsahujících síru. Navíc slouží L–cystein jako prekurzor pro biosyntézu koenzymu A, navíc se může L–cystein snadno oxidovat na cystin. Mezi biosyntézou L–cysteinu a dalších aminokyselin jako L–serin, glycín a L–methionin existuje úzká souvislost.

25

Syntéza L–cysteinu (obrázek 4) v prokaryontech, obzvláště bakteriích, je podrobně prozkoumána (Kredich, N. M. a G. M. Tomkins 1966, J. Bio. Chem. 241, 4955–4965; Kredich, N. M., 1987, Biosynthesis of Cysteine. V: Neidhardt F. C., Ingraham, J. L., Magasanik B., Low. K. B., Schaechter M., Umbarger H. E. (eds) Escherichia Coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology, Vol. 1 American Society for Microbiology, Washington D. C., 419–428). Klíčová reakce spočívá v přenosu acetylové skupiny na serin k přípravě O–acetylserinu 1), následovaná výměnou acetylové skupiny za skupinu–SH, čímž se syntetizuje L–cystein 2).

35

1) L–serin + acetyl–koenzym A → O–acetylserin + koenzym A

40 2) O–acetylserin + H₂S → L–cystein + acetát

V mikroorganismech a v rostlinách slouží O–acetylserin a nikoliv serin jako předstupeň uhlíkové struktury pro L–cystein (Kredich, N. M. a G. M. Tomkins 1966, J. Biol. Chem. 241, 4955–4965). Reakce přenosu acetylové skupiny ke tvorbě aktivované formy L–serinu se katalyzuje serin–acetyl–transferázou kódovanou genem cysE (EC 2.3.1.30) a podléhá striktní kontrole konečným produktem, L–cysteinem. Gen pro serin–acetyltransferázu byl již klonován a sekvence aminokyselin odvozená od sekvence DNA je známá (Denk, D. a Böck, A. 1987, J. Gen. Microbiol. 133, 515–525).

45

50 Tvorba L–cysteinu samotného je katalyzována dvěma izoenzymy O–acetylserin–sulfohydrolázy (EC 4.2.99.8), kódovanými geny cysK (O–acetylserin–sulfohydroláza–A) a cysM (O–acetylserin–sulfohydroláza–B), reakce, ve které funguje O–acetylserin jako donor β–alanilu a H₂S jako akceptor β–alanilu (Kredich, N. M. a G. M. Tomkins 1966, J. Biol. Chem. 241, 4955–4965), přičemž O–acetylserin–sulfohydroláza–A má hlavní podíl na syntéze cysteinu. Navíc je O–acetylserinsulfohydroláza–B (cysM) schopná využít thiosulfát jako zdroj síry (Sirko, A. a spol., J. Gen.

55

Microbiol. 133, 2719–2725). O-acetylserin-sulfhydroláza-B katalyzuje reakci mezi O-acetylserinem a thiosulfátem za vzniku S-sulfocysteinu, který se pak může konvertovat na cystein (Nakamura, T. a spol. 1983, J. Bacteriol. 156, 656–662).

- 5 Potlačení konečného produktu formy divokého typu serin-acetyltransferázy L-cysteinem je fyziologicky významným faktorem při kinetické regulaci biosyntézy cysteinu (Kredich, N. M. 1971, J. Biol. Chem. 246, 3474–3484; Kredich, N. M. a G. M. Tomkins 1966, J. Biol. Chem. 241, 4955–4965). Aktivita divokého typu serin-acetyltransferázy je potlačena cysteinem. Toto potlačení bylo kineticky vyšetřováno a vykazuje kompetitivní charakteristiku. Byla stanovena
10 inhibiční konstanta $K_i = 1,1 \times 10^{-6}$ M v přítomnosti 0,1 mM acetyl-koenzymu A a 1 mM L-serinu (Kredich, N. M. a G. M. Tomkins 1966, J. Biol. Chem. 241, 4955–4965).

- Z literatury je znám příklad, že se chemickou mutagenézí cystein-auxotrofního kmene ethylesterem kyseliny methansulfonové může izolovat cystein-prototrofní revertant, jehož serin-
15 acetyltransferázová aktivita na základě výměny aminokyselin v kódované oblasti vykazuje mírné potlačení inhibiční aktivity konečným produktem L-cysteinem (Denk, D., Böck, A., 1987, J. Gen. Microbiol. 133, 515–525). Feedback-rezistence těchto mutantů je podle známých literárních pramenů desetinásobně zvýšena. K_i těchto mutantů tak činí asi 0,01 mM oproti formě divokého typu.

- 20 Předložený vynález se týká serin-acetyltransferáz, které ve srovnání s divokým typem enzymu vykazují sníženou citlivost vůči inhibitoru L-cysteinu a jejichž proteinová sekvence ve srovnání se sekvencí divokého typu vykazuje nejméně jednu mutaci nebo delecí, vyznačující se tím, že se mutace nachází v sekvenční oblasti aminokyseliny v pozici 97 až včetně aminokyseliny v pozici
25 273 nebo delecí v oblasti karboxylového konce od aminokyseliny v pozici 227, přičemž pozice jedna je iniciační methionin z obrázku 5 (SEQ ID č.: 1) a přičemž je vyloučena proteinová sekvence s mutací Met na Ile v pozici 256.

30 Podstata vynálezu

Překvapivě bylo objeveno, že výměny aminokyselin podle vynálezu a/nebo delecí aminokyselin karboxylovém konci serin-acetyltransferázy vedou ke snížení citlivosti vůči cysteinu za zachování dostatečné enzymatické aktivity.

- 35 Předmětem předloženého vynálezu je serin-acetyltransferáza, která ve srovnání s divokým typem enzymu vykazuje sníženou citlivost vůči inhibitoru L-cysteinu a jejíž proteinová sekvence ve srovnání se sekvencí divokého typu vykazuje nejméně jednu mutaci nebo delecí, ve které se mutace nachází v sekvenční oblasti od aminokyseliny v pozici 97 až včetně aminokyseliny
40 v pozici 273 nebo se delecí nachází v sekvenční oblasti karboxylového konce od aminokyseliny v pozici 248 až včetně aminokyseliny 259, přičemž pozice jedna je iniciační methionin z obrázku 5 (SEQ ID č.: 1) a přičemž je vyloučena mutace Met na Ile v pozici 256, a že serin-acetyltransferáza má inhibiční konstantu K_i 0,02 až 2,3 mM v přítomnosti 1 mM L-serinu a 0,1 mM acetyl-CoA.

- 45 Výhodně její proteinová sekvence zahrnuje výměnu aminokyselin nejméně jednoho z mutantů cysE uvedených v tabulce 1a nebo delecí podle tabulky 1b.

- Inhibiční konstanty (K_i) obzvláště výhodných mutantů enzymu oproti L-cysteinu leží mezi 0,02 a
50 2,3 mM v přítomnosti 1 mM L-serinu a 0,1 mM acetyl-CoA.

Serin-acetyltransferázy podle vynálezu vykazují dostatečnou aktivitu pro růst mikroorganismů, které ji obsahují.

Tabulka 1a: Feedback-rezistentní cysE-alely s jednotlivými nebo násobnými výměnami aminokyselin v kódované oblasti

Mutanty cysE	Výměna nukleotidu(č.)	Výměna aminokyseliny (č.)	K_i (μ M)	spec. akt μ mol/min x mg
cysEII	GGC->AGC (934)	Gly238->Ser238	10	0,068
cysEIII	GGT->GAT (176)	Gly165->Asp165	10	0,030
cysEIV	GCT->GTT (932)	Ala237->Val237	40	0,170
	GGC->AGC (934)	Gly238->Ser238		
cysEV	GCT->GTT (932)	Ala237->Val237	10	0,246
	GGC->AGC (934)	Gly238->Ser238		
	ATG->ATA (990)	Met256->Ile256		
cysEVI	GGC->AGC (934)	Gly238->Ser238	10	0,075
	ATG->ATA (990)	Met256->Ile256		
cysEVII	GCT->GTT (932)	Ala237->Val237	10	0,253
cysEVIII	ATG->ATA (990)	Met256->Ile256	30	0,160
	GCT->GTT (932)	Ala237->Val237		

Tabulka 1a: Feedback-rezistentní cysE-alely s jednotlivými nebo násobnými výměnami aminokyselin v kódované oblasti (dokončení).

Mutant cysE	Výměna nukleo- tidu(č.)	Výměna amino- kyseliny (č.)	K_i (μ M)	spec. akt μ mol/min x mg
cysEX	ACG->GCG (721)	Thr167->Ala167	50	0,156
cysEXI	ACG->GCG (721) GGT->AGT (955)	Thr167->Ala167 Gly245->Ser245	700	0,117
cysEXII	AAA->CAA (511) GGC->AGC (934) TTT->TTG (1023)	Lys97->Gln97 Gly238->Ser238 Phe267->Leu267	40	0,254
cysEXIII	GTT->GTT (713) TTT->TTG (1023)	Val164->Ala164 Phe267->Leu267	30	0,213
cysEXIV	ACG->GCG (721) ATG->TAG (988+989)	Thr167->Ala167 Met256->Stop256	>1000	0,453
cysEXVI	GAT->GGT (971) AAG->TAG (973)	Asp250->Gly250 Lys251->Stop251	50	0,554
cysEXVII	GGT->GAT (716) ACG->GCG (721)	Gly165- Asp1165 Thr167- Ala167	100	0,052
cysEXXIII	ACG->GCG GCT->GTT GGC->AGC	Thr167- Ala167 Ala237- Val237 Gly238- Ser238	2300	0,085

Tabulka 1b: Feedback-rezistentní cysE-alely s delecemi na karboxylovém konci

Mutant cysE	Deletované amino-kyseliny	Terminální amino-kyseliny	K_i (μ M)	spec. akt μ mol/min x mg
cysE-Del259	14	His259	7,5	0,328
cysE-Del258	15	Gln258	5	0,256
cysE-Del257	16	Asp257	7,5	0,394
cysE-Del256	17	Met256	12,5	0,366
cysE-Del255	18	Asp255	30	0,624
cysE-Del250	23	Asp250	20	0,405
cysE-Del249	24	Ser249	15	0,420
cysE-Del248	25	Asp248	12,5	0,270

5

Serin-acetyltransferázy insenzitivní vůči cysteinu podle vynálezu se mohou získat příkladně expresí sekvencí DNA, které kódují pro serin-acetyltransferázy podle vynálezu.

10

Těmito sekvencemi DNA kódované varianty enzymů vykazují vždy rozdílnou citlivost oproti inhibitoru L-cysteinu, přičemž ve všech případech však byla ve srovnání s divokým typem nalezena nejméně pětkrát zvýšená rezistence serin-acetyltransferázy oproti inhibitoru L-cysteinu.

15

Předložený vynález se dále týká sekvencí DNA, které kódují pro serin-acetyltransferázy podle vynálezu.

20

Tyto sekvence DNA se vyznačují tím, že v kódované sekvenční oblasti DNA daného genu cysE od bp 510 do bp 1040 vykazují nejméně jednu mutaci, přičemž bp 1 je první báze z obrázku 6 (SEQ ID NO: 2), přičemž je vyloučenina mutace guaninu na adenin, thymidin nebo cytosin v pozici 990.

Dále budou sekvence DNA podle vynálezu označovány také jako feedback-rezistentní cysE-alely.

25

Tyto sekvence DNA je možné vyrobit příkladně nespecifickými nebo cílenými mutagenezními metodami z výchozích materiálů popsaných dále.

30

Nespecifické mutace v rámci uvedené oblasti DNA se mohou provádět příkladně chemickými agenciemi (příkladně nitrosoguanidin, kyselina ethylmethansulfonová) a/nebo fyzikálními metodami (Miller, J. H., 1972, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, USA, 113–185) a/nebo reakcemi PCR, prováděnými za určitých podmínek (Gibbs, R. A. 1990, Anal. Chem. 62, 1202–1214).

35

Metody k zavedení mutací ve specifických pozicích v rámci jednoho fragmentu DNA jsou známy a jsou popsány příkladně v následujících pramenech: Sarkar, G., Sommer, S. S., 1990, BioTechniques 8, 440–407 popisují ortospecifické mutagenese podle PCR; Ausubel, F. M. a

spol., 1987, s. 8.01–8.3.6 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, popsány metody k ortospecifické mutagenезi pomocí fágů M13.

5 Další metodou k výrobě feedback–rezistentní cysE–alely spočívá v kombinaci různých bodových mutací, vedoucích k feedback–rezistenci k multiplenovým mutantům s novými vlastnostmi.

Jako výchozí materiál pro mutagenезe slouží s výhodou DNA divokého typu genu cysE nebo mutací inaktivovaný gen cysE nebo mutovaný cysE gen již kódovaný pro feedback–rezistentní serinacetyltransferázu.

10 Mutovaný gen cysE může být chromozomálně nebo extrachromozomálně kódovaný.

Výchozí DNA–fragment, příkladně obsahující divoký typ genu cysE, se může rekombinovat známými standardními technikami za vzniku rekombinantní DNA na jednom vektoru. Použitím
15 výše uvedených mutagenезních metod se jeden nebo několik nukleotidů sekvence DNA změní tak, že nyní genem kódovaná sekvence aminokyselin vykazuje nejméně jednu mutaci v sekvenční pozici 97 až včetně aminokyseliny v pozici 273 a nejméně jednu delecii v sekvenční oblasti karboxylového konce od aminokyseliny v pozici 227, přičemž pozice jedna je startovacím methioninem podle obrázku 5 (SEQ ID č.: 1) a přičemž mutace z Met na Ile v pozici 256 je
20 vyloučena.

Popsanými technikami je možné zavést do libovolného genu cysE jednu nebo několik mutací v uvedené oblasti DNA, které způsobí, že kódovaná serin–acetyltransferáza má sekvenci aminokyselin vedoucí k insenzitivitě vůči cysteinu.

25 V návaznosti na provedenou mutagenезi, jak je popsáno výše, se provádí selekce mutantů s požadovaným fenotypem příkladně plátováním na médiu neobsahujícím cystein a následným stanovením rozsahu citlivosti mutované serin–acetyltransferázy vůči cysteinu.

