

Mycobacterium species mutánsai és felhasználásuk antibiotikum vektorok screenelésére

GRÜNENTHAL GmbH, Zieglerstraße 6, 52078 Aachen, Németország

K I V O N A T

A találmány új Mycobacterium species mutánsokra és potenciális antibiotikum-vektorok felismerésére szolgáló screenelési eljárásokban történő felhasználásukra vonatkozik. A találmány szerinti új mutánsokat az jellemzi, hogy a sziderofór által közvetített vasfelvevő rendszer komponenseit kódoló gének inaktiválva vannak. A gének inaktiválását valamely alábbi módszerrel végzik el: a) kémiai, illetve fizikai mutagénekkel történő mutagenézis; b) "géncsere", azaz a teljes génnek vagy a gén egy részének valamely marker-génre történő lecserélése; c) törléses vagy beillesztéses inaktiválás; vagy d) a fenti módszerek kombinálása. Az ily módon nyert mutánsok olyan sziderofórok screenelésére szolgáló módszereknél alkalmazhatók, amelyek az exokelin/mycobactin transzport rendszertől függetlenül a Mycobacterium sejtbe transzportálhatók, és ezáltal potenciális antibiotikum-vektoroknak tekinthetők.

Képviselő: Dr. Tóth-Urbán László ügyvéd
Társképviselő: Dr. Jalsovszky Györgyné ügyvéd

316/57

**Mycobacterium species mutánsai és felhasználásuk antibiotikum
vektorok screenelésére**

GRÜNENTHAL GmbH, Zieglerstraße 6, 52078 Aachen, Németország

Feltalálók:

SCHUMANN Giesbert	Herderstraße 43, D-07743 Jena
MÖLLMANN Ute	Schlendorfer Oberweg 17, D-007749 Jena
HEINEMANN Irmgard	Closewitzer Straße 40, D-007743 Jena
	Németország

Bejelentés napja:	1999. 04. 10.
A nemzetközi bejelentés száma:	PCT/EP99/02438
A nemzetközi közzététel száma:	WO 99/54454
Elsőbbség:	1998. 04. 17. 198 17 921.9 DE

Találmányunk tárgya *Mycobacterium* species mutánsai és felhasználásuk antibiotikum vektorok screenelése.

A mycobacteriális fertőzések egyre jelentősebb problémát képeznek. A helyzetet a rendelkezésre álló kemoterápiás szerekkel szemben széleskörű rezisztenciát mutató *Mycobacterium* törzsek fellépése súlyosbítja. Új hatóanyagok és hatásmechanizmusok iránti vizsgálatok előtérbe kerültek.

A kemoterápiás szerek antimycobakteriális hatékonyságát korlátozó fontos tényező a mycobacteriális sejtfal csekély permeabilitása [Suzuki, A.E., Inamine, J.M.: Res. Microbiol. 145, 210-213 (1994); Jarlier, V., Nikaido, H.: FEMS Microbiol. Lett. 123, 11-18 (1994)].

A fenti akadály kiküszöbölésének egyik metodikai koncepciója szerint az antibiotikumokat a patogén mikroorganizmusok által aktívan felvett vektorokhoz kapcsolják.

Fentemlített vektorként vaskelátorok (sziderofórok) alkalmazhatók. A fertőzés helyén vashiányos körülmények között sok patogén mikroorganizmus sziderofórokat képez, amelyek a közegbe kiválasztódnak. A ferri-sziderofórokat specifikus receptorok a sejtfelülethez kötik és ATP-függő permeázok a sejt belsejébe szállítják. Ismeretes, hogy gram-negatív mikroorganizmusok az általuk termelt sziderofórokon kívül más szervezetek által termelt sziderofórok (xenosziderofórok) felvételére is képesek.

A *Mycobacterium*ok vASFelvételi rendszeréről viszonylag keveset ismerünk. [Áttekintés: Wheeler, P.R.,

Ratlledge, C.: Bloom, B.R. ed.: Tuberculosis, ASM Press, Washington, DC, (1994)]. A sziderofórok két típusa ismert, éspedig a membránhoz kötött lipofil mycobactinok [Snow, G.A.: Bacteriological Reviews 34, 99-125 (1970)] és az extracelluláris hidrofil exokelinek [Macham, L.P. et al.: J. Gen. Microbiol. 101, 41-49 (1977); Hall, R., Ratlledge, C.: J. Gen. Microbiol. 133, 193-199 (1987)]. Meghatározták a Mycobacterium smegmatis [Sharman et al.: Biochem.J. 305, 187-196 (1995)], M. neoaurum [Sharman et al.: Chemistry & Biology 2, 553-561 (1995)] és M. tuberculosis [Gobin et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 5189-5193 (1995)] által képezett exokelinek szerkezetét. Hasonlóképpen különböző mycobactinok szerkezetét is meghatározták [Snow, G.A.: Bacteriol. Rev. 34, 99-125 (1970)].

Az exokelinek szintézisében és valószínűleg a ferri-exokelin felvételében résztvevő első gént a M. smegmatis esetében azonosították [Fiss, E.H. et al.: Molecular Microbiology 14, 557-569 (1994)]. A talált négy ORF (fxuA, fxuB, fxuC; nyitott leolvasó keret) közül háromból levezetett fehérjék az enterobactin felvételében résztvevő E. coli membránfehérjéjével homológok. Ezért feltételezhető, hogy ez esetben a ferri-exokelin-permeáz alegységeiről van szó. Funkcionális bizonyítékot azonban erre mindeztideig nem találtak. A negyedik ORF (fxbA) az exokelin bioszintézisében résztvevő fehérjét kódol. Ezt egy bioszintézis-mutáns komplementálásával bizonyították.

Az exokelin/mycobactin rendszeren keresztül történő vas-transzport-eljárást részleteiben nem jellemezték. A xenosziderofórok Mycobacteriumok által történő felvételé-

ról hasonlóképpen kevés ismeret áll rendelkezésére. Mindezideig csupán azt igazolták, hogy a *M. smegmatis* különböző xenosziderofórokat hasznosítani képes [Matzanke, B.F. et al.: *BioMetals* 10, 193-203 (1997)]. Jelenleg csupán a Mössbauer-spektroszkópia nagyon költséges módszereivel válaszolható meg az a kérdés, hogy ezek a xenosziderofórok specifikus felvevőrendszereken keresztül a sejtekbe transzportálhatók-e és ezáltal potenciális antibiotikum-vektoroknak tekinthetők-e [Matzanke, B.F.: *Hyperfine Interactions* 112, 123-128 (1998)]. Ez a módszer azonban screenelésre alkalmatlan, mert nagy anyagmennyiségekre és nagyon költséges berendezésre van szükség, valamint az időigény is magas. Ez a módszer csupán kevés, magas fokon specializált laboratóriumra korlátozott és csak nagyon alacsony mintaátbocsátást tesz lehetővé.

Találmányunk célkitűzése potenciális antibiotikum-vektorként számításba jövő természetes mycobacteriális sziderofórok, xenosziderofórok vagy kémiai analógjaik felvételének screenelésére szolgáló nem-radioaktív gazdaságos és hatékony eljárás kidolgozása.

A fenti célkitűzést találmányunk szerint oly módon oldjuk meg, hogy olyan *Mycobacterium* mutáns szett-et állítunk elő, amelynél az exokelin/mycobactin transzport rendszer különböző komponensei ki vannak kapcsolva. Ez a szett egy gyors és gazdaságos teszt-eljárás alapját képezi.