30 Dalším předmětem vynálezu jsou mikroorganismy, které obsahují feedback–rezistentní cysE–alely.

Takové kmeny mikroorganismů se vyznačují tím, že obsahují nejméně jednu cysteinovou výměnu, deregulovanou pomocí feedback–rezistentní cysE–Alle.

35 Protože látková výměna cysteinu probíhá u všech mikroorganismů principiálně stejným, obecně známým způsobem látkové výměny a techniky použité k výrobě kmenů podle vynálezu jsou obecně známé příkladně ze standardních učebnic a použitelné na všechny mikroorganismy, je možné vyrábět kmeny podle vynálezu z libovolných mikroorganismů.

40 S výhodou jsou k výrobě kmenů podle vynálezu vhodné bakterie.

Obzvláště výhodné jsou gramnegativní bakterie, obzvláště *E. coli*.

45 Dalším předmětem vynálezu je výroba L–cysteinu nebo produktů odvozených od L–cysteinu kultivací mikroorganismů podle vynálezu.

Feedback–rezistentní cysE–alely umožňují vyloučení kontroly důležitého biosyntetického kontrolního bodu, přičemž se produkce četných sloučenin ležících ve směru tohoto kontrolního
50 bodu zesiluje. K tomu patří zejména O–acetylserin, L–cystein a produkty příbuzné L–cysteinu. Produkty příbuzné L–cysteinu jsou všechny odvozené od L–cysteinu, to znamená sloučeniny obsahující síru, k jejichž výrobě je L–cystein nezbytný. Příklady takových produktů jsou kyselina 2(R,S)–methyl–thiazolidin–2(R,S),4(R)–dikarboxylová, homocystein, methionin, biotin a
55 glutathion.

Feedback–rezistentní *cysE*–alely se transformují k expresi se změněným serin–acetyltransferázovým enzymem pomocí obvyklých způsobů na hostitelském kmenu. „Screening“ kmenů se změněnými serin–acetyltransferázovými vlastnostmi se provádí příkladně podle metod popsaných dále.

5

Ke stanovení míry insenzitivity vůči cysteinu změněného enzymu se nejprve měří vylučování cysteinu kmenů v semikvantitativním tak zvaném křížovém vyživovacím testu. K tomu se pěstují testované kmeny na minimálním médiu neobsahujícím cystein, ale obsahujícím cystein–auxotrofní indikátorový kmen. Růstová zóna indikátorového kmenu okolo dané očkovací linie (halo) slouží jako semikvantitativní míra vylučování cysteinu. Všechny kmeny, které v křížovém vyživovacím testu vykazují odezvu s průměrem > 2 mm, se v „křížovém vyživovacím testu označují jako pozitivní“. S vybranými kmeny se provádí test enzymové aktivity ke stanovení míry cysteinové tolerance změněné serin–acetyltransferázy.

10

Ke stanovení senzitivity serin–acetyltransferázy vůči cysteinu se může použít každá metoda, která umožňuje stanovit aktivitu tohoto enzymu v přítomnosti cysteinu. Příkladně se může stanovení serin–acetyltransferázové aktivity provádět metodou, kterou popsal Kredich a Tomkins v *J. Biol. Chem.* 241, 4955–4965 (1966). V případě tohoto testu obsahuje enzymová testovací směs substrát L–serin a kofaktor acetyl–koenzym A. Reakce se nastartuje přidávkem enzymu a sleduje na základě poklesu absorpce při 232 nm, který je vyvolán štěpením thioesterové sloučeniny v acetylkoenzymu A pomocí spektrálního fotometru.

15

20

Popsaný enzymový test je vhodný ke stanovení senzitivity každého serin–acetyltransferázového enzymu vůči cysteinu, včetně enzymů s modifikovaným karboxylovým koncem. Potlačení serin–acetyltransferázové aktivity se testuje v přítomnosti různých koncentrací L–cysteinu. Katalytická aktivita různých serin–acetyltransferázových enzymů se stanovuje jednak v přítomnosti a jednak v nepřítomnosti L–cysteinu a z výsledků se stanovuje inhibiční konstanta K_i (Kredich, N. M. a G. M. Tomkins 1966, *J. Biol. Chem.* 241, 4955–4965).

25

Ve většině případů je výhodná enzymaticky aktivní serin–acetyltransferáza se sníženou cysteinovou aktivitou. Pro jiné účely může být požadováno současné snížení senzitivity konečného produktu a katalytické aktivity.

30

Zpravidla není žádoucí silná nadprodukce rezistentní serin–acetyltransferázy jako konečného produktu, protože se přitom ve zvýšené míře tvořeny O–acetylserin, L–cystein nebo od něj odvozené metabolity hromadí v buňce, toxifikují ji a mohly by vyvolat selekci mutantů s redukovanou serin–acetyltransferázovou aktivitou. Proto se s výhodou integrují do genomu *cysE*–alely feedback–rezistentní s výhodou jako jednotlivá kopie pomocí obvyklých způsobů.

35

Metody pro integraci jednotlivých genů do chromozomu s pomocí vhodných vektorů odpovídají stavu techniky (příkladně Winans a spol., 1985, *J. Bacteriol.* 161, 1219–1221; Shevell a spol., 1988, *J. Bacteriol.* 170, 3294–3296; Kulakauskas a spol., 1991, *J. Bacteriol.* 173, 2633–2638).

40

Rovněž je výhodné exprimovat feedback–rezistentní serin–acetyltransferázy na plasmidech s nízkým počtem kopií.

45

Jak je známo, že vykazuje expresní vektor vedle feedback–rezistentní *cysE*–alely s výhodou ještě další dodatečné elementy, popsané dále.

Kódované sekvence, nacházející se na vektoru jsou s výhodou spojeny s regulačními elementy, které jsou nutné pro expresi kódovaných sekvencí v požadované míře.

50

Příklady těchto regulačních elementů jsou promotory, ribosomální spojovací místa a terminální sekvence. Ve většině případů se použijí pro expresi mutantů podle vynálezu přirozené regulační sekvence *cysE*. Mohou se však použít libovolné jiné regulační sekvence.

55

Vedle regulačních elementů se s výhodou nacházejí na expresním vektoru také sekvence, které kódují pro selektivní marker a/nebo reporterový gen. Expresí selekčních markerů tohoto druhu usnadňují identifikaci transformantů. Jako selekční markery jsou vhodné geny, které kódují rezistenci vůči například ampicilinu, tetracyklinu, kanamycinu, chloramfenikolu nebo dalším antibiotikům.

Pokud se mají mutanty podle vynálezu extrachromozomálně replikovat, měl by plazmidový vektor s výhodou obsahovat původní bod replikace. Strategie k integraci genů do chromozomů s pomocí vektorů, z nichž byl odstraněn původní bod replikace, jsou podle stavu techniky známé (Winans a spol., 1985, J. Bacteriol. 161, 1219–1221; Shevell a spol., 1988, J. Bacteriol. 170, 3294–3296; Kulakauskas a spol., 1991, J. Bacteriol. 173, 2633–2638).

Příklady vektorů, které jsou autonomně replikovatelné na *E. coli* uvádí například Pouwels, P. H., Enger-Valk, B. E., Brammer, W. J. 1985, Cloning Vectors, Elsevier, Amsterdam.

Takovými vektory jsou například:

- plazmidy s vysokým počtem kopií jako například pBR322, pUC18
- plazmidy se středním až nízkým počtem kopií jako například pACYC184, pACYC177 a pSC101
- fágové vektory jako například vektory M13.

S výhodou jsou vhodné vektory se středním až nízkým počtem kopií; obzvláště výhodné jsou vektory s replikonem p15A, jako pACYC184 (ATCC37033) nebo pACYC177 (ATCC37031).

Pro jiné bakterie je rovněž v literatuře popsán velký počet vektorů (Pouwels, P. H., Enger-Valk, B. E., Brammer, W. J. 1985, Cloning Vectors, Elsevier, Amsterdam). S těmito vektory je možné exprese mutantů podle vynálezu na jiné bakterie.

Vhodné rekombinantní vektory se mohou vyrábět standardními technikami pro výrobu rekombinantní DNA. Tyto techniky jsou podrobně uvedeny ve standardních učebnicích.

Vhodný hostitelský kmen se transformuje expresním vektorem, který obsahuje transkripční jednotku kódující pro cystein–insenzitivní serin–acetyltransferázu.

Jako hostitelské kmeny se používají kmeny, které obsahují proteiny senzitivní vůči cysteinu, jako například prokaryonty nebo kvasinky.

S výhodou se použijí kmeny divokého typu nebo kmeny *E. coli*, ve kterých je endogenní gen *cysE* inaktivován a komplementován *cysE* genem podle vynálezu. Takové buněčné systémy jsou vhodné pro nadprodukcí L–cysteinu a z něj odvozených metabolitů.

Při fermentaci kmenů, obsahujících nejméně jednu feedback–rezistentní *cysE*–alelu se ukazuje, že kmeny, které přijmou feedback–rezistentní *cysE*–alelu s hodnotou K_i mezi 0,015 a 2,3 mM v přítomnosti 1 mM L–serinu a 0,1 mM acetyl–CoA vylučují výrazně větší množství cysteinu.

Serin–acetyltransferázy podle vynálezu je možné získávat také použitím antisense–RNA. Blokovat nebo modifikovat cíleně genovou aktivitu tak zvanou reverzní genetikou (Reverse Genetik) odpovídá stavu techniky (Inouye, 1988, Gene 72, 25–34). Antisense–RNA je transkripční produkt toho řetězce DNA, který je komplementární k řetězci kódujícímu protein. Je možné redukovat senzitivitu serin–acetyltransferázy vůči cysteinu in vivo tím, že se z expresního vektoru produkuje antisense–RNA, která je komplementární k definované oblasti 3–kódovaného řetězce přirozeného nebo transformovaného genu *cysE*. Přitom se antisense–RNA specificky váže na cílové sekvence *cysE*–mRNA a umožňuje tím syntézu serin–acetyltransferázových

enzymů podle vynálezu, které jsou na karboxylovém konci zkráceny a analogicky jako u deletovaných mutantů z příkladu 3 vykazují sníženou senzitivitu vůči inhibitoru L-cysteinu.

- 5 Dalším úkolem bylo dát k dispozici vhodné zdroje síry pro optimální nadprodukcí cysteinu pomocí mikroorganismů podle vynálezu.

10 Překvapivě bylo objeveno, že intracelulární nadprodukce O-acetylserinu, vyvolaná použitím serin-acetyltransferázových mutantů podle vynálezu ve sloučeninách s vhodným vyživovacím médiem vede k výraznému vzestupu extracelulární koncentrace cysteinu. Na základě toho jsou serin-acetyltransferázové mutanty vhodné k nadprodukcí cysteinu.

K tomu musí být pro mikroorganismy podle vynálezu být v produkčním médiu k dispozici dostatečné množství donorů síry.

- 15 Vhodnými donory síry pro nadprodukcí cysteinu jsou všechny anorganické sloučeniny síry. Výhodné jsou sírany, siřičitany, sulfidy, dithionit a thiosulfáty. Obzvláště výhodný k optimální nadprodukcí cysteinu je thiosulfát.

20 Dalšího zvýšení výtěžku cysteinu se může dosáhnout dodatečnou nadprodukcí enzymů redukujících sulfáty (kódované pomocí genů cysD, C, H, G, I, J) a sulfohydrogenačních enzymů (kódované geny cysK a cysM).

Další zvýšení výtěžku cysteinu je možné:

- 25 a) deregulací regulačního proteinu cysB na genové úrovni ve smyslu konstitutivní exprese. Protein cysB vystupuje ve funkci nadřazeného regulačního proteinu biosyntézy cysteinu v *E. coli* (Kredich, N. M., 1987, Biosynthesis of Cysteine. V: Neidhardt F. C., Ingraham, J. L., Magasanik, B., Low, K. B., Schaechter, M., Umberger, H. E. (eds) Escherichia coli a Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology, Vol. 1 American Society for
30 Microbiology, Washington D. C., 419–428).

- b) kombinací genů ser-A, vybraných ze skupiny divokého typu serA a genů serA kódujících pro fosfoglycerát-dehydrogenázu se sníženou senzitivitou vůči serinu s geny cys-E podle
35 vynálezu.

- c) externím dodáváním serinu.

40 S výhodou se gen přirozené serin-acetyltransferázy senzitivní vůči cysteinu v hostitelském kmenu inaktivuje, takže je zaručena pouze syntéza cystein-insektivní serin-acetyltransferázy zavedené do daného kmenu před transformací. K inaktivaci přirozených genů v *E. coli* existují četné předpisy (Hamilton a spol., 1989, J. Bacteriol. 171, 4617–4622; Russel a spol., 1989, J. Bacteriol. 171, 2609–2613; Shen a Huang, 1986, Genetics 112, 441–457; Jasin a Schimmel, 1984, J. Bacteriol. 159, 783–786).

- 45 Rovněž tak výhodná je integrace jedné kopie stejného genu, který kóduje pro změněnou serin-acetyltransferázu do hostitelského genomu.

50 Popisy a odkazy na tyto techniky lze nalézt v následujících publikacích: Shevell a spol., 1988, J. Bacteriol. 170, 3294–3296; Kulakauskas a spol., 1991, J. Bacteriol. 173, 2633–2638.

S výhodou se klonují cysE-alely o rozdílných K_i na vektor s nižším počtem kopií a transformuje se do odpovídajícího produkčního kmenu.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1

5 zobrazuje biosyntézu glutathionu, vycházející z homoserinu.

Obrázek 2

zobrazuje biosyntézu glutathionu, vycházející z glutamátu.

10 Obrázek 3

zobrazuje biosyntézu glutathionu, vycházející z dethiobioninu.

Obrázek 4

15 zobrazuje biosyntézu L-cysteinu v *E. coli*, vycházející z glukózy.

Obrázek 5

zobrazuje pořadí aminokyselin serin-acetyltransferázy z *E. coli*.

Obrázek 6

20 zobrazuje sekvenci DNA *E. coli* cysE-genu a od této sekvence odvozenou sekvenci aminokyselin serin-acetyltransferázy.

Obrázek 7

25 zobrazuje restriční mapu plazmidu pP1 z příkladu 1 obsahující feedback-rezistentní cysE-alely, klonovaný jako 2,25 kb PvuII-fragment v pUC219.

Obrázek 8

30 zobrazuje plazmid pPC43 z příkladu 2, obsahující divoký typ genu cysE jako 1,15 kb velký fragment EcoRI/BamHI v pBluescript.

Obrázek 9

35 zobrazuje mapu plazmidu pACYC184-LH z příkladu 3 obsahující feedback-rezistentní cysE-alely s delecí v karboxylovém konci, a z příkladu 4 obsahující feedback-rezistentní cysE-alely s rozdílnými výměnami bází.

Příklady provedení vynálezu

40 Následující příklady provedení slouží k bližšímu vysvětlení vynálezu:

Příklad 1

45 Izolace mutantů *E. coli* se serin-acetyltransferázovými enzymy insenzitivními vůči cysteinu

Reverzí auxotrofních kmenů *E. coli* je možné připravit regulativní mutanty. Mutanty s požadovanými vlastnostmi (insenzitivita serin-acetyltransferázy vůči cysteinu) se vyhledávají mezi revertantními cystein-auxotrofními kmeny cysE-*E. coli*.

50 Pro izolaci revertantů se používají cystein-auxotrofními kmeny *E. coli* JM15 (CGSC # 5042: cysE50, trf-8) a JM39 (CGSC # 5043 cysE51, trf-8), založené v Deutschen Sammlung für Mikroorganismen v Braunschweigu pod zakládacím číslem DSM 10173. K výrobě cystein-protrofních revertantů byly tyto kmeny zpracovávány mutagenem nitrosoguanidinu podle Miller, J. H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory. Na
55 minimálním médiu neobsahujícím cystein byly hledány cystein protrofní revertanty. Nejprve

bylo asi 1000 získaných revertantů testováno křížovým vyživovacím experimentem z hlediska vylučování cysteinu. K tomu byly testované revertanty očkované na minimální médium neobsahující cystein (12 g/l K_2HPO_4 , 3 g/l KH_2PO_4 , 5 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 0,3 g/l $MgSO_4 \times 7 H_2O$, 0,015 g/l $CaCl_2 \times 2 H_2O$, 0,02 g/l $FeSO_4 \times 7 H_2O$, 1 g/l Na_3 -citrátu $\times 2 H_2O$, 0,1 g/l NaCl, 15 g/l bactoagaru, 1 ml/l roztoku se stopovými prvky, sestávajícího z 0,15 g/l $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$, 2,5 g/l H_3BO_3 , 0,7 g/l $CoCl_2 \times 6 H_2O$, 0,25 g/l $CuSO_4 \times 5 H_2O$, 1,6 g/l $MnCl_2 \times 4 H_2O$, 0,3 g/l $ZnSO_4 \times 7 H_2O$, který byl suplementován 1 % glukózy. Bylo očkováno 5×10^6 buněk cystein-auxotrofního indikátorového kmenu JM39 na ml a inkubováno po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C. Průměr narostlé plošky kolem testované kolonie (halo) byl posuzován jako semikvantitativní míra vylučování cysteinu testovaným kmenem. Všechny revertanty, které vykazovaly růstovou zónu větší než 2 mm, byly hodnoceny jako pozitivní a po několika čistících přeočkovacích izolovány a konzervovány.

K vyšetření biochemické podstaty pro vylučování cysteinu revertanty byla stanovena aktivita serin-acetyltransferázy *in vitro* a rovněž její inhibice cysteinem. Ke stanovení se použije extrakt S30 (dezintegrovane buňky se centrifugují 20 minut při 30 000 g a teplotě 4 °C) vybraných revertantů, výchozích kmenů a srovnávacího kmenu *E. coli* W3110 (ATTC 27325). Byla nalezena řada revertantů, jejichž serin-acetyltransferázová aktivita v přítomnosti různých koncentrací inhibitoru L-cysteinu vykazovala ještě významnou zbytkovou aktivitu (hodnota K_i mezi 5 a 50 μM).

Ke stanovení schopnosti vylučovat cystein v kapalném médiu pomocí kvantitativního stanovení cysteinu se inkubuje 50 vybraných revertantů *cysE* v 20 ml standardního produkčního média po dobu 48 hodin při teplotě 30 °C a 170 otáčkách za minutu. Standardní produkční médium sestává z 15 g/l glukózy, 0,08 g/l bacto-tryptonu, 0,04 g/l kvasinkového extraktu, 5 mg/l vitaminu B1, 3 g/l KH_2PO_4 , 12 g/l K_2HPO_4 , 0,3 g/l $MgSO_4 \times 7 H_2O$, 0,1 g/l NaCl, 5 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 14,7 mg/l $CaCl_2 \times 2 H_2O$, 2 mg/l $FeSO_4 \times 2 H_2O$, 1 g/l Na_3 -citrátu $\times 2 H_2O$, 5 g/l $Na_2S_2O_3 \times 5 H_2O$ a 1 ml/l roztoku stopových prvků (viz výše). Po 24 a 48 hodinách se vždy odebere vzorek (10 μl), případně se zředí a ve zbytku neobsahujícím buňky se stanovuje koncentrace cysteinu kalorimetricky podle Gaitonde, M. K. (1967), Biochem. J. 104, 627–633. Míra vylučování cysteinu těchto mutantů kolísá mezi 5 až 60 mg/l cysteinu ve zbytku kultury. V kmenech divokého typu *E. coli* se oproti tomu nemohlo prokázat žádné vylučování cysteinu. Z tohoto screeningu bylo vybráno 8 revertantů, jejichž vylučování cysteinu leží mezi 40 a 60 mg/l.

K exaktní analýze genetické podstaty rezistence konečných produktů serin-acetyltransferázy těchto 8 mutantů byly jejich strukturní geny *cysE* klonovány a stanovena jejich sekvence DNA.

Protože DNA sekvence divokého typu genu *cysE* a rovněž chromozomální restriční mapa oblastí navazujících na gen *cysE* *E. coli* jsou známy (Denk a Böck, 1987, J. Gen. Microbiol. 133, 515–525), je zřejmé, že strukturní gen *cysE* leží na 2,25 kb velkém fragmentu PvuII-DNA.

Ke klonování genu *cysE* kódujícího pro cystein-insenzitivní serin-acetyltransferázy se chromozomální DNA selektovaných revertantů úplně štěpí pomocí PvuII, hydrolyzát DNA se rozdělí přes preparativní agarový gel a DNA se izoluje v rozmezí velikostí 2 až 3 kb. Izolovaný hydrolyzát PvuII se pomocí ligázy T4 DNA spojí s plazmidovým vektorem pUC19, linearizovaným pomocí SmaI a defosforylovaným alkalickou fosfatázou (dodávaný fou Boehringer Mannheim).

Cystein-auxotrofní kmen *cysE* JM15 (CGSC # 5042) se transformuje s danou ligační směsí a provede se selekce na minimálním médiu neobsahujícím cystein a obsahujícím ampicilin (50 mg/l). Selektované plazmidy a plazmidy komplementující cystein-auxotrofii hostitelského kmene (viz obrázek 7) vykazují v restričním vzorku štěpicí vzorek potřebný pro gen *cysE* (Denk a Böck, 1987, J. Gen. Microbiol. 133, 515–525). Také v křížovém vyživovacím testu vyvolávají selektované transformanty intenzivní růst indikátorového kmene JM35 (halo > 4 mm). Stanovení aktivity serin-acetyltransferázy v buněčném extraktu těchto mutantů *cysE*, které se získají

- 20 minutovou centrifugací při 30 000 g a teplotě 4 °C, svědčí o redukované senzitivitě vůči L-cysteinu. K exaktní identifikaci změn ve strukturních genech jednotlivých *cysE**-alel, vedoucích k rezistenci konečného produktu, se jejich DNA sekvenují za použití *cysE*-gen specifických oligonukleotidů a zjištěné sekvence nukleotidů se srovnávají s divokým typem genu *cysE*. Toto srovnání sekvencí nukleotidů poskytuje rozdíly v sekvenci DNA a aminokyselin formy divokého typu, shrnuté v následující Tabulce 2 (srovnej obrázky 5 a 6).

Tabulka 2: Feedback–rezistentní *cysE*–alela, vzniklá chemickou mutagenezí

Mutanty <i>cysE</i>	Výměna nukleotidu (č.)	Výměna aminokyseliny (č.)	K_i (μ M)
<i>cysEII</i>	GGC->AGC (934)	Gly238->Ser238	10
<i>cysEIII</i>	GGT->GAT (716)	Gly165->Asp165	10
<i>cysEVII</i>	GCT->GTT (932)	Ala237->Val237	10
<i>cysEX</i>	ACG->GCG (721)	Thr167->Ala167	50
<i>cysEXI</i>	GGT->AGT (955) ACG->GCG (721)	Gly245->Ser245 Thr167->Ala167	700
<i>cysEXII</i>	AAA->CAA (511) GGC->AGC (934) TTT->TTG (1023)	Lys97->Gln97 Gly238->Ser238 Phe267->Leu267	40
<i>cysEXIII</i>	GTT->GCT (713) TTT->TTG (1023)	Val164->Ala164 Phe267->Leu267	30
<i>cysEXVI</i>	GAT->GGT (971) AAG->TAG (973)	Asp250->Gly250 Lys251->Stop251	50

Příklad 2

- Výroba serin–acetyltransferáz insenzitivních ke konečnému produktu cílenou výměnou bází ve strukturním genu *cysE*.

- V příkladu 1 se popisuje celkem 8 různých *cysE*–alel, které na základě výměny bází a s tím spojených změn aminokyselin vykazují značnou insenzitivaci serin–acetyltransferázy oproti inhibitoru L–cysteinu. Tyto změněné enzymy se nerozlišují pouze v pozici výměny aminokyselin vedoucí k rezistenci, nýbrž také v míře senzitivity vůči inhibitoru L–cysteinu. Ortospecifickou mutagenezí byly konstruovány serin–acetyltransferázové enzymy rezistentní vůči konečnému produktu s novými vlastnostmi, ve kterých byly navzájem kombinovány výměny aminokyselin popsané v příkladu 1. K tomu potřebné mutagenese byly provedeny způsobem podle stavu techniky, metodou, kterou popsal Kunkel a spol., (1987), Meth. Enzymol. 154, 367–382.

- Jako výchozí plazmid pro mutagenezi se použije *cysE* plazmid pPC43 zobrazený na obr. 8 (založené v Deutschen Sammlung für Mikroorganismen v Braunschweigu pod zakládacím číslem DSM 171), který obsahuje 1,15 kb velké divoké typy genu *cysE* na pozici EcoRI–BamHI fágemidového vektoru pBluescriptII SK+ (firma Stratagene, Heidelberg). Tento gen divokého

typu cysE se amplifikuje metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) (Saiki a spol., 1988, Science 239, 487–491 z genomické DNA E. coli divokého typu kmene W3110 (ATTC 27325). Používají se oligonukleotidy cysE-fw1 (SEQ ID č.: 3) („sense-Primer“) a cysE-rev1 (SEQ ID č.:4) („anti-sense-Primer“). Sekvence nukleotidů tohoto primeru má následující

cysE-fw1: (SEQ ID č.:3)

5 -GCCTGGATTCTGCAGTCGACCTGGCCCATCGCTTCGGCGTTG-3 ,

tučně značená část odpovídá bázím 9 až 30 ze sekvence cysE-DNA podle obrázku 6, podtržené je místo inkorporované BamHI.

cysE-rev1: (SEQ ID č.:4)

5 -GTAGGAGCTCTGCAGAAATTCGGGTATCCGGGAGCGGTATTG-3 ,

tučně značená část odpovídá bázím 1106 až 1126 ze sekvence cysE-DNA podle obrázku 6, podtržené je místo inkorporované EcoRI.

PCR-experimenty se provádějí ve 30 cyklech v přítomnosti 200 μ M deoxynukleotidtrifosfátů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), po 1 μ M odpovídajícího oligonukleotidu, 100 ng W3110-DNA, v reakčním pufru (10 mM tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01 % želatiny) a 5 jednotek teplotně stabilní polymerázy Vent-DNA (firma Biolabs) v termocykleru (Gene-ATAQ-Controler, firma Pharmacia) za následujících podmínek: 96 °C, 1,5 min; 62 °C, 1 minuta; 72 °C, 3 minuty. Produkt amplifikace se hydrolyzuje s BamHI a EcoRI, čistí přes agarový gel a jako 1,15 kb velký fragment DNA se klonuje v fágemidovém vektoru BluescriptII SK+ linearizovaném s BamHI a EcoRI, přičemž vznikne cysE plazmid pPC43 (obrázek 8).

Požadované násobné mutanty se připravují následujícím postupem:

1) Výroba cysE-IV-alely: Dvojitý mutant Val₂₃₇ + Ser₂₃₈

Vycházejíce z divokého typu plazmidu cysE pPC43 se ortospecifickou mutagenézí za použití mutačního oligonukleotidu cysE-Mut-1 (SEQ ID č.:5) (tabulka 3) zavede nejprve na pozici 238 glycinu serin a do přítom vyrobeného mutantu cysE pPC34 za použití mutačního oligonukleotidu cysE-Mut-3 (SEQ ID č.:6) (tabulka 3) na pozici 237 místo alaninu valin, přičemž vznikne cysE-IV-alela.

2) Výroba cysE-VIII-alely: Dvojitý mutant Val₂₃₇ + Ile₂₅₆

Vycházejíce z divokého typu plazmidu cysE pPC43 se ortospecifickou mutagenézí za použití mutačního oligonukleotidu cysE-Mut-6 (SEQ ID č.:7) (tabulka 3) zavede nejprve na pozici 256 za methionin izoleucin, přičemž vznikne cysE-I-alela. Do tohoto se za použití mutačního oligonukleotidu cysE-Mut-3 (SEQ ID č.:6) (tabulka 3) zavede na pozici 237 místo alaninu valin, přičemž vznikne alela cysE-VIII.

3) Výroba cysE-VI-alely : Dvojitý mutant Ser₂₃₈ + Ile₂₅₆

Do cysE-I-alely (mutant Ile₂₅₆) se s pomocí mutačního oligonukleotidu cysE-Mut-1 (SEQ ID č.:5) (tabulka 3) zavede na pozici 238 místo glycinu serin, přičemž vznikne cysE-VI-alela.