Találmányunk tárgya eljárás potenciális antibiotikum-vektorként számításba jövő *Mycobacterium*ok screenelésére, **azzal jellemezve**, hogy *Mycobacterium*-mutánsokat,

amelyekben a sziderofór által közvetített vasfelvevő rendszer komponenseit kódoló géneket inaktiváltuk, az exokelin/mycobactin transzport rendszertől függetlenül a Mycobacterium sejtbe transzportált sziderofórok felismerését lehetővé tevő megfelelő teszt-eljárásnál alkalmazunk.

A találmány szerinti megfelelő teszt-eljárásnál szilárd táptalajon végzett növekedést-elősegítő tesztet alkalmazhatunk. A teszt során a mutánsokat vashiányos táptalajon tenyésztjük és a tesztelendő sziderofórokat a teszt-lemez korlátozott területére juttatjuk. Az említett területeken a növekedés serkentése megmutatja, hogy a teszt-anyagok által rendelkezésre bocsátott vasat a mutánsok felhasználják-e vagy sem.

Meglepő módon azt találtuk, hogy a fenti egyszerű, gyors és magas mintaátbocsátású screenelési módszer segítségével olyan sziderofórok találhatók, amelyek az exokelin/mycobactin transzport-rendszertől függetlenül a sejtekbe juttathatók. A találmány szerinti módszerrel különböző mutánsok felhasználása révén olyan sziderofórok screenelhetők, amelyek exokelinnel vagy mycobactinnal nem alakítanak ki ligandcserét. Potenciális antibiotikum-vektorként csak az ilyen sziderofórok jöhetnek tekintetbe, mert ezek az anyagok másként nem transzportálhatók a sejtekbe. A találmányunk szerinti screenelési módszer nincs szilárd táptalajon végzett növekedést elősegítő tesztekre korlátozva, hanem folyékony táptalajban végrehajtott növekedést elősegítő tesztekkel is végrehajtható.

A találmány szerinti eljárásnál az exokelin/mycobactin transzport rendszer egyes komponenseiben blokkolt különböző mutánsok felhasználása révén lehetőség nyílik további információk szerzésére abban a tekintetben, hogy a transzport rendszer egyes komponensei milyen mértékben vesznek részt a xenosziderofórok felvételében. A technika állása szerint ismert eljárások

- Mössbauer-spektroszkópia (Fe^{57} -el) vagy radioaktív Fe^{55} -transzport a baktériumsejtekbe történő vasfelvétel jellemzésére - segítségével ilyen információk nem voltak szerezhetők. A találmányunk szerinti eljárás további előnye, hogy radioaktív vagy dúsított stabil izotópok alkalmazására nincs szükség.

A találmányunk szerinti screenelési eljárásnál felhasznált Mycobacterium mutánsokat oly módon állítjuk elő, hogy a sziderofór által közvetített vasfelvétel-rendszer komponenseit kódoló géneket inaktiváljuk. A gének inaktiválását önmagában ismert módon a következőképpen végezhetjük el: a) kémiai, illetve fizikai mutagénekkel végzett mutagenézis; b) "géncsere", azaz a teljes gén, illetve a gén részeinek valamely marker-génnel (pl. antibiotikum rezisztencia-marker-génnel) való lecserélése; c) beillesztéssel történő inaktiválás (valamely marker-gén - pl. antibiotikum marker-gén - beillesztésével történő inaktiválás) vagy törléssel végzett inaktiválás (a gén egy részének vagy a teljes gén törlésével végzett inaktiválás); vagy d) a fenti módszerek kombinálása.

Az exokelin/mycobactin transzport-rendszer lehetőség szerint összes fontos komponensét magában foglaló mutáns-

spektrum termeléséhez a ferri-exokelin-felvevőgén teljes clusterének ismerete ajánlatos. Ezért egy *Mycobacterium smegmatis* törzs [*M. smegmatis* mc² 155; [Snapper et al.: *Mol Microbiol* 4, 1911-1919 (1990)] *fxuC*-val szomszédos kromoszómadarabját klónozzuk, majd találmányunk keretén belül egy új ORF-t (*fxuD*) azonosítunk, amely nagy valószínűséggel a ferri-exokelin-felvevőgén clusteréhez tartozik. Az 1. ábrán az ismert négy ferri-exokelin-felvevőgén gén-clusterének restriktációs térképét tüntetjük fel. A 2. ábrán az *fxuC*-al szomszédos kromoszómadarab nukleotid szekvenciáját és az *fxuD* levezetett aminosav szekvenciáját ábrázoljuk.

A találmányunk szerinti screenelési módszert példászerűen *smegmatis* mutánsok felhasználásán mutatjuk be. Az említett species helyett analóg módon más gyorsan növekedő *Mycobacterium* speciesek pl. *Mycobacterium phlei*, *M. vaccae*, *M. aurum*, *M. fortuitum* vagy *M. chelonae* megfelelő mutánsai is felhasználhatók. Ezenkívül lassan növekedő *Mycobacterium* fajok, mint pl. *M. bovis*, *M. avium* vagy *M. tuberculosis* is alkalmazhatók.

Az alábbi *Mycobacterium smegmatis* törzseket a „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH”, Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig (DSMZ) intézménynél 1998.04.02.-án letétbe helyeztük: *Mycobacterium smegmatis* M24 (DSM 12084), *M. smegmatis* B1 (DSM 12085) és *Escherichia coli* TOP10F' pGS4 (DSM 12083).

Találmányunk tárgya továbbá *Mycobacterium*-speciességek mutánsai, amelyeket az jellemez, hogy a mycobactin bioszintézisében résztvevő géneket inaktiváltuk és/vagy az

exokelin által közvetített vasfelvétel komponenseit kódoló géneket gécscere, törléses inaktiválás vagy beillesztéses aktiválás által kikapcsoltuk.

Találmányunk előnyös kiviteli alakja olyan *Mycobacterium* mutánsokra vonatkozik, amelyeknél a mycobactin bioszintézisben résztvevő géneket inaktiváltuk.

Találmányunk további előnyös kiviteli alakja olyan *Mycobacterium* mutánsokra vonatkozik, amelyeknél az exokelin által közvetített vasfelvevő rendszer komponenseit kódoló egy vagy több *fxbA*, *fxuA*, *fxuC* és *fxuD* gént gécscere, törléses inaktiválás vagy beillesztéses inaktiválás útján kikapcsoltuk és amelyeknél adott esetben a mycobactin bioszintézisében résztvevő géneket is inaktiváltuk.

Találmányunk tárgya különösen a példákban ismertetett *Mycobacterium* mutánsok, elsősorban a *Mycobacterium smegmatis* mutánsai.

Találmányunk további részleteit az alábbi példákban ismertetjük anélkül, hogy találmányunkat a példákra korlátoznánk.

Az ábrák a példák további részleteinek ismertetésére szolgálnak és magyarázatuk a következő:

1. ábra: az exokelin-gén cluster restrikciós térképe.
2. ábra: az *fxuD* gén nukleotid szekvenciája a szegélyező tartományokkal.
3. ábra: az *fxbA* törlésére szolgáló konstrukció.
4. ábra: az *fxuA* törlésére szolgáló konstrukció.
5. ábra: a pGS52 plazmid restrikciós térképe.
6. ábra: a pGS41 plazmid inzertje.
7. ábra: a pGS56 plazmid inzertje.
8. ábra: a pGS57 plazmid restrikciós térképe.

Példák

1. példa

Mycobacterium smegmatis M24 mutáns termelése

A mycobactin bioszintézisének fontos funkcióiban blokkolt mutáns termelése során a *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 törzset [Snapper et al.: Mol Microbiol 4, 1911-1919 (1990)] N-nitrozometil-N-nitro-guanidinnal végzett kémiai mutagenézisnek vetjük alá. A túlélő sejtek közül a *M. smegmatis* M24 mutánst (DSM 12084) hiányzó UV-fluoreszcencia alapján izoláljuk. A hiányzó mycobactin-felhalmozást HPLC és elektro spray-tömegspektrometria segítségével igazoljuk. A mutagenézis az exokelin-bioszintézist nem befolyásolja.