4) Výroba cysE-V-alely : Trojitý mutant Val₂₃₇ + Ser₂₃₈ + Ile₂₅₆

5 V cysE-IV-alele (dvojitý mutant Val₂₃₇ + Ser₂₃₈) se s pomocí mutačního oligonukleotidu cysE-Mut-6 (SEQ ID č.:7) (tabulka 3) nahradí na pozici 256 methionin izoleucinem. Přitom vznikne cysE-V-alela.

5) Výroba cysE-XIV-alely : Dvojitý mutant Ala₁₆₇ + Stop₂₅₁

10 Vycházejíce z alely-cysE-Del 255 (srovnej příklad 3) se za použití mutačního oligonukleotidu cysE-Mut-10 (SEQ ID č.:8) (tabulka 3) zavede na pozici 167 místo threoninu alanin, přičemž vznikne cysE-XIV-alela.

6) Výroba cysE-XVII-alely : Dvojitý mutant Asp₁₆₅ + Ala₁₆₇

15 Vycházejíce z cysE-III-alely (mutant Asp₁₆₅, srovnej příklad 1) se za pomoci oligonukleotidu cysE-Mut-10 (SEQ ID č.:8) (tabulka 3) nahradí na pozici 167 aminokyselina threonin alaninem. Přitom vznikne alela-cysE-XVII.

20 7) Výroba cysE-XXIII-alely : Trojitý mutant Ala₁₆₇ + Val₂₃₇ + Ser₂₃₈

Do cysE-IV-alely (dvojitý mutant Val₂₃₇ + Ser₂₃₈) se s pomocí mutačního oligonukleotidu cysE-Mut-10 (SEQ ID č.:8) (tabulka 3) zavede na pozici 167 místo threoninu alanin, přičemž vznikne cysE-XXIII-alela.

25 Správnost zavedených mutací se přezkoumá sekvenční analýzou DNA celého strukturního genu daného mutantu. Přehled násobných mutantů cysE* je uveden v tabulce 4.

30 Ke stanovení biochemických parametrů jako je enzymová aktivita a inhibiční konstanta K_i se postupuje analogicky, jako je popsáno v příkladu 1.

Tabulka 3: Oligonukleotidy, používané pro ortospecifické mutace k výrobě nových feedback-rezistentních cysE-alel

35

SEQ ID č	Mutační oligo-nukleotid	Sekvence nukleotidu	Pozice na obr. 6	Výměna amino-kyselin
5	cysE-Mut-1	viz A	928-945	Gly238->Ser238
6	cysE-Mut-3	viz B	913-933	Ala237->Val237
7	cysE-Mut-6	viz C	976-999	Met256->Ile256
8	cysE-Mut-10	viz D	709-732	Thr167->Ala167

Sekvence A: 5-GCCGCTAGCGTTCCGGCT-3

B: 5-CCGCCGCATACCACCGCCGTT-3

40 C: 5-CCATCAATGGATATAGACCAGCAT-3

D: 5-GTCGTTGGTGAAGCGGCGGTGATT-3

Tabulka 4: Feedback–rezistentní cysE–alela vzniklá cílenou ortospecifickou mutagenezí

Mutanty cysE	Výměna nukleo- tAsp (č.)	Výměna amino- kyseliny (č.)	K _i (μM)
cysEIV	GCT->CTT (932)	Ala237->Val237	40
	GGC->AGC (934)	Gly238->Ser238	
cysEV	GCT->GTT (932)	Ala237->Val237	10
	GGC->AGC (934)	Gly238->Ser238	
	ATG->ATA (990)	Met256->Ile256	
cysEVI	GGC->AGC (934)	Gly238->Ser238	10
	ATG->ATA (990)	Met256->Ile256	
cysEVIII	GCT->GTT (932)	Ala237->Val237	30
	ATG->ATA (990)	Met256->Ile256	
cysEXIV	ACG->GCG (721)	Thr167->Ala167	>1000
	ATG->TAG (988+989)	Met256->Stop256	
cysEXVII	GGT->GAT (716)	Gly165->Asp165	100
	ACG->GCG (721)	Thr167->Ala167	
cysEXXIII	ACG->GCG (721)	Thr167->Ala167	2300
	GCT->GTT (932)	Ala237->Val237	
	GGC->AGC (934)	Gly238->Ser238	

5

Příklad 3

Výroba serin–acetyltransferáz insenzitivních ke konečnému produktu řízeným zkrácením karboxylového konce enzymu pomocí PCR

10

Cílené změny jednotlivých nebo několika aminokyselin v rámci jednoho proteinu odpovídají stavu techniky a je možné je dobře provádět pomocí technologie PCR (Saiki a spol., 1988, Science 239, 487–491) za použití vhodných mutačních primerů na rovině DNA. Pro expresi změněných proteinů se získané produkty PCR klonují do vhodného plazmidového/hostitelského systému.

15

Za použití oligonukleotidového primeru uvedeného v Tabulce 5 se z genomické DNA *E. coli* kmene divokého typu W3110 (ATTC 28325) vyrobí cysE mutanty s delecemi v karboxylovém konci rozdílné délky, které jsou shrnuty v Tabulce 6.

20

PCR-experimenty se provádějí ve 30 cyklech v přítomnosti 200 μ M deoxynukleotidtrifosfátů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), po 1 μ M odpovídajícího oligonukleotidu „sense primer“ *cysE*-LHfw1 (SEQ ID č. 9) a odpovídajícího „antisense primer“ (SEQ ID č. 10–23) (Tabulka 5), 100 ng W3110-DNA, v reakčním pufru (10 mM tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01 % želatiny) a 5 jednotek teplotně stabilní polymerázy Vent-DNA (firma Biolabs) v termocykleru (Gone-ATAQ-Controler, firma Pharmacia) za následujících podmínek: 96 °C, 1,5 min; 62 °C, 1 minuta; 72 °C, 3 minuty.

cysE-LHfw1 (SEQ ID č. 9)

5 -TGGACCAGAGCTCTG~~g~~CTGGCGCATCGCTTCGGCGTTG-3

tučně značná část odpovídá bázím 9 až 30 ze sekvence *cysE* podle obrázku 6, podtržena jsou místa inkorporované BstXI/SacI.

15 Produkt vzniklý po amplifikaci se štěpí enzymy SacI a NsiI, následně se čistí přes agarózový gel a dané izolované *cysE*-DNA-fragmenty se ligují ve vektoru pACYC184-LH/DSM 10172 linearizovaném pomocí SacI a NsiI (viz obrázek 9). Daná násada ligázy se transformuje v cystein-auxotrofním kmenu *cysE* JM15 (CGSC # 5042) a provádí se selekce na minimálním médiu neobsahujícím cystein, ale obsahujícím tetracyklin (20 mg/l).

25 Plazmidy vzešlé z tohoto klonování se označují způsobem odpovídajícím míře jejich delece jako pACYC184/*cysE*-Del (srovnej obrázek 9 k plazmidové mapě). Stanovení enzymatické aktivity a inhibiční konstanty K_i a rovněž křížového vyživovacího testu se provádí analogicky, jak se popisuje v příkladu 1. Správnost zavedených delecí se potvrzuje sekvenční analýzou DNA.

Výsledky těchto šetření jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 5 Antisens-oligonukleotidy pro výrobu cysE-alely s delecemi v karboxylovém konci

SEQ ID č.	Mutační oligonukleotid	Sekvence oligonukleotidu	Pozice na obr.6
10	cysE-Del270	5'-CTCGATGCATTA CGTATTACCCATACCTCAAACTCTATGGTTAATACC-3'	1006-1032
11	cysE-Del268	5'-CTCGATGCATTA CGTATTACCTCAAACTGTATGGTTAATACCGTTGAA-3'	1000-1026
12	cysE-Del263	5'-CTCGATGCATTA CGTATTAAATACCGTTGAAATGCTGGTCCATATC-3'	985-1011
13	cysE-Del259	5'-CTCGATGCATTA CGTATTAAATGCTGGTCCATATCCATTTGATGGCTT-3'	973- 999
14	cysE-Del258	5'-CTCGATGCATTA CGTATTACTGGTCCATATCCATTTGATGGCTTATC-3'	970- 996
15	cysE-Del257	5'-CTCGATGCATTA CGTATTAGTCCATATCCATTTGATGGCTTATCGCTG-3'	966- 993
16	cysE-Del256	5'-CTCGATGCATTA CGTATTACATATCCATTTGATGGCTTATCGCTGTC-3'	964- 990
17	cysE-Del255	5'-CTCGATGCATTA CGTATTAAATCCATTTGATGGCTTATCGCTGTCGG-3'	961- 987
18	cysE-Del250	5'-CTCGATGCATTA CGTATTAAATCCGCTGCTGCTTTACCGACAATAACG-3'	946- 972
19	cysE-Del249	5'-CTCGATGCATTA CGTATTAGCTGCTGCTGCTTTACCGACAATAACGAGC-3'	943- 969
20	cysE-Del248	5'-CTCGATGCATTA CGTATTAGTCTGGTTTACCGACAATAACGAGCCGG-3'	940- 966
21	cysE-Del245	5'-CTCGATGCATTA CGTATTAAACCGACAATAACGAGCCGGAAACGCCAGC-3'	931- 957
22	cysE-Del239	5'-CTCGATGCATTA CGTATTAAACGCCAGCCGGCGGTGTTATCCGGCGG-3'	913- 939
23	cysE-Del227	5'-CTCGATGCATTA CGTATTACAGCACCCACGGAACCTGCGCCAATCTT-3'	877- 903

Tučně značená část odpovídá daným bázím v sekvenci podle obrázku 6, podtržená jsou místa NsiI.

5 Tabulka 6: Feedback–rezistentní cysE–alela vzniklá delecí v karboxylovém konci

Mutanty cysE	Počet deleto- vaných amino- kyselin	Terminální aminokyseliny	K _i (μm)
cysE-Del259	14	His259	7,5
cysE-Del258	15	Gln258	5
cysE-Del257	16	Asp257	7,5
cysE-Del256	17	Met256	12,5
cysE-Del255	18	Asp255	30
cysE-Del250	23	Asp250	20
cysE-Del249	24	Ser249	15
cysE-Del248	25	Asp248	12,5

10 Příklad 4

Transformace hostitelského kmenu *E. coli* se změněnou serin–acetyltransferázou k nadprodukcí L–cysteinu případně produktů příbuzných L–cysteinu v třepací baňce.

- 15 K výrobě se použije vektor pACYC184–LH, který se vyznačuje nízkým počtem kopií. K tomu se amplifikují cysE geny pomocí PCR na plazmidy z příkladů 1 a 2.

PCR–experimenty se provádějí ve 30 cyklech v přítomnosti 200 μM deoxynukleotidtrifosfátů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), po 1 μM oligonukleotidu „sense–primer“ cysE–LHfw1 (SEQ ID č.:9) a odpovídajícího „antisense primer“ cysE–LHrev1 (SEQ ID č. 24), 10 ng daného plazmidu DNA, v reakčním pufru (10 mM tris–HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01 % želatiny) a 5 jednotek teplozně stabilní polymerázy Vent–DNA (firma Biolabs) v termocykleru (Gene–ATAQ–Controler, firma Pharmacia) za následujících podmínek: 96 °C, 1,5 min; 62 °C, 1 minuta; 72 °C, 3 minuty.

25

cysE–LHfw1 (SEQ ID č.:9)

5 - TGGACCAGAGCTCTGGCTGGCGCATCGCTTCGGCGTTG-3

- 30 Podtržené báze odpovídají inkorporovaným štěpicím místům restričních enzymů BstXI a SacI, zbývající, tučně vtištěné báze odpovídají pozicím 10 až 30 sekvence cysE obrázku 6.

cysE–LHrev1 (SEQ ID č.:24),

5 -CTCGATGCATTACGTAGGGGTATCCGGGAGCGGTATTG- 3

Podtržené báze odpovídají inkorporovanému štěpicímu místu restričního enzymu NsiI, zbývající, tučně vtištěné báze odpovídají pozicím 1106 až 1127 sekvence *cysE* podle obrázku 6.

5

Produkt vzniklý po amplifikaci se štěpí enzymy SacI a NsiI, následně se čistí pomocí agarózo-
vého gelu a izolovaný fragment *cysE*-DNA se liguje do vektoru pACYC184-LH (DSM 10172)
linearizovaného SacI a NsiI.

10

Daná násada ligázy se transformuje v *cysE*-autotrofním kmenu *cysE* JM15 (CGSC # 5042) a
provede se selekce v minimálním médiu neobsahujícím cystein s obsahem tetracyklinu (20 mg/l).
Řada feedback-rezistentních *cysE*-plazmidů vzniklých z tohoto klonování se označuje jako
pACYC184/*cysE* (viz obrázek 9), přičemž každý klon je opatřen odpovídajícím číslem *cysE*-
alely.

15

Ke stanovení enzymatické aktivity, inhibiční konstanty K_i a vyživovacího testu se postupuje
analogicky, jak je popsáno v příkladu 1.

20

Ke stanovení produkční kapacity v kapalném médiu se očkuje 20 ml standardního produkčního
média jednotlivou kolonií a inkubuje se 48 hodin při teplotě 30 °C a 170 otáčkách za minutu.
Produkční médium sestává z 15 g/l glukózy, 0,08 g/l bacto-tryptonu, 0,04 g/l kvasinkového
extraktu, 5 mg/l vitamínu B1, 3 g/l KH_2PO_4 , 12 g/l K_2HPO_4 , 0,3 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/l
NaCl, 5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 14,7 mg/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 2 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 1 g/l Na_3 -citrátu $\times 2$
25 H_2O , 5 g/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ a 1 ml/l roztoku stopových prvků, 0,025 mg/l tetracyklinu. Roztok
stopových prvků sestává z 0,15 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 2,5 g/l H_3BO_3 , 0,7 g/l $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$,
0,25 g/l $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 1,6 g/l $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,3 g/l $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$. Po 24 a 48 hodinách se
vždy odebere vzorek (10 μl), přiměřeně se zředí a ve zbytku neobsahujícím buňky se stanovuje
koncentrace produktu kalorimetricky podle Gaitonde, M. K. (1967), Biochem. J. 104, 627–633.
Pro produkční kmeny JM15 s rozdílnými *cysE*-mutanty se přitom naměří koncentrace cysteinu
30 mezi 50 a 300 mg/l.

Příklad 5

35

Konstrukce chromozomálně kodované, feedback-rezistentní *cysE*-alely pomocí rekombinant-
ního *lambda*-profágu a produkce L-cysteinu nebo produktů odvozených od L-cysteinu v 1 l
fermentoru

40

K integraci do chromozomální „attachment site“ (*att-lambda*) se klonují *cysE*-alely *cysEIV*,
cysEX a *cysEXI* do plazmidu pRS551 (Simons a spol., 1987, Gene, 53, 85–96). K tomu se vždy
daná *cysE*-alela amplifikuje PCR z odpovídajícího *cysE*-plazmidu. Použité oligonukleotidy
cysE-fw1 a *cysE*-rev1 jsou popsány v příkladu 1. Amplifikace se provádí stejně, jako se popisuje
v příkladu 3. Získané fragmenty se štěpí EcoRI/BamHI, čistí přes agarózový gel a ligují do
vektoru pRS551 štěpeného v EcoRI/BamHI. Přitom vzniknou rekombinantní plazmidy
45 pRCysEIV, X a XI odvozené z vektoru pRS551.

50

Přípravou lyzátu na kmenu *recA*⁺ nesoucím pRScysE (příkladně YMC9, ATCC 3397) s fágem
*lambda*RS45 se in vivo vyrobí homologní rekombinací heterogenní *lambda*-lysát, který vedle
fágů *lambda*RS45 obsahuje také rekombinantní deriváty *lambda*RS45 nesoucí *cysE*-alelu
(Simons a spol., 1987, Gene, 53, 85–96).

K selekci na rekombinantní deriváty RS45 se použije *cysE* kmen JM15, který se nejprve infikuje
heterogenním *lambda*-lysátem a následně se plátuje na LB-miskách obsahujících kanamycin
(25 mg/l). Získané lysogenní, vůči kanamycinu rezistentní klony se potom testují z hlediska

jejich schopnosti růstu na deskách s minimálním médiem bez cysteinu. Vybere se vždy jeden cystein–protrofní klon a použije se k výrobě homogenního *cysE–lambda*–lyzátu (UV–indukcí, Simons a spol., 1987, Gene, 53, 85–96.

- 5 S těmito získanými homogenními *cysE–lambda*–lyzáty se infikuje kmen JM 15. Z toho vzešlé kmeny JM15att*lambda*::*cysE* se fermentují stejně, jako se popisuje v příkladu 6. Dané médium obsahuje místo tetracyklinu jako selekční činidlo vždy 25 mg/l kanamycinu.

10 Výtěžky cysteinu činí pro *cysEIV* 0,5, pro *cysEEX* 1,8 a pro *cysEEXI* 2,1 g/l viz Tabulka 7).

Příklad 6

- 15 Vliv rozdílných *cysE*–alel kódovaných plazmidem na produkci L–cysteinu nebo produktů odvozených od L–cysteinu v 1 l fermentoru za použití hostitelského kmenu JM15

20 20 ml média LB (1 % tryptonu, 0,5 % kvasinkového extraktu, 0,5 % NaCl) se ve 100 ml Erlenmeyerově baňce očkuje jednotlivou kolonií produkčního kmenu JM15 (CGSC#5042) transformovaného daným *cysE*–plazmidem.

- 20 Po 7 hodinové inkubaci v třepačce (150 otáček/minuta, 30 °C) se získané předkultury převedou do 100 ml média SM1. Médium SM1 obsahuje 5 g/l glukózy, 5 mg/l vitaminu B1, 3 g/l KH_2PO_4 , 12 g/l K_2HPO_4 , 0,3 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,1 g/l NaCl, 5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 14,7 mg/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 2 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 1 g/l Na_3 –citrátu $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$, a 1 ml/l roztoku stopových prvků, 25 mg/l tetracyklinu. Roztok stopových prvků sestává z 0,15 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 2,5 g/l H_3BO_3 , 0,7 g/l $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 0,25 g/l $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, 1,6 g/l $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ a 0,3 g/l $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$. Kultury se třepou v 1 l Erlenmeyerově baňce při teplotě 30 °C po dobu 17 hodin při 150 otáčkách za minutu. Po této inkubaci činí OD_{600} mezi 4 a 5. Další fermentace se provádí v pokusných reaktorech Biostat M firmy Braun–Melsungen. Použije se nádoba na kulturu s celkovým obsahem 2 l.

- 35 Fermentační médium obsahuje 15 g/l glukózy, 5 g/l NaCl, 0,3 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 15 mg/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 75 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 1 g/l Na_3 –citrátu $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 1,5 g/l KH_2PO_4 a 1 ml/l roztoku stopových prvků (viz výše), 5 mg/l vitaminu B1, 2,5 g/l extraktu kvasinek (Difco), 2,5 g/l tryptonu (Difco) a 25 mg/l tetracyklinu.

- 40 Koncentrace glukózy ve fermentoru se na počátku nastaví přičerpáním 700 g/l (w/v) roztoku glukózy (sterilovaný) na hodnotu 15 g/l a hodnota pH se nastaví přičerpáním 25 % roztoku NH_4OH na 7,0. Po dosažení OD_{600} 10 se přidá sterilní thiosulfátový zásobní roztok o koncentraci 100 g/l (w/v) 300 mg za hodinu. Do nádoby fermentoru se k naočkování přecherpe 100 ml předkultury. Počáteční objem činí asi 1 l. Kultury se nejprve míchají při 400 otáčkách za minutu a zavzdušňují se 1,5 vvm tlakového vzduchu sterilovaného přes sterilizační filtr. Fermentace se provádí při 30 °C.

- 45 Hodnota pH se automatickou korekcí pomocí 25% roztoku NH_4OH udržuje na 7,0. Nasycení kyslíkem ve fermentačním roztoku by nikdy nemělo klesnout pod 20 %, řídí se rychlostí míchání. Ve dvou až tříhodinových intervalech se zjišťuje obsah glukózy v živném roztoku, optická hustota a obsah cysteinu. Stanovení glukózy se provádí enzymaticky s pomocí glukózového analyzátoru firmy YSI. Koncentrace glukózy se kontinuálním dodáváním udržuje mezi 10 a 20 g/l.

Obsah produktu v médiu se stanovuje kalorimetricky ze zbytku vzorku neobsahujícího buňky podle Gaitonde, M. K. (1967), Biochem. J. 104, 627–633.

Po 44 až 50 hodinách se fermentace přeruší. Vyprodukovaná množství cysteinu v g/l po 48 hodinách jsou v Tabulce 7.

- 5 Tabulka 7: Výťažky cysteinu z produkčního kmenu JM 15, transformovaného rozdílnými cysE-Alleny (1 l fermentor)

cysE-alela	Výtěžek cysteinu [g/l] [48 h]
pACYC184/cysEIV	1,6
pACYC184/cysEV	1,3
pACYC184/cysEVI	1,4
pACYC184/cysEX	3,4
pACYC184/cysEXI	3,4
pACYC184/cysEXI I	1,2
pACYC184/cysEXIV	2,3
pACYC184/cysEXV	3,0
pACYC184/cysEXVI	2,2
pACYC184/cysEXXI I I	2,7
pACYC184/cysEDel1255	3,9

10

Příklad 7

Produkce L-cysteinu nebo produktů odvozených od L-cysteinu s bakteriemi Coryne

- 15 Feedback-rezistentní cysE-alely cysEIV, cysEX, cysEXI a cysEXIV (viz Tabulka 2, v příkladu 1) se restrikcími enzymy BamHI a EcoRI (firma Boehringer Mannheim) štěpí z jejich odpovídajících plazmidů a vždy 1,15 kb velký fragment DNA se vyčistí přes agarový gel a izoluje. V daném fragmentu DNA se působením Klenowova fragmentu DNA polymerázy I z *E. coli* (firma Boehringer Mannheim) zatupí konce. Vektor pWST1 se hydrolyzuje restrikcími enzymem SmaI (firma Boehringer Mannheim) a spojí se s fragmentem DNA s tupým koncem pomocí T4 DNA ligázy. Vektor pWST1 je „shuttle“ vektor *E. coli*/Coryne a může se replikovat jak v *E. coli* tak i v bakteriích Coryne. Replikon z bakterií Coryne pochází z kmene *Corynebacterium glutamicum* ATCC 19223. Výroba vektoru pWST1 se popisuje v US 4 965 197. Použije se ligační násada, aby se transformoval pro cystein auxotrofní mutant JM15. Komplementující plazmidy se označují způsobem odpovídajícím jejich inzertovaným cysE-alela, pWST1-cysEIV, pWST1-cysEX, pWST1-cysEXI a pWST1-cysEXIV.

- 30 Plazmidy pWST1-cysE se použijí k transformaci *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21851. Transformace se provádí elektroporací technikou podrobně popsanou v Liebl, W. a spol., 1989, FEMS Microbial, Letters, 65, 299–304. Selektce rekombinantních klonů se provádí přes plazmidově kódovanou kanamycinovou rezistenci na agarových deskách s 25 mg/l kanamycinu.

Fermentace se provádí za podmínek, které jsou analogické podmínkám popsaným v příkladu 6 s tou výjimkou, že místo tetracyklinu se jako selekční antibiotikum použije kanamycin v koncentraci 50 mg/l.

- 5 Při fermentaci se ukazuje, že kmen, který na plazmidu nese cysEXI-alelu, dosahuje nejvyšších výtěžků cysteinu.

SEKVENČNÍ PROTOKOL

10

(1) Všeobecné informace

(i) Přihlašovatel:

- 15 (A) Jméno: Consortium fuer elektrochemische Industrie, GmbH
 (B) Ulice: Zielstattstr. 20
 (C) Místo: Muenchen
 (E) Země: Germany
 (F) Poštovní směrovací číslo: 81379
 (G) Telefon: 085/748440
 20 (H) Telefax: 089/74844350
 (I) Telex: 5215553 cons d

25

- (ii) Název přihlášky: Způsob výroby O-acetylserinu, L-cysteinu a produktů příbuzných L-cysteinu

- (iii) Počet sekvencí: 24

(iv) Forma uložená v počítači:

- 30 (A) Nosič dat: pružný disk
 (B) Počítač: IBM PC kompatibilní
 (C) Provozní systém: PC-DOS/MS-DOS
 (D) Software: PatentIn Release #1.0, verze #1,30 (EPA)

35 (2) Informace k SEQ ID č. 1:

(i) Sekvenční charakteristika:

- 40 (A) Délka: 273 aminokyselin
 (B) Druh. aminokyselina
 (C) Struktura:
 (D) Topologie: lineární

(ii) Druh molekul: protein

45 (vi) Prvotní původ:

- (A) Organismus: Escherichia Coli
 (B) Kmen: W3110

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 1:

50

Met Ser Cys Glu Glu Leu Glu Ile Val Trp Asn Asn Ile Lys Ala
 1 5 10 15
 Glu Ala Arg Thr Leu Ala Asp Cys Glu Pro Met Leu Ala Ser Phe
 20 25 30
 Tyr His Ala Thr Leu Leu Lys His Glu Asn Leu Gly Ser Ala Leu
 35 40 45
 Ser Tyr Met Leu Ala Asn Lys Leu Ser Ser Pro Ile Met Pro Ala
 50 55 60
 Ile Ala Ile Arg Glu Val Val Glu Glu Ala Tyr Ala Ala Asp Pro
 65 70 75
 Glu Met Ile Ala Ser Ala Ala Cys Asp Ile Gln Ala Val Arg Thr
 80 85 90
 Arg Asp Pro Ala Val Asp Lys Tyr Ser Thr Pro Leu Leu Tyr Leu
 95 100 105
 Lys Gly Phe His Ala Leu Gln Ala Tyr Arg Ile Gly His Trp Leu
 110 115 120
 Trp Asn Gln Gly Arg Arg Ala Leu Ala Ile Phe Leu Gln Asn Gln
 125 130 135
 Val Ser Val Thr Phe Gln Val Asp Ile His Pro Ala Ala Lys Ile
 140 145 150
 Gly Arg Gly Ile Met Leu Asp His Ala Thr Gly Ile Val Val Gly
 155 160 165
 Glu Thr Ala Val Ile Glu Asn Asp Val Ser Ile Leu Gln Ser Val
 170 175 180
 Thr Leu Gly Gly Thr Gly Lys Ser Gly Gly Asp Arg His Pro Lys
 185 190 195
 Ile Arg Glu Gly Val Met Ile Gly Ala Gly Ala Lys Ile Leu Gly
 200 205 210
 Asn Ile Glu Val Gly Arg Gly Ala Lys Ile Gly Ala Gly Ser Val
 215 220 225
 Val Leu Gln Pro Val Pro Pro His Thr Thr Ala Ala Gly Val Pro
 230 235 240
 Ala Arg Ile Val Gly Lys Pro Asp Ser Asp Lys Pro Ser Met Asp
 245 250 255
 Met Asp Gln His Phe Asn Gly Ile Asn His Thr Phe Glu Tyr Gly
 260 265 270
 Asp Gly Ile

(2) Informace k SEQ ID č. 2:

- (i) Sekvenční charakteristika:
- 5 (A) Délka: 1135 párů bází
(B) Druh: nukleotid
(C) Struktura: dvouřetězcová
(D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Druh molekul: Genom–DNA
- (vi) Prvotní původ:
- (A) Organismus: Escherichia Coli
(B) Kmen: W3110
- 15 (vii) Bezprostřední původ:
- (B) Clon(E): pPC43
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 2:
- 20

```

TCCGCGAACT GCGGCATCGC TTCGGCGTTG AAATGCCAAT AACCGAGGAA ATTTATCAAG      60
TATTATATTG CGGAAAAAAC GCGCGCGAGG CAGCATTGAC TTTACTAGGT CGTGCACGCA      120
AGGACGAGCG CAGCAGCCAC TAACCCAGG GAACCTTTGT TACCGCTATG ACCCGGCCCG      180
CGCAGAACGG GCCGGTCATT ATCTCATCGT GTGGAGTAAG CAATGTCGTG TGAAGAACTG      240
GAAATTGTCT GGAACAATAT TAAAGCCGAA GCCAGAACGC TGGCGGACTG TGAGCCAATG      300
CTGGCCAGTT TTTACCACGC GACGCTACTC AAGCACGAAA ACCTTGGCAG TGCCTGAGC      360
TACATGCTGG CGAACAAGCT GTCATCGCCA ATTATGCCTG CTATTGCTAT CCGTGAAGTG      420
GTGGAAGAAG CCTACGCCGC TGACCCGGAA ATGATCGCCT CTGCGGCCTG TGATATTCAG      480
GCGGTGCGTA CCCGCGACCC GGCAGTCGAT AAATACTCAA CCCCGTTGTT ATACCTGAAG      540
GGTTTTCATG CCTTGCAGGC CTATCGCATC GGTCACTGGT TGTGGAATCA GGGGCGTCGC      600
GCACTGGCAA TCTTTCTGCA AAACCAGGTT TCTGTGACGT TCCAGGTCGA TATTCACCCG      660
GCAGCAAAAA TTGGTCGCGG TATCATGCTT GACCACGCGA CAGGCATCGT CGTTGGTGAA      720
ACGGCGGTGA TTGAAAACGA CGTATCGATT CTGCAATCTG TGACGCTTGG CGGTACGGGT      780
AAATCTGGTG GTGACCGTCA CCCGAAAATT CGTGAAGGTG TGATGATTGG CGCGGGCGCG      840
AAAATCCTCG GCAATATTGA AGTTGGGCGC GGCGCGAAGA TTGGCGCAGG TTCCGTGGTG      900
CTGCAACCGG TGCCGCCGCA TACCACCGCC GCTGGCGTTC CGGCTCGTAT TGTCGGTAAA      960
CCAGACAGCG ATAAGCCATC AATGGATATG GACCAGCATT TCAACGGTAT TAACCATACA     1020
TTTGAGTATG GGGATGGGAT CTAATGTCCT GTGATCGTGC CGGATGCGAT GTAATCATCT     1080
ATCCGGCCTA CAGTAACTAA TCTCTCAATA CCGCTCCCGG ATACCCCAAC TGTCG      1135

```

(2) Informace k SEQ ID č. 3:

- (i) Sekvenční charakteristika:
 5 (A) Délka: 42 párů bází
 (B) Druh: nukleotid
 (C) Struktura: jednořetězcová
 (D) Topologie: lineární
- 10 (ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny
 (A) Popis: /desc = „oligonucleotide“
- (vii) Bezprostřední původ:
 (A) Knihovna: syntetická
 15 (B) Clon(E): cysE3-fw1
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 3:

GCCTGGATCC TGCAGTCGAC CTGGCGCATC GCTTCGGCGT TG

20

(2) Informace k SEQ ID č. 4:

- (i) Sekvenční charakteristika:
 (A) Délka: 41 párů bází
 25 (B) Druh: nukleotid
 (C) Struktura: jednořetězcová
 (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny
 30 (A) Popis: /desc = „oligonucleotide“
- (vii) Bezprostřední původ:
 (A) Knihovna: syntetická
 (B) Clon(E): cysE-rev1
 35
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 4:

GTAGGAGCTC TGCAGAATTC GGGTATCCGG GAGCGGTATT G

40

(2) Informace k SEQ ID č. 5:

- (i) Sekvenční charakteristika:
 (A) Délka: 18 párů bází
 45 (B) Druh: nukleotid
 (C) Struktura: jednořetězcová
 (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny
 50 (A) Popis: /desc = „oligonucleotide“
- (vii) Bezprostřední původ:
 (A) Knihovna: syntetická

(B) Clon(E): cysE–Mut–1

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 5:

5 **GCCGCTAGCG TTCCGGCT**

(2) Informace k SEQ ID č. 6:

- 10 (i) Sekvenční charakteristika:
 (A) Délka: 21 párů bází
 (B) Druh: nukleotid
 (C) Struktura: jednořetězcová
 (D) Topologie: lineární
- 15 (ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny
 (A) Popis: /desc = „oligonucleotide“
- (vii) Bezprostřední původ:
 20 (A) Knihovna: syntetická
 (B) Clon(E): cysE–Mut–3

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 6:

25 **CCGCCGCATA CCACCGCCGT T**

(2) Informace k SEQ ID č. 7:

- 30 (i) Sekvenční charakteristika:
 (A) Délka: 24 párů bází
 (B) Druh: nukleotid
 (C) Struktura: jednořetězcová
 (D) Topologie: lineární
- 35 (ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny
 (A) Popis: /desc = „oligonucleotide“
- (vii) Bezprostřední původ:
 40 (A) Knihovna: syntetická
 (B) Clon(E): cysE–Mut–6

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 7:

45 **CCATCAATGG ATATAGACCA GCAT**

(2) Informace k SEQ ID č. 8:

- 50 (i) Sekvenční charakteristika:
 (A) Délka: 24 párů bází
 (B) Druh: nukleotid
 (C) Struktura: jednořetězcová
 (D) Topologie: lineární

- (ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny
(A) Popis: /desc = „oligonucleotide“

- 5 (vii) Bezprostřední původ:
(A) Knihovna: syntetická
(B) Clon(E): cysE–Mut–10

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 8:
10

GTCGTTGGTG AAGCGGCGGT GATT

- (2) Informace k SEQ ID č. 9:
15

- (i) Sekvenční charakteristika:
(A) Délka: 38 párů bází
(B) Druh: nukleotid
(C) Struktura: jednořetězcová
20 (D) Topologie: lineární

- (ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny
(A) Popis: /desc = „oligonucleotide“

- 25 (vii) Bezprostřední původ:
(A) Knihovna: syntetická
(B) Clon(E): cysE–LHfw1

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 9:
30

TGGACCAGAG CTCTGGCTGG CGCATCGCTT CGGCGTTG

- (2) Informace k SEQ ID č. 10:
35

- (i) Sekvenční charakteristika:
(A) Délka: 46 párů bází
(B) Druh: nukleotid
(C) Struktura: jednořetězcová
40 (D) Topologie: lineární

- (ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny
(A) Popis: /desc = „oligonucleotide“

- 45 (vii) Bezprostřední původ:
(A) Knihovna: syntetická
(B) Clon(E): cysE–De1270

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 10:
50

CGCGATGCAT TACGTATTAC CCATACTCAAA ATCTATGGTT AATACC

(2) Informace k SEQ ID č. 11:

(i) Sekvenční charakteristika:

(A) Délka: 46 párů bází

(B) Druh: nukleotid

(C) Struktura: jednořetězcová

(D) Topologie: lineární

(ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny

(A) Popis: /desc = „oligonucleotide“

(vii) Bezprostřední původ:

(A) Knihovna: syntetická

(B) Clon(E): cysE–De1286

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 11:

CTCGATGCAT TACGTATTAC TCAAATGTAT GGTAAATACC GTTGAA

(2) Informace k SEQ ID č. 12:

(i) Sekvenční charakteristika:

(A) Délka: 46 párů bází

(B) Druh: nukleotid

(C) Struktura: jednořetězcová

(D) Topologie: lineární

(ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny

(A) Popis: /desc = „oligonucleotide“

(vii) Bezprostřední původ:

(A) Knihovna: syntetická

(B) Clon(E): cysE–De1263

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 12:

CTCGATGCAT TACGTATTAA ATACCGTTGA AATGCTGGTC CATATC

(2) Informace k SEQ ID č. 13:

(i) Sekvenční charakteristika:

(A) Délka: 46 párů bází

(B) Druh: nukleotid

(C) Struktura: jednořetězcová

(D) Topologie: lineární

(ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny

(A) Popis: /desc = „oligonucleotide“

(vii) Bezprostřední původ:

(A) Knihovna: syntetická

(B) Clon(E): cysE–De1259

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 13:

CTCGATGCAT TACGTATTAA TGCTGGTCCA TATCCATTGA TGGCTT

5

(2) Informace k SEQ ID č. 14:

(i) Sekvenční charakteristika:

- 10 (A) Délka: 46 párů bází
(B) Druh: nukleotid
(C) Struktura: jednořetězcová
(D) Topologie: lineární

15 (ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny

(A) Popis: /desc = „oligonucleotide“

(vii) Bezprostřední původ:

- 20 (A) Knihovna: syntetická
(B) Clon(E): cysE–De1258

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 14:

CTCGATGCAT TACGTATTAC TGGTCCATAT CCATTGATGG CTTATC

25

(2) Informace k SEQ ID č. 15:

(i) Sekvenční charakteristika:

- 30 (A) Délka: 47 párů bází
(B) Druh: nukleotid
(C) Struktura: jednořetězcová
(D) Topologie: lineární

35 (ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny

(A) Popis: /desc = „oligonucleotide“

(vii) Bezprostřední původ:

- 40 (A) Knihovna: syntetická
(B) Clon(E): cysE–De1257

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 15:

CGCGATGCAT TACGTATTAG TCCATATCCA TTGATGGCTT ATCGCTG

45

(2) Informace k SEQ ID č. 16:

(i) Sekvenční charakteristika:

- 50 (A) Délka: 46 párů bází
(B) Druh: nukleotid
(C) Struktura: jednořetězcová
(D) Topologie: lineární

- (ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny
(A) Popis: /desc = „oligonucleotide“

- 5 (vii) Bezprostřední původ:
(A) Knihovna: syntetická
(B) Clon(E): cysE–De1256

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 16:

10 **CTCGATGCAT TACGTATTAC ATATCCATTG ATGGCTTATC GCTGTC**

- (2) Informace k SEQ ID č. 17:

- 15 (i) Sekvenční charakteristika:
(A) Délka: 46 párů bází
(B) Druh: nukleotid
(C) Struktura: jednořetězcová
(D) Topologie: lineární

- 20 (ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny
(A) Popis: /desc = „oligonucleotide“

- 25 (vii) Bezprostřední původ:
(A) Knihovna: syntetická
(B) Clon(E): cysE–De1255

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 17:

30 **CTCGATGCAT TACGTATTAA TCCATTGATG GCTTATCGCT GTCTGG**

- (2) Informace k SEQ ID č. 18:

- 35 (i) Sekvenční charakteristika:
(A) Délka: 46 párů bází
(B) Druh: nukleotid
(C) Struktura: jednořetězcová
(D) Topologie: lineární

- 40 (ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny
(A) Popis: /desc = „oligonucleotide“

- 45 (vii) Bezprostřední původ:
(A) Knihovna: syntetická
(B) Clon(E): cysE–De1250

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 18:

50 **CTCGATGCAT TACGTATTAA TCGCTGTCTG GTTTACCGAC AATACG**

- (2) Informace k SEQ ID č. 19:

- (i) Sekvenční charakteristika:
 (A) Délka: 46 párů bází
 (B) Druh: nukleotid
 (C) Struktura: jednořetězcová
 5 (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny
 (A) Popis: /desc = „oligonucleotide“
- 10 (vii) Bezprostřední původ:
 (A) Knihovna: syntetická
 (B) Clon(E): cysE–De1249

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 19:
 15

CTCGATGCAT TACGTATTAG CTGTCTGGTT TACCGACAAT ACGAGC

- (2) Informace k SEQ ID č. 20:
 20
- (i) Sekvenční charakteristika:
 (A) Délka: 46 párů bází
 (B) Druh: nukleotid
 (C) Struktura: jednořetězcová
 25 (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny
 (A) Popis: /desc = „oligonucleotide“
- 30 (vii) Bezprostřední původ:
 (A) Knihovna: syntetická
 (B) Clon(E): cysE–De1248

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 20:
 35

CTCGATGCAT TACGTATTAG TCTGGTTTAC CGACAATACG AGCCGG

- (2) Informace k SEQ ID č. 21:
 40
- (i) Sekvenční charakteristika:
 (A) Délka: 46 párů bází
 (B) Druh: nukleotid
 (C) Struktura: jednořetězcová
 45 (D) Topologie: lineární
- (ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny
 (A) Popis: /desc = „oligonucleotide“
- 50 (vii) Bezprostřední původ:
 (A) Knihovna: syntetická
 (B) Clon(E): cysE–De1245

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 21:

CTCGATGCAT TACGTATTAA CCGACAATAC GAGCCGGAAC GCCAGC

5

(2) Informace k SEQ ID č. 22:

(i) Sekvenční charakteristika:

(A) Délka: 46 párů bází

10 (B) Druh: nukleotid

(C) Struktura: jednořetězcová

(D) Topologie: lineární

(ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny

15 (A) Popis: /desc = „oligonucleotide“

(vii) Bezprostřední původ:

(A) Knihovna: syntetická

(B) Clon(E): cysE–De1239

20

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 22:

CTCGATGCAT TACGTATTAA ACGCCAGCGG CGGTGGTATC CGGCGG

25

(2) Informace k SEQ ID č. 23:

(i) Sekvenční charakteristika:

(A) Délka: 46 párů bází

30 (B) Druh: nukleotid

(C) Struktura: jednořetězcová

(D) Topologie: lineární

(ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny

35 (A) Popis: /desc = „oligonucleotide“

(vii) Bezprostřední původ:

(A) Knihovna: syntetická

(B) Clon(E): cysE–De1227

40

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 23:

CTCGATGCAT TACGTATTAC AGCACCACGG AACCTGCGCC AATCTT

45

(2) Informace k SEQ ID č. 24:

(i) Sekvenční charakteristika:

(A) Délka: 38 párů bází

50 (B) Druh: nukleotid

(C) Struktura: jednořetězcová

(D) Topologie: lineární

- (ii) Druh molekul: Jiné nukleové kyseliny
(A) Popis: /desc = „oligonucleotide“

- (vii) Bezprostřední původ:

- 5 (A) Knihovna: syntetická
(B) Clon(E): cysE-LHrev1

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID č. 24:

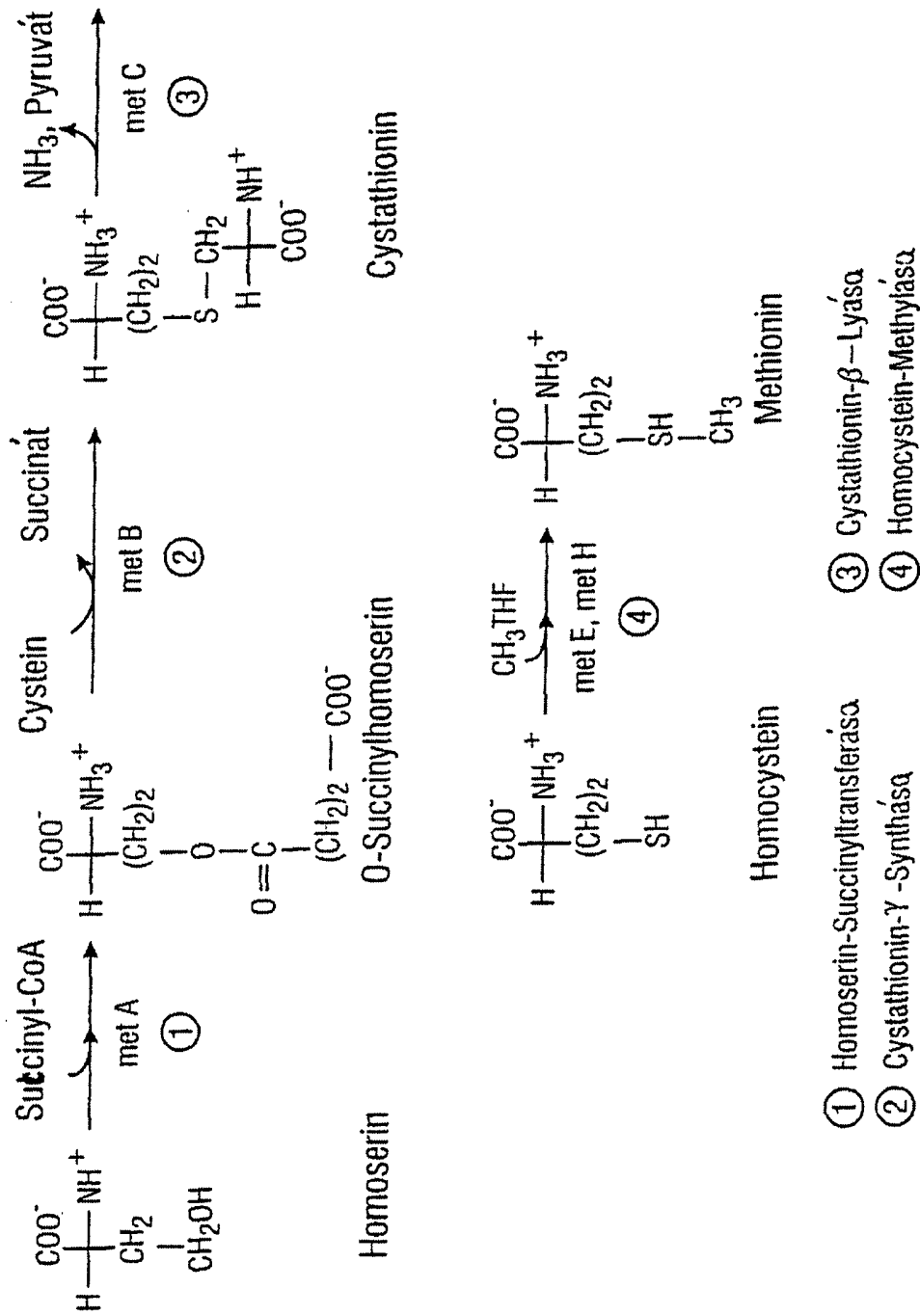
10 CTCGATGCAT TACGTAGGGG TATCCGGGAG CGGTATTG

15 PATENTOVÉ NÁROKY

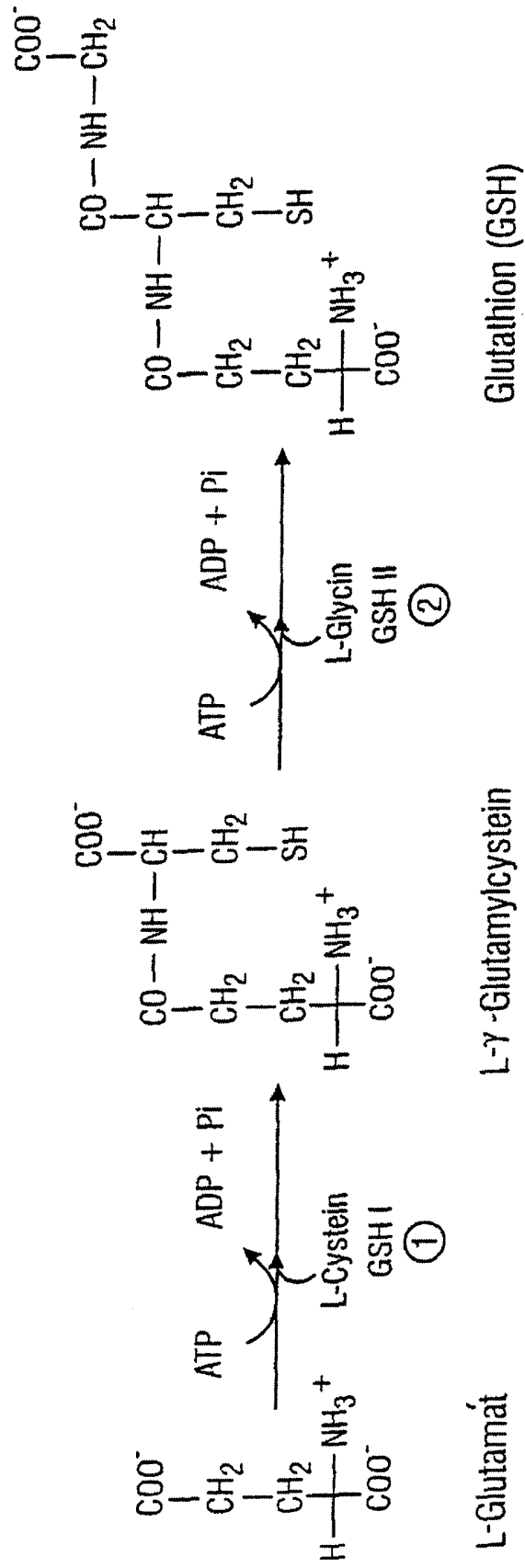
1. Serin-acetyltransferáza, která ve srovnání s divokým typem enzymu vykazuje sníženou
citlivost vůči inhibitoru L-cysteinu a jejíž proteinová sekvence ve srovnání se sekvencí divokého
20 typu vykazuje nejméně jednu mutaci nebo deleci, ve které se mutace nachází v sekvenční oblasti
od aminokyseliny v pozici 97 až včetně aminokyseliny v pozici 273 nebo se delece nachází
v sekvenční oblasti karboxylového konce od aminokyseliny v pozici 248 až včetně
aminokyseliny 259, přičemž pozice jedna je iniciační methionin z obrázku 5 (SEQ ID č.: 1) a
přičemž je vyloučena mutace Met na Ile v pozici 256, a že serin-acetyltransferáza má inhibiční
25 konstantu K_i 0,02 až 2,3 mM v přítomnosti 1 mM L-serinu a 0,1 mM acetyl-CoA.
2. Serin-acetyltransferáza podle nároku 1, jejíž proteinová sekvence zahrnuje výměnu amino-
kyselin nejméně jednoho z mutantů cysE uvedených v tabulce 1a nebo deleci podle tabulky 1b.
- 30 3. Sekvence DNA, která kóduje serin-acetyltransferázu podle jednoho z nároků 1 nebo 2.
4. Sekvence DNA, která kóduje serin-acetyltransferázu podle jednoho z nároků 1 nebo 2, která
ve srovnání s divokým typem enzymu vykazuje sníženou citlivost vůči inhibitoru L-cysteinu,
obsahující nejméně jednu mutaci od bp 510 do bp 1040, přičemž bp 1 je první báze podle
35 obrázku 6 (SEQ ID č.: 2), přičemž je vyloučena mutace guaninu na adenin, thymidin nebo
cytosin v pozici 990.
5. Mikroorganismus, který má metabolismus cysteinu deregulovaný nejméně jednou sekvencí
DNA podle nároků 3 nebo 4.
- 40 6. Způsob výroby O-acetylserinu, L-cysteinu a sloučenin odvozených od L-cysteinu,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že se mikroorganismy podle nároku 5 kultivují v živném médiu.
7. Způsob podle nároku 6,
45 **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že živné médium obsahuje dostatečné množství donoru síry.
8. Způsob podle nároku 7,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako donor síry použije thiosulfát.