2. példa

Mycobacterium smegmatis B1 és B3 mutáns termelése

Az fxbA gén törlését "gécserével" végezzük el, amelynek során a teljes gént pUC4K-ből (Pharmacia Biotech Europe GmbH) származó kanamycin-rezisztencia kassetára cseréljük. Az ehhez szükséges pGS31 plazmidot (3. ábra) a következőképpen építjük fel:

A törlendő génnel szomszédos, az M24 mutánsban levő kromoszómadarabot mint 507 bp nagy B7/8 fragmenst, illetve 758 bp nagy B5/6 fragmenst PCR segítségével nyerjük. A PCR-hez "primer"-ként az alábbi oligonukleotidokat alkalmazzuk:



B7/8 fragmens: CAGGATCCATTGGTAAGCCTTACC	Seq ID Nr. 1
GATCTAGAGCTGGTTCAGGGCGATG	Seq ID Nr. 2
B5/6 fragmens: ACGAATTCACACGCCAGAGAACGC	Seq ID Nr. 3
CAGGATCCTGATCTGGCAATTCCAG	Seq ID Nr. 4

Ennek során a mesterséges restrikciós helyeket be-
visszük, amelyek mindkét fragmensnek a kromoszómában le-
vővel azonos orientációban, a kanamycin-rezisztencia ka-
zettával szomszédosan a pUC118 vektorba (Boehringer
Ingelheim Bioproducts) történő klónozását lehetővé te-
szik. Ezáltal a pGS31 vektor keletkezik (3 ábra).

Az *M. smegmatis* mc² 155 és M24 törzset a pGS31
plazmiddal transzformáljuk és a kanamycin-rezisztens
transzformátumokat kanamycintartalmú táptalajon szelek-
táljuk. Megvizsgáljuk a klónok exokelin-bioszintetizáló
képességét. Az mc² 155 transzformátumokból az *M. smegmatis*
B1 (DSM 12 085) klónt és az M24 törzs transzformátumából
az *M. smegmatis* B3 klónt izoláljuk, amelyekből exokelin
nem választódik ki. PCR segítségével igazoljuk, hogy a
talált exokelin-negatív fenotípus az *fxbA* génnek a
kanamycin-rezisztens kazettára történő kicserélésén ala-
pul. Ezt a cserét a pGS31-be klónozott kromoszomális
fragmensek és a kromoszóma homológ tartományai közötti
homológ rekombinációval végezzük el.

A B1 klón a Fiss és tsai által publikált *fxbA*-mu-
tánstól abban különbözik, hogy míg utóbbinál egy kémiai
mutagenézis által létrehozott nem jellemzett mutáció ját-
szódott le, addig a B1 esetében a mutáció stabilitását
egy definiált géncsere garantálja.

3. példa**Mycobacterium smegmatis U1 mutáns termelése**

Az *fxuA* gén törlését a 2. példával analóg módon "géncserével" végezzük el. Az ehhez szükséges pGS22 plazmidot a következőképpen építjük fel:

Az *fxuA* génnel szomszédos kromoszómadarabot a M24 mutánsban 768 bp nagy U1/5 fragmensként, illetve 755 bp nagy U6/7 fragmensként PCR segítségével nyerjük. A PCR-hez primerként az alábbi oligonukleotidokat alkalmazzuk:

U1/5 fragmens: ACGAATTCGAGATCCTCGGCATCAAC	Seq ID Nr. 5
CAGGATCCTGGCGCTTCCCGAAATC	Seq ID Nr. 6
U6/7 fragmens: GAGGATCCTGAAAGAACATATGACTC	Seq ID Nr. 7
TATCTAGACAAGATCGGCCGACATC	Seq ID Nr. 8

Ennek során a mesterséges restrikciós helyeket be-
visszük, amelyek mindkét fragmensnek a kromoszómában le-
vőben azonos orientációban, a kanamycin-rezisztencia ka-
zettával szomszédosan a pUC118 vektorba történő klóno-
zását lehetővé teszik. Ezáltal a pGS22 (4. ábra) keletke-
zik. Az M24 törzset a pGS22 plazmiddal transzformáljuk és
a kanamycin-rezisztens transzformátumokat megfelelő táp-
talajon szelektáljuk. Az *M. smegmatis* U1 törléses mutánst
ezekből a klónokból a fenotípusa alapján szelektáljuk.
Ennek során kanamycin-rezisztens transzformátumokat a
példában leírt teszt-eljárással olyan klónokra scre-
enelünk, amelynek a növekedését exokelin nem segíti elő.
Az *fxuA* törlése ahhoz vezet, hogy az U1 mutáns ferro-
-exokelin felvételére már nem képes. A talált fenotípus



alapjául szolgáló cserét - nevezetesen az *fxuA* kanamycin-rezisztens kazettára homológ rekombinációval történő lecserélését - PCR segítségével bizonyítjuk.

4. példa

***Mycobacterium smegmatis* U5 mutáns termelése**

Az *fxuC* gén inaktiválását kanamycin-rezisztencia kazettának a génbe történő integrálásával végezzük el. Az *fxuA*-ra és *fxuB*-re gyakorolt poláros hatások elkerülése céljából a kanamycin-rezisztencia gén transzkripciósi irányát az *fxuC*-vel ellentétesen választjuk meg. Ezért a 725 bp nagy KpnI-PstI-fragmenst (1. fragmens, 1. ábra) puC118-ba alklónozzuk. Az 1. fragmenst az *E. coli* TOP10F' pGS4-ből (DSM 12083) nyerhető pGS4-ből nyerjük. A pGS4 egy puC118-származék, amelynek az inzertje az 1. fragmensnek és 3. fragmensnek az 1. ábrán feltüntetett tartományát tartalmazza. A kanamycin-rezisztencia kazettát a belső BamHI-restrikciós helyen a megfelelő orientációban klónozzuk. Ennek során a pGS52 plazmid keletkezik (5. ábra). Az M24 törzset pGS52-vel transzformáljuk és a kanamycin-rezisztens transzformátumokat megfelelő táptalajon szelektáljuk. Az *M. smegmatis* U5 beillesztéses mutánst ezekből a klónokból fenotípusa alapján szelektáljuk. Ennek során a kanamycin-rezisztens transzformátumokat a példában leírt teszt-eljárás segítségével olyan klónokra screeneljük, amelyeknek a növekedését exokelin nem segíti elő. Ennél a mutánsnál az *fxuC* gént homológ rekombinációval a kromoszómába a pGS52-vel szemben klónozzuk és KanR beillesztésével *fxuC* inaktivált kópiájára kicseréljük. A KanR-nek az *fxuC*-be történő beil-

lesztése ahhoz vezet, hogy az U5 mutáns ferri-exokelin felvételére már nem képes. A talált fenotípus alapján feltételezett integrálódást PCR segítségével bizonyítjuk.

5. példa

***Mycobacterium smegmatis* U7 mutáns termelése**

Az *fxuA*-ra, *fxuB*-re és *fxuC*-re kifejtett poláros hatások elkerülése végett és abból a célból, hogy az *fxuD*-*fxuA* cluster kifejezésének szabályozását ne befolyásoljuk, az *fxuD* inaktiválását oly módon végezzük el, hogy egy 325 bp nagy fragmenst a gén 5' végétől 69 bp-vel kezdődően törölünk.

E célból a pGS4-ből származó 1737 bp nagy BamHI-fragmenst (2. fragmens, 1. ábra) pUC118-ba alklónozzuk. Ekkor a pGS41 keletkezik (6. ábra). A pGS41-et BspMII-vel vágjuk és újralligáljuk, amikor is pGS56 keletkezik (7. ábra). A kanamycin-rezisztens kazettának a pGS56 Bgl II-helyébe történő klónozásával a pGS57-et képezzük (8. ábra). Az M24 törzset pGS57-el transzformáljuk és a kanamycin-rezisztens transzformátumokat megfelelő táptalajon szelektáljuk. Ezekből a klónokból az *M. smegmatis* U7 beillesztéses mutánst, amelynél az *fxuD* gént homológ rekombinációval a törölt kópiára kicseréltük, PCR segítségével szelektáljuk. Ennél a mutánsnál a kanamycin-rezisztens kazetta az *fxuD*-*fxuB* cluster promotor-tartománya előtt van a kromoszómába integrálva. Ezáltal az *fxu*-cluster kifejezésére gyakorolt poláros hatások ki vannak zárva.

6. példa

Potenciális antibiotikum vektorok screenelési eljárása

A találmány szerinti mutánsokat tápagaron (12 g Oxoid 1.sz. táptalaj per liter) 35-37 °C-on 48 órán át tenyésztjük, majd elszegényített táptalajban (50 ml glicerin, 8,5 g NaCl/liter; pH 7,2) szuszpendáljuk. A szuszpenzió sejtsűrűsége kb. 3×10^8 /ml. A fenti szuszpenzióból 1,5 ml-t 99 ml bioteszt-agarral összekeverünk (20 ml glicerin, 5 g L-aszparagin, 5 g KH_2PO_4 per liter kétszer desztillált víz; pH 7,5; 2 % alumínium-oxid hozzáadása után 121 °C-on 15 percen át sterilizzuk; szűrjük; a pH-t 6,8-ra állítjuk be; 12 g agar Nr. 1 (Oxoid) hozzáadása után 121 °C-on ismét sterilizzuk; közvetlenül a beoltás előtt a táptalajhoz az alábbi komponenseket adjuk: 0,46 $\mu\text{g/ml}$ Zn^{2+} , 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Mn^{2+} , 0,04 mg/ml Mg^{2+} , 1 $\mu\text{g/ml}$ $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 $\mu\text{g/ml}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 $\mu\text{g/ml}$ $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ és 0,4 $\mu\text{g/ml}$ $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, valamint 10 μM etiléndiamin-di-(o-hidroxifenil-ecetsav). A kapott szuszpenziót Petri-csészékbe töltjük. Az agar megkeményedése után a felületre a vizsgált anyag oldatával átitatott szűrőpapír korongokat (átmérő 5 mm) helyezünk. A szűrőpapír korongokon kialakult gátlási zónákat 35-37 °C-on végzett 2 napos inkubálás után megmérjük.

Az U1-U7 mutánsok növekedési zónái pl. azt mutatják, hogy a vizsgált xeroszideroforok felvétele az exokelín-mycobactin transzport rendszer összes mindezideig ismert

komponensétől függetlenül játszódik le. A B1 mutáns esetében a növekedési zóna a myobactinnal történő ligandcserét mutat, míg az M24 mutáns esetében a növekedési zóna az U1 mutáns hiányzó növekedése mellett exokelinnel történő ligandcserét jelez.

SZEKVENCIALISTA

<110> Grünenthal GmbH

<120> Mycobacterium species mutánsai és felhasználásuk antibiotikum vektorok screenelésére

<130> Grünenthal HKI 2806

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Mycobacterium smegmatis

<400> 1

caggatccat tggtaagcct tacc

24

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Mycobacterium smegmatis

<400> 2

gatctagagc tggttcaggg cgatg

25

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Mycobacterium smegmatis

<400> 3

acgaattcac acgccagaga acgc

24

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Mycobacterium smegmatis

<400> 4

caggatcctg atctggcaat tccag

25

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Mycobacterium smegmatis

<400> 5

acgaattcga gatcctcggc atcaac

26

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Mycobacterium smegmatis

<400> 6

caggatcctg gcgcttcccg aaatc

25

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Mycobacterium smegmatis

<400> 7

gaggatcctg aaagaacata tgactc

26

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Mycobacterium smegmatis

<400> 8

tatctagaca agatcggccg acatc

25

<210> 9

<211> 1482

<212> DNA

<213> Mycobacterium smegmatis

<220>

<221> CDS

<222> (446) .. (1480)

<400> 9

```
gatctcgtcg ggggtatcga agtgacgttg gcggatcggg attgaaccgt tttggagaac 60
cgccccctcag tggggtaatc tcgctgctcg gttgatccac tatteggggcc tatagctcag 120
gcgggttagag cgcttcgctg ataacgaaga ggtcggaggt tcgagtcctc ctaggcccac 180
gacgccggtc tgccggtgat caccgaaagg gtgtgccatg cggtttgtgg tgttggtctg 240
tgtggcggct gtggcgggtga tcgtctggcg atcacgacac ggccaagagg tttggcatcg 300
ggcggggttga accgacctga cagctagggc cttagctcag ttggtagaag cagctgcctt 360
tgcaaggcag atgtcaggag ttcgaatctc ctaggctcca caatcaagag aatctcccaa 420
agttggtttag gttacctca gctgt gtg agc ttc tcg tat gcg tcc gtc atc 472
                               Val Ser Phe Ser Tyr Ala Ser Val Ile
                               1                               5

gag acc aag gcg ctc aac ccc cgg atg gtc cgg atc acc ctt cag gtc 520
Glu Thr Lys Ala Leu Asn Pro Arg Met Val Arg Ile Thr Leu Gln Val
 10                               15                               20                               25

gag gac ccc gct tcc ctc gac gtg cag cag gcc gcc gac tcg gca gtc 568
Glu Asp Pro Ala Ser Leu Asp Val Gln Gln Ala Ala Asp Ser Ala Val
                               30                               35                               40

gcg gtc ttc atg ccc ggc acc gac gag ggc cgc aac tac tcc gta cgc 616
Ala Val Phe Met Pro Gly Thr Asp Glu Gly Arg Asn Tyr Ser Val Arg
                               45                               50                               55

cgc cag cgc ggc gat ctg ctc gac ctc gac gtg gtg ctg cac gcc cgc 664
Arg Gln Arg Gly Asp Leu Leu Asp Leu Asp Val Val Leu His Ala Arg
                               60                               65                               70

ggc gtc ggc acc gac tgg gcg gcg cga acc cgg ccc ggt gac cgc gtc 712
Gly Val Gly Thr Asp Trp Ala Ala Arg Thr Arg Pro Gly Asp Arg Val
                               75                               80                               85

ggc ctc gac cac gca cgc tcg tgg tac cgc ccg gac ccg gcc gcg cag 760
```