50

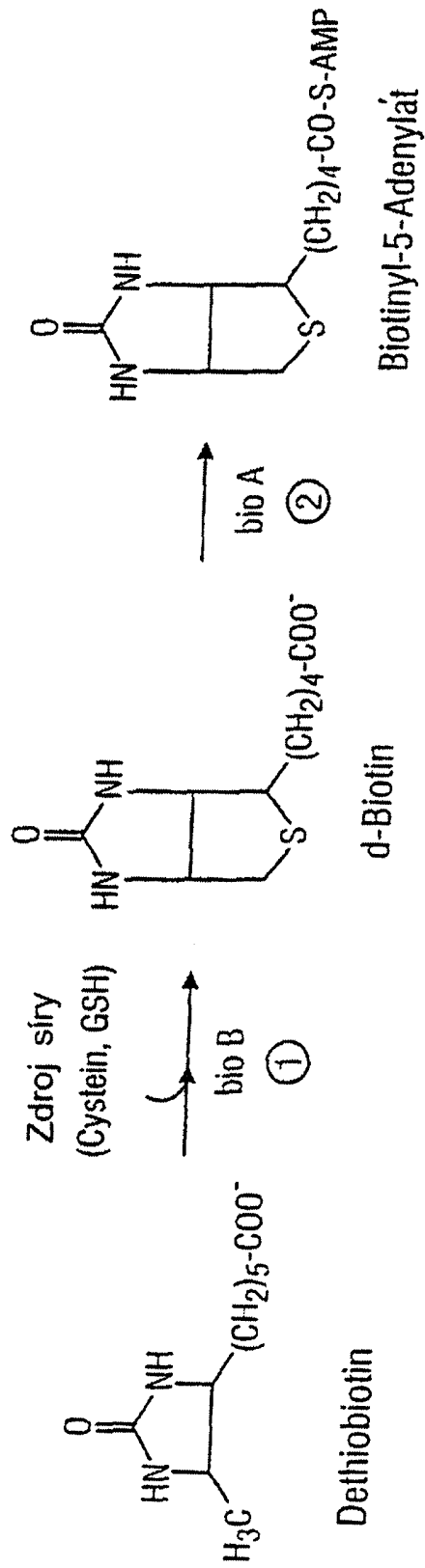
Obr. 1

CH₃THF: N5-Methyltetrahydrofolát

Obr. 2

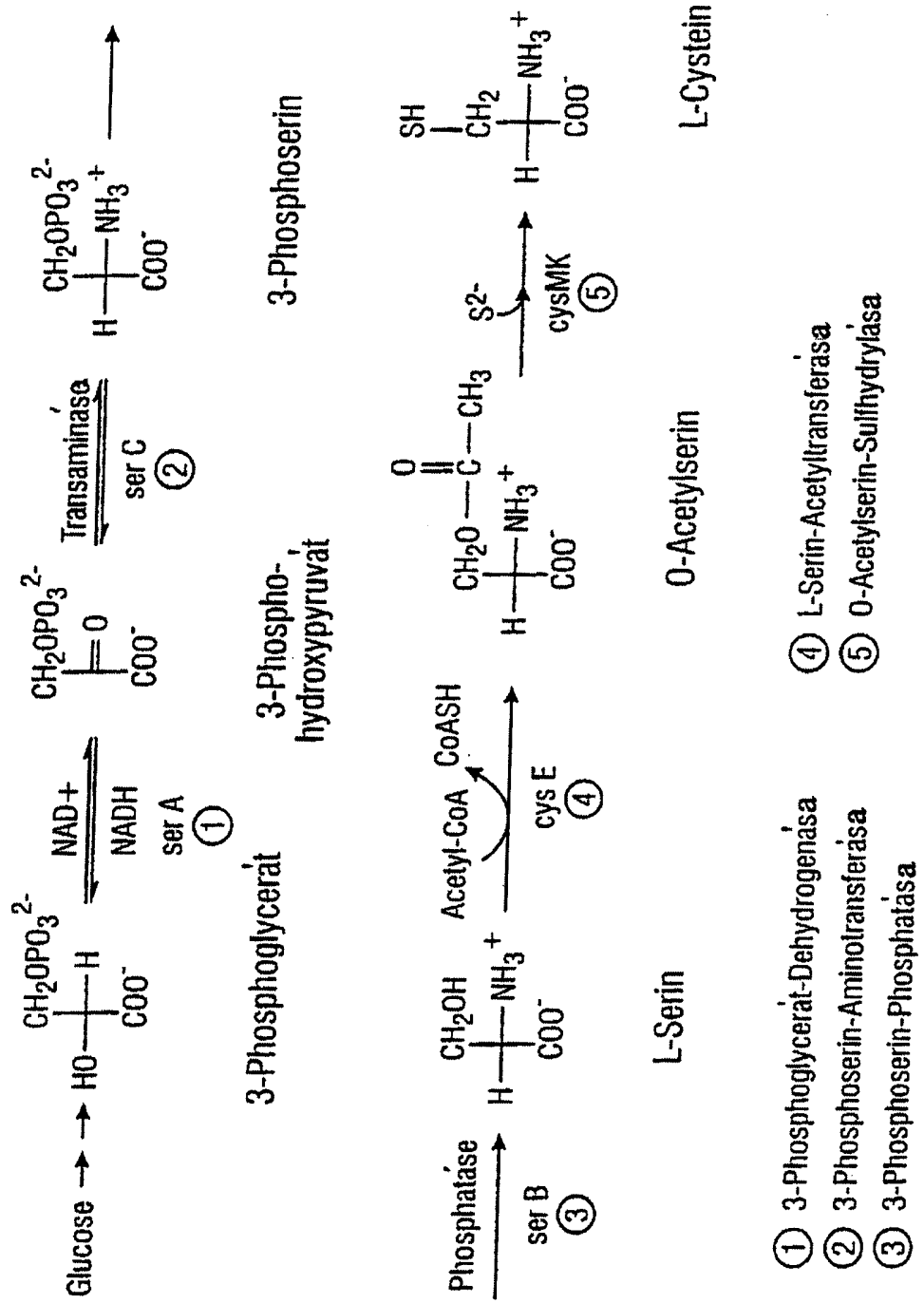


Obr. 3



- ① Biotin Synthetasa
- ② Biotin Holoenzym-Synthetasa

Obr. 4

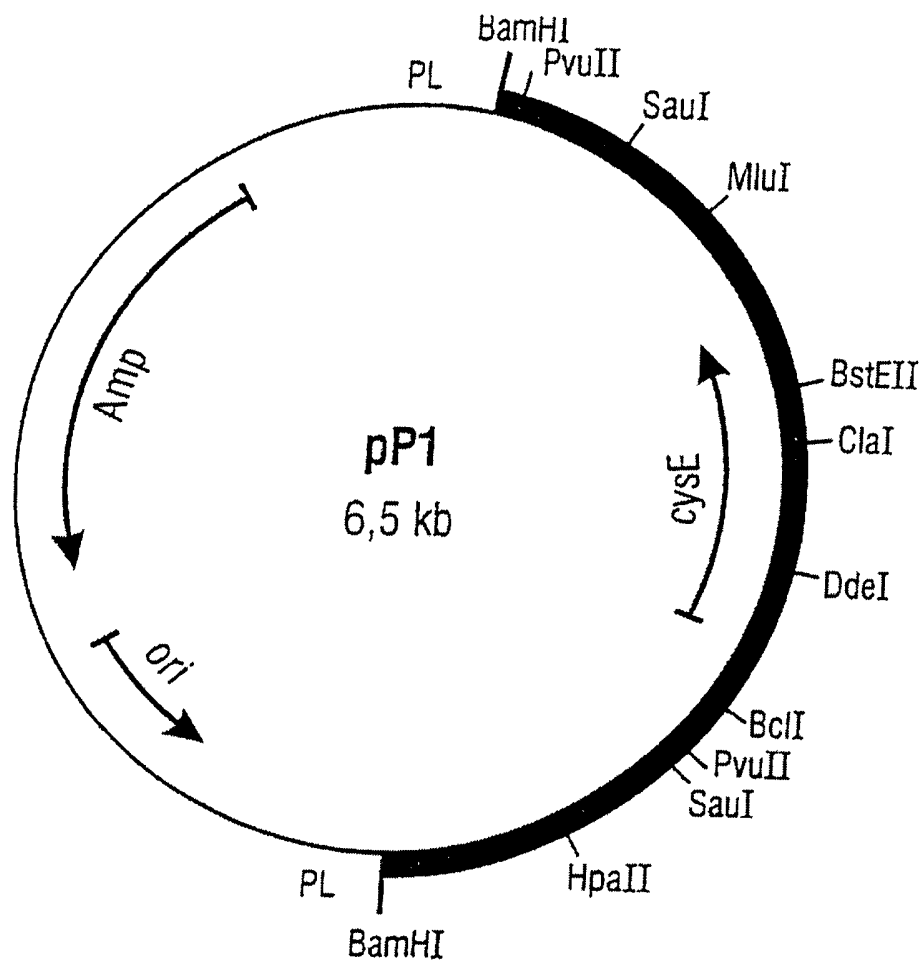


Obr. 5

1 MSCEELEIVW NNIKAEARTL ADCEPMLASF YHATLLKHEN LGSALSYMLA
51 NKLSSPIMPA IAIREVVEEA YAADPEMIAS AACDIQAVRT RDPAVDKYST
101 PLLYLKGFHA LQAYRIGHWL WNQGRRALAI FLQNQVSVTF QVDIHPAAKI
151 GRGIMLDHAT GIVVGETAVI ENDVSILOSV TLGGTGKSGG DRHPKIREGV
201 MIGAGAKILG NIEVGRGAKI GAGSVVLQPV PPHTTAAGVP ARIVGKPDSD
251 KPSMDMDQHF NGINHTFEYG DGI

Obr. 6

1 TCCGCGAACTGGCGCATCGCTTCGGCGTTGAAATGCCAATAACCGAGGAAATTTATCAAG
 61 TATTATATTGCGGAAAAACGCGCGCGAGGCAGCATTGACTTTACTAGGTTCGTGCACGCA
 121 AGGACGAGCGCAGCAGCCACTAACCCAGGGAACCTTTGTTACCGCTATGACCCGGCCCCG
 181 CGCAGAACGGGCCGGTCATTATCTCATCGTGTGGAGTAAGCAATGTCGTGTGAAGAACTG
 1 MetSerCysGluGluLeu
 241 GAAATTGTCTGGAACAATATTAAAGCCGAAGCCAGAACGCTGGCGGACTGTGAGCCAATG
 7 GluIleValTrpAsnAsnIleLysAlaGluAlaArgThrLeuAlaAspCysGluProMet
 301 CTGGCCAGTTTTTACCACGCGACGCTACTCAAGCACGAAAACCTTGGCAGTGCCTGAGC
 27 LeuAlaSerPheTyrHisAlaThrLeuLeuLysHisGluAsnLeuGlySerAlaLeuSer
 361 TACATGCTGGCGAACAAGCTGTCATCGCCAATTATGCCTGCTATTGCTATCCGTGAAGTG
 47 TyrMetLeuAlaAsnLysLeuSerSerProIleMetProAlaIleAlaIleArgGluVal
 421 GTGGAAGAAGCCTACGCCGCTGACCCGAAATGATCGCCTCTGCGGCCTGTGATATTCAG
 67 ValGluGluAlaTyrAlaAlaAspProGluMetIleAlaSerAlaAlaCysAspIleGln
 481 GCGGTGCGTACCCGCGACCCGCGAGTCGATAAATACTCAACCCCGTTGTTATACCTGAAG
 87 AlaValArgThrArgAspProAlaValAspLysTyrSerThrProLeuLeuTyrLeuLys
 541 GGTTCATGCCTTGCAGGCCTATCGCATCGGTCACTGGTTGTGGAATCAGGGGCGTCGC
 107 GlyPheHisAlaLeuGlnAlaTyrArgIleGlyHisTrpLeuTrpAsnGlnGlyArgArg
 601 GCACTGGCAATCTTTCTGCAAAACCAGGTTTCTGTGACGTTCCAGGTCGATATTCACCCG
 127 AlaLeuAlaIlePheLeuGlnAsnGlnValSerValThrPheGlnValAspIleHisPro
 661 GCAGCAAAAATTGGTCGCGGTATCATGCTTGACCACGCGACAGGCATCGTCGTTGGTGAA
 147 AlaAlaLysIleGlyArgGlyIleMetLeuAspHisAlaThrGlyIleValValGlyGlu
 721 ACGGCGGTGATTGAAAACGACGTATCGATTCTGCAATCTGTGACGCTTGGCGGTACGGGT
 167 ThrAlaValIleGluAsnAspValSerIleLeuGlnSerValThrLeuGlyGlyThrGly
 781 AAATCTGGTGGTGACCGTCACCCGAAAATTCTGTGAAGGTGTGATGATTGGCGCGGGCGCG
 187 LysSerGlyGlyAspArgHisProLysIleArgGluGlyValMetIleGlyAlaGlyAla
 841 AAAATCCTCGGCAATATTGAAGTTGGGCGCGCGCGAAGATTGGCGCAGGTTCCGTGGTG
 207 LysIleLeuGlyAsnIleGluValGlyArgGlyAlaLysIleGlyAlaGlySerValVal
 901 CTGCAACCGGTGCCGCCGCATACCACCGCCGCTGGCGTTCCGGCTCGTATTGTGCGGTAAA
 227 LeuGlnProValProProHisThrThrAlaAlaGlyValProAlaArgIleValGlyLys
 961 CCAGACAGCGATAAGCCATCAATGGATATGGACCAGCATTTCAACGGTATTAACCATACA
 247 ProAspSerAspLysProSerMetAspMetAspGlnHisPheAsnGlyIleAsnHisThr
 1021 TTTGAGTATGGGGATGGGATCTAATGTCTGTGATCGTGCCGGATGCGATGTAATCATCT
 267 PheGluTyrGlyAspGlyIleEnd
 1081 ATCCGGCCTACAGTAACTAATCTCTCAATACCGCTCCCGGATACCCCAACTGTCTG·1135

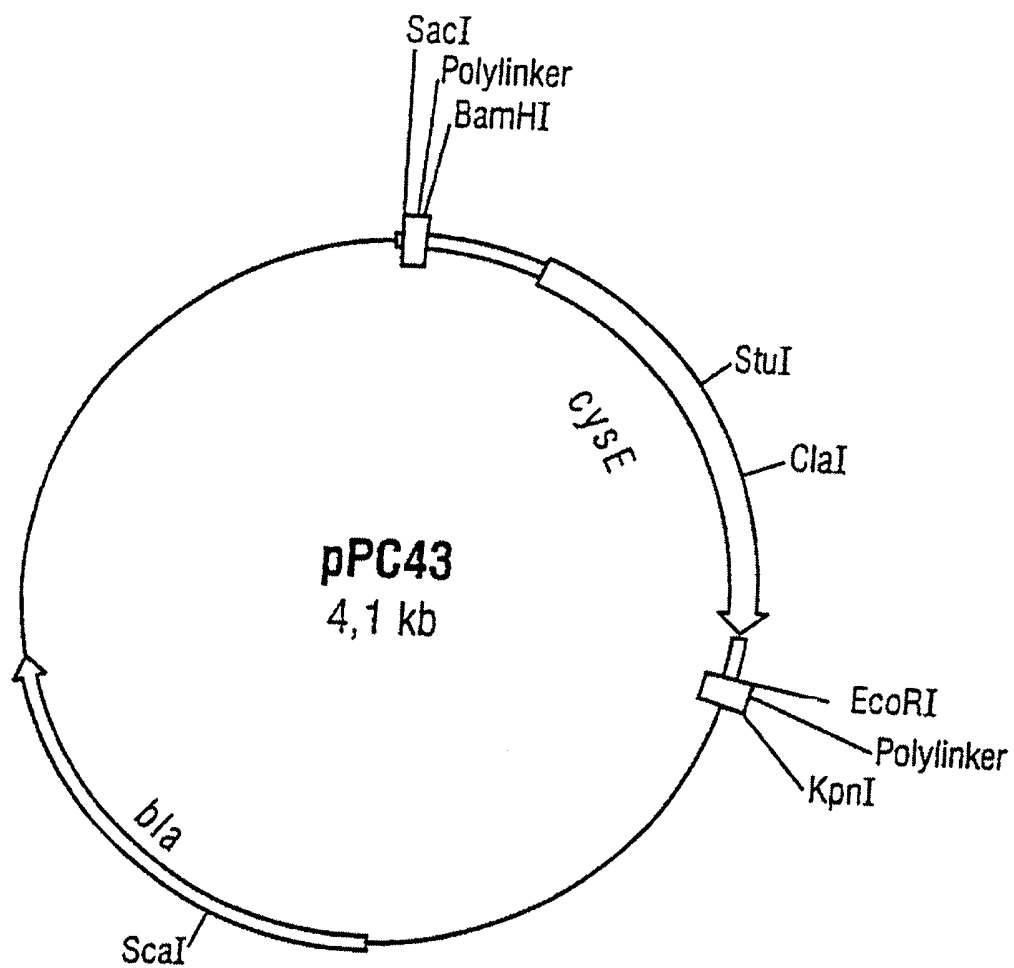


Restrikční mapa plasmidu pP1

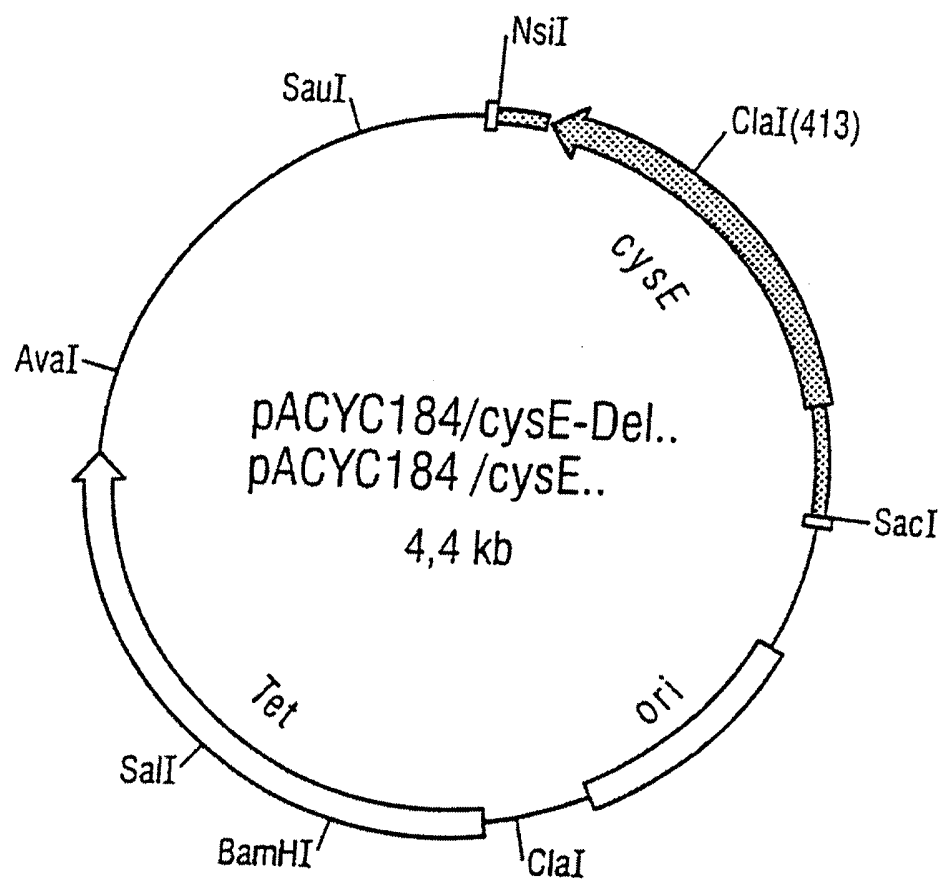
—— pUC18; ——— chromosomální DNA; PL: Polylinker

Obr. 7

Obr. 8



Obr. 9



Konec dokumentu