Gly	Leu	Asp	His	Ala	Arg	Ser	Trp	Tyr	Arg	Pro	Asp	Pro	Ala	Ala	Gln				
90						95				100					105				
tgg	cag	ctg	ttg	atc	acc	gac	ctg	tcc	ggg	ctg	ccg	gcc	acc	gcg	cgc	808			
Trp	Gln	Leu	Leu	Ile	Thr	Asp	Leu	Ser	Gly	Leu	Pro	Ala	Thr	Ala	Arg				
				110					115					120					
atc	ctc	gaa	gag	gtg	tct	ccg	gaa	gtc	ccc	gtg	acg	gtg	atc	gcc	gag	856			
Ile	Leu	Glu	Glu	Val	Ser	Pro	Glu	Val	Pro	Val	Thr	Val	Ile	Ala	Glu				
				125					130					135					
gtc	gcc	gaa	gcg	cag	gat	ctc	gac	tac	ctg	ccg	gcg	cat	ccg	cag	gcg	904			
Val	Ala	Glu	Ala	Gln	Asp	Leu	Asp	Tyr	Leu	Pro	Ala	His	Pro	Gln	Ala				
				140					145					150					
cgg	ttg	gtc	acg	tcg	atc	ggg	acg	ggg	aac	ggc	aac	gcg	ccg	agc	gaa	952			
Arg	Leu	Val	Thr	Ser	Ile	Gly	Thr	Gly	Asn	Gly	Asn	Ala	Pro	Ser	Glu				
				155					160					165					
ctg	gcc	acg	ctg	gtg	cgt	gag	ctg	gcc	ctg	ccg	cgg	gat	cgc	ggc	tac	1000			
Leu	Ala	Thr	Leu	Val	Arg	Glu	Leu	Ala	Leu	Pro	Arg	Asp	Arg	Gly	Tyr				
				170					175					180					
tgc	tgg	ttc	gcg	ggg	gaa	gcc	gca	gag	tcg	cgc	gcg	gtc	agg	aag	tat	1048			
Cys	Trp	Phe	Ala	Gly	Glu	Ala	Ala	Glu	Ser	Arg	Ala	Val	Arg	Lys	Tyr				
				190					195					200					
ctc	agg	ggg	ctg	ggg	tac	cag	aac	gaa	caa	ctc	gac	atc	acg	ggg	tac	1096			
Leu	Arg	Gly	Leu	Gly	Tyr	Gln	Asn	Glu	Gln	Leu	Asp	Ile	Thr	Gly	Tyr				
				205					210					215					
tgg	agg	ttc	gac	tcc	gag	acc	tgg	gat	gcc	gca	ttc	gct	ctg	gtg	gaa	1144			
Trp	Arg	Phe	Asp	Ser	Glu	Thr	Trp	Asp	Ala	Ala	Phe	Ala	Leu	Val	Glu				
				220					225					230					
tcg	gat	gtg	ttg	gcg	gtg	tac	gag	cgt	gca	ctc	gcc	gaa	ggc	aag	ggg	1192			
Ser	Asp	Val	Leu	Ala	Val	Tyr	Glu	Arg	Ala	Leu	Ala	Glu	Gly	Lys	Gly				
				235					240					245					

gac aaa gtg gct ttc gag gag ttc gac gag gcc tgc gag cga atc ggt 1240
 Asp Lys Val Ala Phe Glu Glu Phe Asp Glu Ala Cys Glu Arg Ile Gly
 250 255 260 265
 ctg tga tag gtg atc acg cag gca ccg ctc gca ccg ccg cgc gcc gcg 1288
 Leu Val Ile Thr Gln Ala Pro Leu Ala Pro Pro Arg Ala Ala
 270 275 280
 cgt aac cac cgg gct gtc gga ctg gcc gtc gcg aca gtc gtt ctg gtc 1336
 Arg Asn His Arg Ala Val Gly Leu Ala Val Ala Thr Val Val Leu Val
 285 290 295
 gcg atg tgc atc gcg agc ctc gcg atc ggc acg cag aac gtc tcg ttg 1384
 Ala Met Cys Ile Ala Ser Leu Ala Ile Gly Thr Gln Asn Val Ser Leu
 300 305 310
 tcc acg gtc tgg cag gcc gtc acc gac tac cgc gac atc ggc gac cag 1432
 Ser Thr Val Trp Gln Ala Val Thr Asp Tyr Arg Asp Ile Gly Asp Gln
 315 320 325
 tgg atc gtc cac gac ctg cgg atc ctc tag agt cga cct gca ggc atg 1480
 Trp Ile Val His Asp Leu Arg Ile Leu Ser Arg Pro Ala Gly Met
 330 335 340 345
 ca 1482

<210> 10

<211> 205

<212> PRT

<213> Mycobacterium smegmatis

<400> 10

Ala Gln Asp Leu Asp Tyr Leu Pro Ala His Pro Gln Ala Arg Leu Val

1

5

10

15

Thr Ser Ile Gly Thr Gly Asn Gly Asn Ala Pro Ser Glu Leu Ala Thr
20 25 30
Leu Val Arg Glu Leu Ala Leu Pro Arg Asp Arg Gly Tyr Cys Trp Phe
35 40 45
Ala Gly Glu Ala Ala Glu Ser Arg Ala Val Arg Lys Tyr Leu Arg Gly
50 55 60
Leu Gly Tyr Gln Asn Glu Gln Leu Asp Ile Thr Gly Tyr Trp Arg Phe
65 70 75 80
Asp Ser Glu Thr Trp Asp Ala Ala Phe Ala Leu Val Glu Ser Asp Val
85 90 95
Leu Ala Val Tyr Glu Arg Ala Leu Ala Glu Gly Lys Gly Asp Lys Val
100 105 110
Ala Phe Glu Glu Phe Asp Glu Ala Cys Glu Arg Ile Gly Leu
115 120 125
Val Ile Thr Gln Ala Pro Leu Ala Pro Pro Arg Ala Ala Arg Asn His
130 135 140
Arg Ala Val Gly Leu Ala Val Ala Thr Val Val Leu Val Ala Met Cys
145 150 155 160
Ile Ala Ser Leu Ala Ile Gly Thr Gln Asn Val Ser Leu Ser Thr Val
165 170 175
Trp Gln Ala Val Thr Asp Tyr Arg Asp Ile Gly Asp Gln Trp Ile Val
180 185 190
His Asp Leu Arg Ile Leu Ser Arg Pro Ala Gly Met
195 200 205

Szabadalmi igénypontok

1. Mycobacterium species mutánsok, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a mycobactin bioszintézisében résztvevő gének inaktiválva vannak és/vagy az exokelin által közvetített vasfelvétel rendszer komponenseit kódoló gének géncsere, törléses inaktiválás vagy beillesztéses inaktiválás által ki vannak kapcsolva.

2. Az 1. igénypont szerinti Mycobacterium species mutánsok, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a mycobactin bioszintézisében résztvevő gének inaktiválva vannak.

3. A 2. igénypont szerinti Mycobacterium species mutánsok, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a gének inaktiválása valamely alábbi módszerrel történik:

- a) kémiai, illetve fizikai mutagénekkel történő mutagenézis;
- b) géncsere;
- c) beillesztéses vagy törléses inaktiválás; vagy
- d) a fenti módszerek kombinálása.

4. Az 1. igénypont szerinti Mycobacterium species mutánsok, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy az exokelin által közvetített vasfelvétel rendszer komponenseit kódoló egy vagy több gén géncsere, törléses inaktiválás vagy beillesztéses inaktiválás által ki van kapcsolva és adott esetben a mycobactin bioszintézisében résztvevő gének is inaktiválva vannak.

5. Az 1. igénypont szerinti alábbi *Mycobacterium* species mutánsok: *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. vaccae*, *M. aurum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. neoaurum*, *M. gordonae*, *M. flavescens*, *M. tuberculosis* mutánsai, vagy exosziderofórokat képező más *Mycobacterium* törzsek mutánsai.

6. Az 1. igénypont szerinti *Mycobacterium smegmatis* M24 (DSM 12084) mutáns.

7. Az 1. igénypont szerinti *Mycobacterium smegmatis* B1 mutáns (DSM 12085) a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a mc² 155 törzsnél az fxbA gén a pGS31 plazmid inzertjével végzett, a 3. ábrán feltüntetett homológ rekombináció által a kanamycin-rezisztencia kazettára ki van cserélve.

8. Az 1. igénypont szerinti *Mycobacterium smegmatis* B3 mutáns, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a M24 törzsnél a fxbA gén a PGS31 plazmid inzertjével végzett, a 3. ábrán feltüntetett homológ rekombináció által a kanamycin-rezisztencia kazettára ki van cserélve.

9. Az 1. igénypont szerinti *Mycobacterium smegmatis* U1 mutáns, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy az M24 törzsnél az fxuA gén a pGS22 plazmid inzertjével végzett, a 4. ábrán feltüntetett homológ rekombináció által a kanamycin-rezisztencia kazettára ki van cserélve.

10. Az 1. igénypont szerinti *Mycobacterium smegmatis* U5 mutáns, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy az M24 törzsnél az fxuC gén kifejezése a pUC4K-ból származó

kanamycin-rezisztencia kazettának a pGS52 plazmid inzertjével az 5. ábrán feltüntetett módon végzett homológ rekombinációjával történő integráció által meg van szakítva.

11. Az 1. igénypont szerinti *Mycobacterium smegmatis* U7 mutáns, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy az M24 törzsnél az *fxuD* gén részei a pGS56 plazmid inzertjével a 6-8. ábrán feltüntetett módon végzett homológ rekombináció által törölve vannak.

12. Eljárás potenciális antibiotikum vektorok scre-enelésére, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy valamely, az 1.-11. igénypontok bármelyike szerinti mutánst az exokelin/mycobactin transzport-rendszer-től függetlenül a *Mycobacterium* sejtbe transzportált sziderofórok felismerését lehetővé tevő teszt-eljárásnál alkalmazunk.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy szilárd vagy folyékony vashiányos táptalajon végzett növekedést elősegítő teszt-eljárást alkalmazunk.

A bejelentő helyett
a meghatalmazott:

18.09.2002

[Handwritten signature]

Lecl. OT. 17.

Dr. Tóth-Urban László

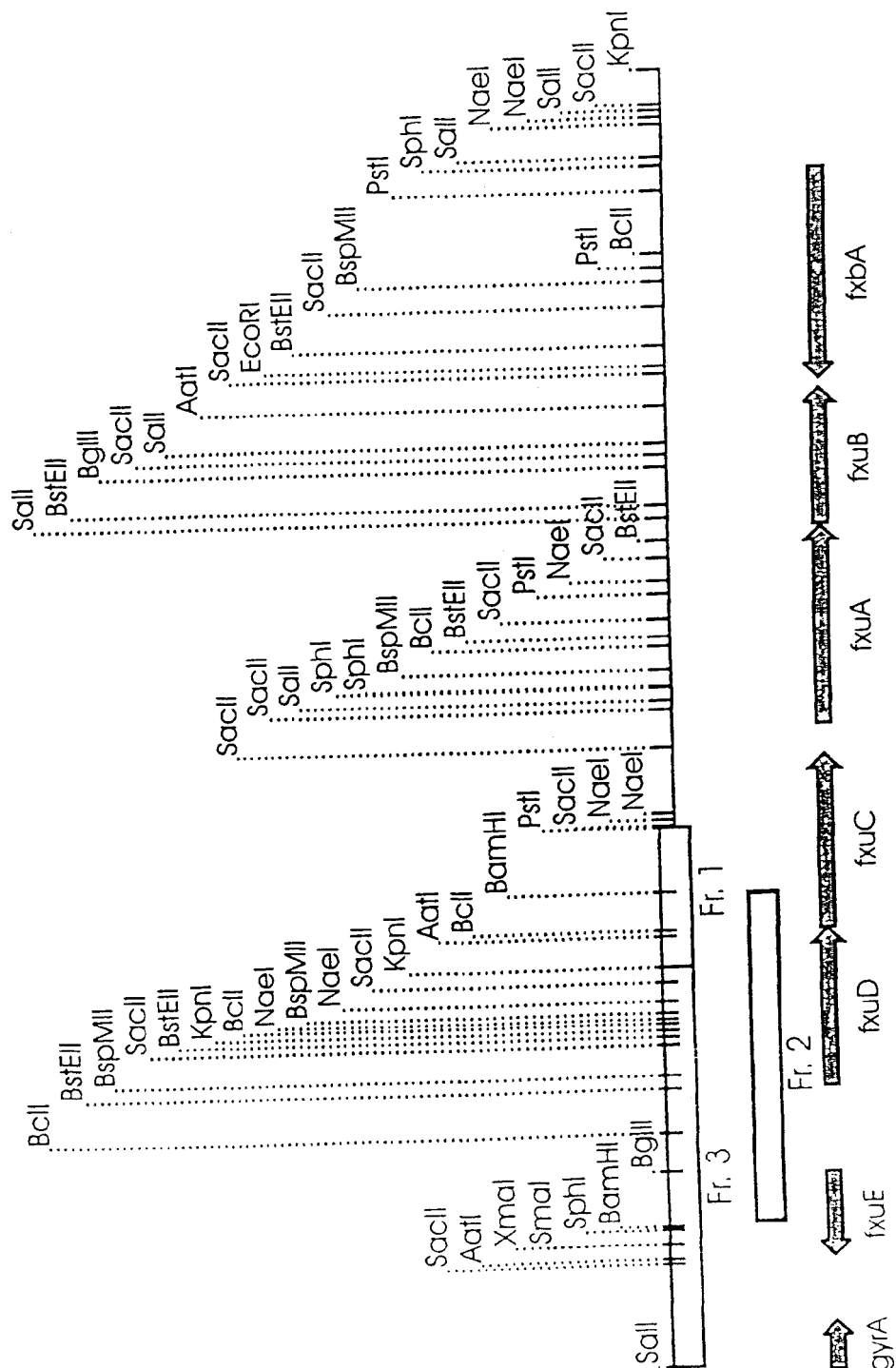
ügyvéd

1093 Budapest, Kőzalkalmi u. 24. 117a

Adószám: 41462036-2-43

OTP számszám: 11705008-20145410

Az exokelin-gén cluster restrikciós térképe



2. ábra

Az fxu gén nukleotid szekvenciája a szegélyező tartományokkal az fxuD és

fxuC levezetett aminosav-szekvenciáit a nukleotid szekvenciák felett

tüntetiük fel.

1	CA	CAA	TCA	AGA	GAA	TCT	CCC	AAA	GTT	GGT	TAG	GTT	ACC	CTC	AGC
1	FxD														
45	TGT	GTG	AGC	TTC	TCG	TAT	GCG	TCC	GTC	ATC	GAG	ACC	AAG	GCG	CTC
15	N	P	R	M	V	R	I	T	L	Q	V	E	D	P	A
90	AAC	CCC	CGG	ATG	GTC	CGG	ATC	ACC	CTT	CAG	GTC	GAG	GAC	CCC	GCT
30	S	L	D	V	Q	Q	A	A	D	S	A	V	A	V	F
135	TCC	CTC	GAC	GTG	CAG	CAG	GCC	GCC	GAC	TCG	GCA	GTC	GCG	GTC	TTC
45	M	P	G	T	D	E	G	R	N	Y	S	V	R	R	Q
180	ATG	CCC	GGC	ACC	GAC	GAG	GGC	CGC	AAC	TAC	TCC	GTA	CGC	CGC	CAG
60	R	G	D	L	L	D	L	D	V	V	L	H	A	R	G
225	CGC	GGC	GAT	CTG	CTC	GAC	CTC	GAC	GTG	GTG	CTG	CAC	GCC	CGC	GGT
75	V	G	T	D	W	A	A	R	T	R	P	G	D	R	V
270	GTG	GGG	ACC	GAC	TGG	GCG	GCG	CGA	ACC	CGG	CCC	GGT	GAC	CGC	GTC
90	G	L	D	H	A	R	S	W	Y	R	P	D	P	A	A
315	GGC	CTC	GAC	CAC	GCA	CGC	TCG	TGG	TAC	CGC	CCG	GAC	CCG	GCC	GCG
105	Q	W	Q	L	L	I	T	D	L	S	G	L	P	A	T
360	CAG	TGG	CAG	CTG	TTG	ATC	ACC	GAC	CTG	TCC	GGG	CTG	CCG	GCC	ACC
120	A	R	I	L	E	E	V	S	P	E	V	P	V	T	V
405	GCG	CGC	ATC	CTC	GAA	GAG	GTG	TCT	CCG	GAA	GTC	CCC	GTG	ACG	GTG
135	I	A	E	V	A	E	A	Q	D	L	D	Y	L	P	A
450	ATC	GCC	GAG	GTC	GCC	GAA	GCG	CAG	GAT	CTC	GAC	TAC	CTG	CCG	GCG
150	H	P	Q	A	R	L	V	T	S	I	G	T	G	N	G
495	CAT	CCG	CAG	GCG	CGG	TTG	GTC	ACG	TCG	ATC	GGG	ACG	GGT	AAC	GGC
165	N	A	P	S	E	L	A	T	L	V	R	E	L	A	L
540	AAC	GCG	CCG	AGC	GAA	CTG	GCC	ACG	CTG	GTG	CGT	GAG	CTG	GCC	CTG
180	P	R	D	R	G	Y	C	W	F	A	G	E	A	A	E
585	CCG	CGG	GAT	CGC	GGC	TAC	TGC	TGG	TTC	GCG	GGT	GAA	GCC	GCA	GAG
195	S	R	A	V	R	K	Y	L	R	G	L	G	Y	Q	N
630	TCG	CGC	GCG	GTC	AGG	AAG	TAT	CTC	AGG	GGG	CTG	GGG	TAC	CAG	AAC
210	E	Q	L	D	I	T	G	Y	W	R	F	D	S	E	T
675	GAA	CAA	CTC	GAC	ATC	ACG	GGT	TAC	TGG	AGG	TTC	GAC	TCC	GAG	ACC

Dr. Iocn-Urbán László

ügyvéd

1093 Budapest, Közvásár u. 24. I. 11/a.

Telefon: 41462056-2-43

OTP számlaszám: 11705008-20145419

225 W D A A F A L V E S D V L A V
720 TGG GAT GCC GCA TTC GCT CTG GTG GAA TCG GAT GTG TTG GCG GTG

240 Y E R A L A E G K G D K V A F
765 TAC GAG CGT GCA CTC GCC GAA GGC AAG GGG GAC AAA GTG GCT TTC
FruC

255 E E F D E A C E R I G L * * V
810 GAG GAG TTC GAC GAG GCC TGC GAG CGA ATC GGT CTG TGA TAG GTG

270 I T Q A P L A P P R A A R N H
855 ATC ACG CAG GCA CCG CTC GCA CCG CCG CGC GCC GCG CGT AAC CAC

285 R A V G L A V A T V V L V A M
900 CGG GCT GTC GGA CTG GCC GTC GCG ACA GTC GTT CTG GTC GCG ATG

300 C I A S L A I G T Q N V S L S
945 TGC ATC GCG AGC CTC GCG ATC GGC ACG CAG AAC GTC TCG TTG TCC

315 T V W Q A V T D Y R D I G D Q
990 ACG GTC TGG CAG GCC GTC ACC GAC TAC CGC GAC ATC GGC GAC CAG

330 W I V H D L R I P R T V L G L
1035 TGG ATC GTC CAC GAC CTG CGG ATC CCG CGT ACG GTG CTG GGT CTG

345 L V G L A L G L S G T L I Q A
1080 CTG GTC GGC CTG GCC CTC GGA CTC TCG GGC ACC CTG ATC CAG GCC

360 V G R N P L A D S E I L G I N
1125 GTG GGA CGT AAC CCG CTC GCC GAT TCC GAG ATC CTC GGC ATC AAC

375 S G A A L F V V A V I A F L G
1170 TCG GGT GCG GCG CTG TTC GTC GTC GCG GTC ATC GCG TTC CTC GGG

390 F S G I W T Y I G F A F L G A
1215 TTC AGC GGA ATC TGG ACG TAC ATC GGA TTC GCT TTT CTC GGA GCG

405 L F A M L M V Y L I G M T G R
1260 CTT TTC GCG ATG CTC ATG GTG TAC CTG ATC GGC ATG ACC GGA CGG

420 A T V T P V R V L L A G V A I
1305 GCC ACC GTC ACA CCG GTC CGC GTG CTG CTC GCG GGG GTG GCG ATC

435 G A V D G T G F G F V I R L Q
1350 GGT GCC GTT GAT GGA ACG GGT TTC GGA TTC GTC ATC AGA CTG CAG

Dr. Toth-Urbán László

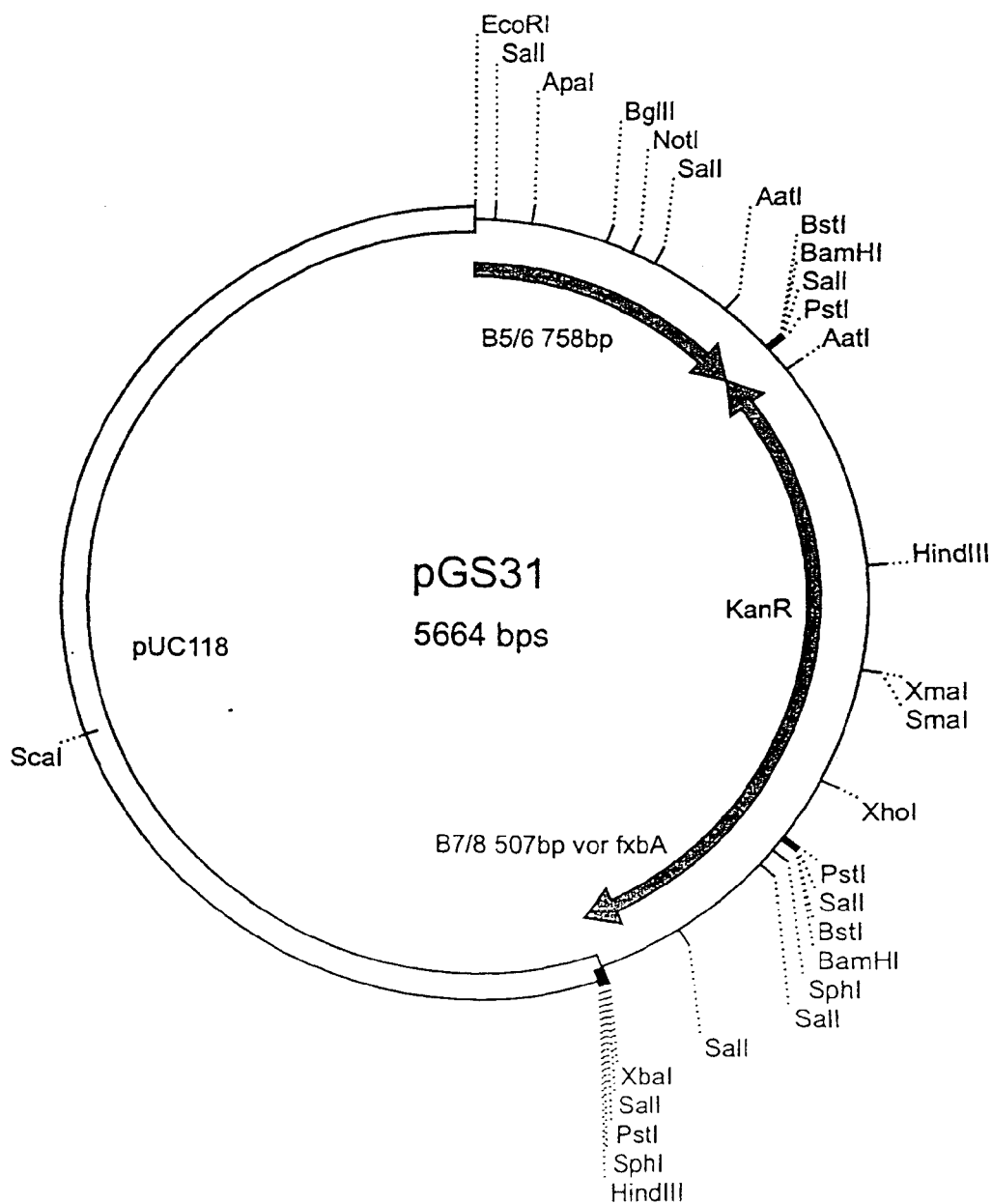
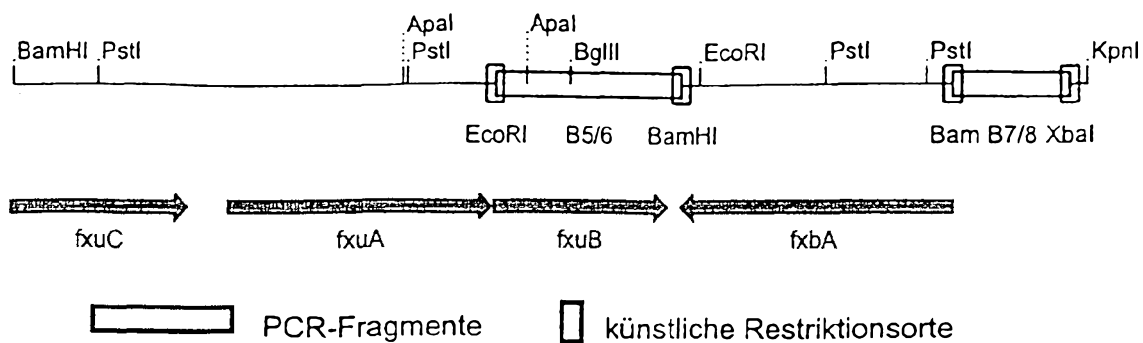
ügyvéd

1093 Budapest, Közvásár utca 24. I. 11/a.

Adószám: 41482056-2-43

OTP számlaszám: 11705008-20145419

fxbA törlésére szolgáló szerkezet

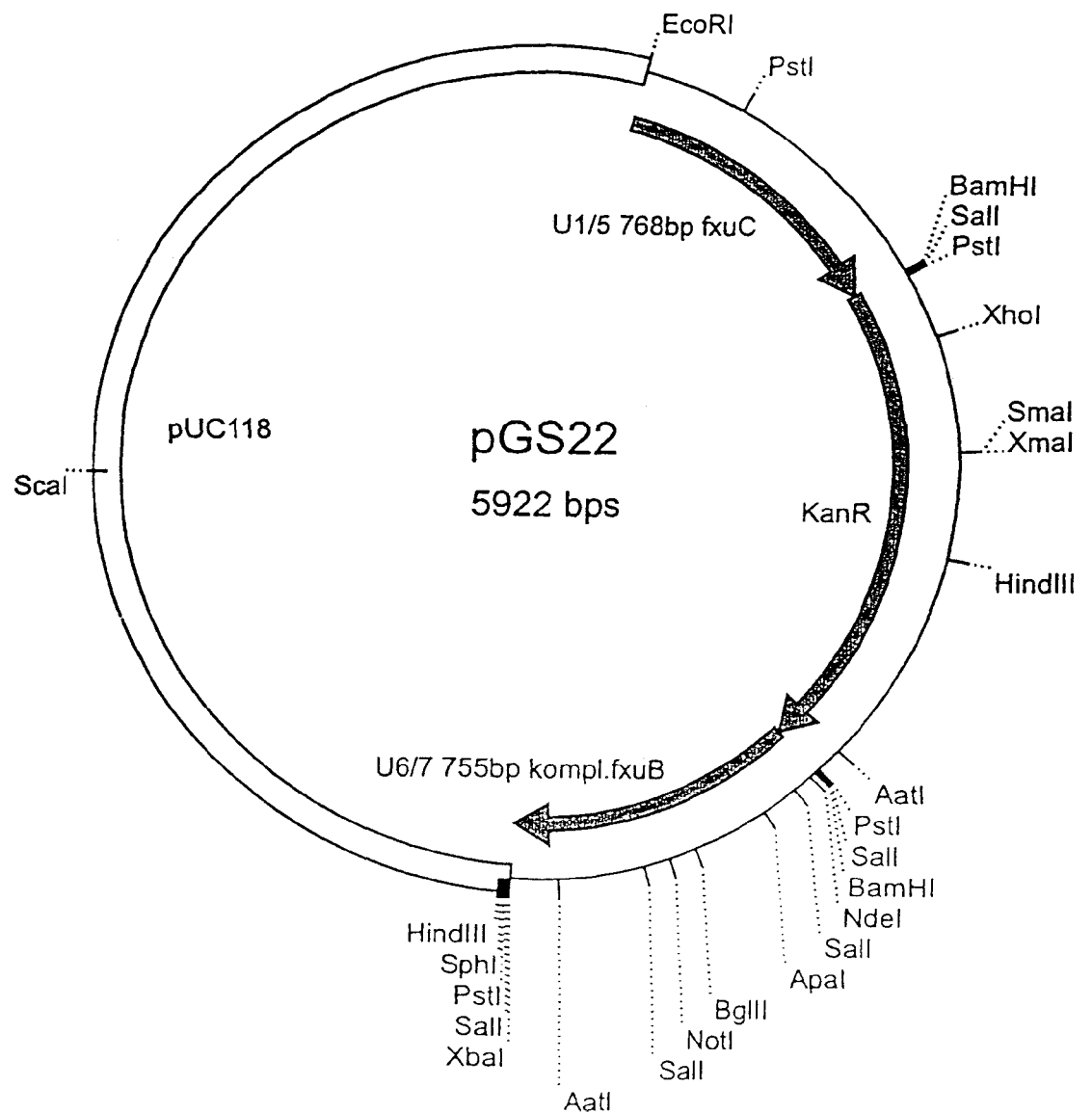
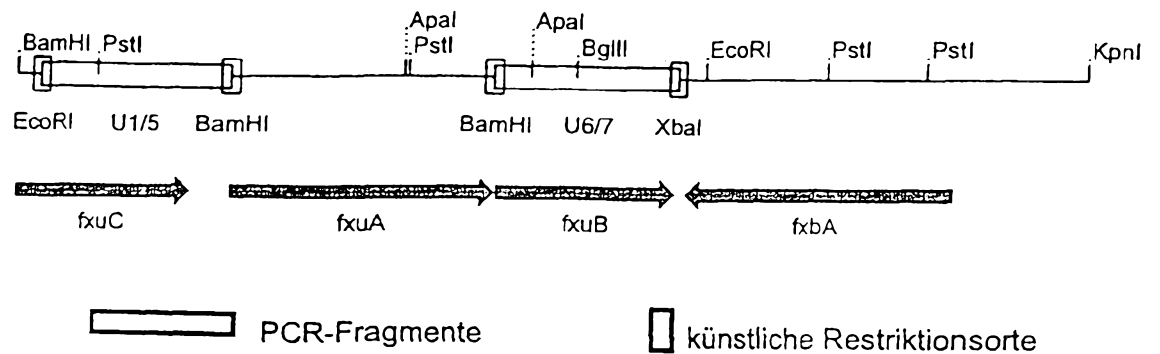


Dr. Tóth-Urbán László

ügyvéd

1093 Budapest, Közvásár u. 24. I. 11/a
Adószám: 41482056-2-41

OTP számlaszám: 11705008-20145410

fxuA törlésére szolgáló szerkezet

Dr. Tom-Urban László

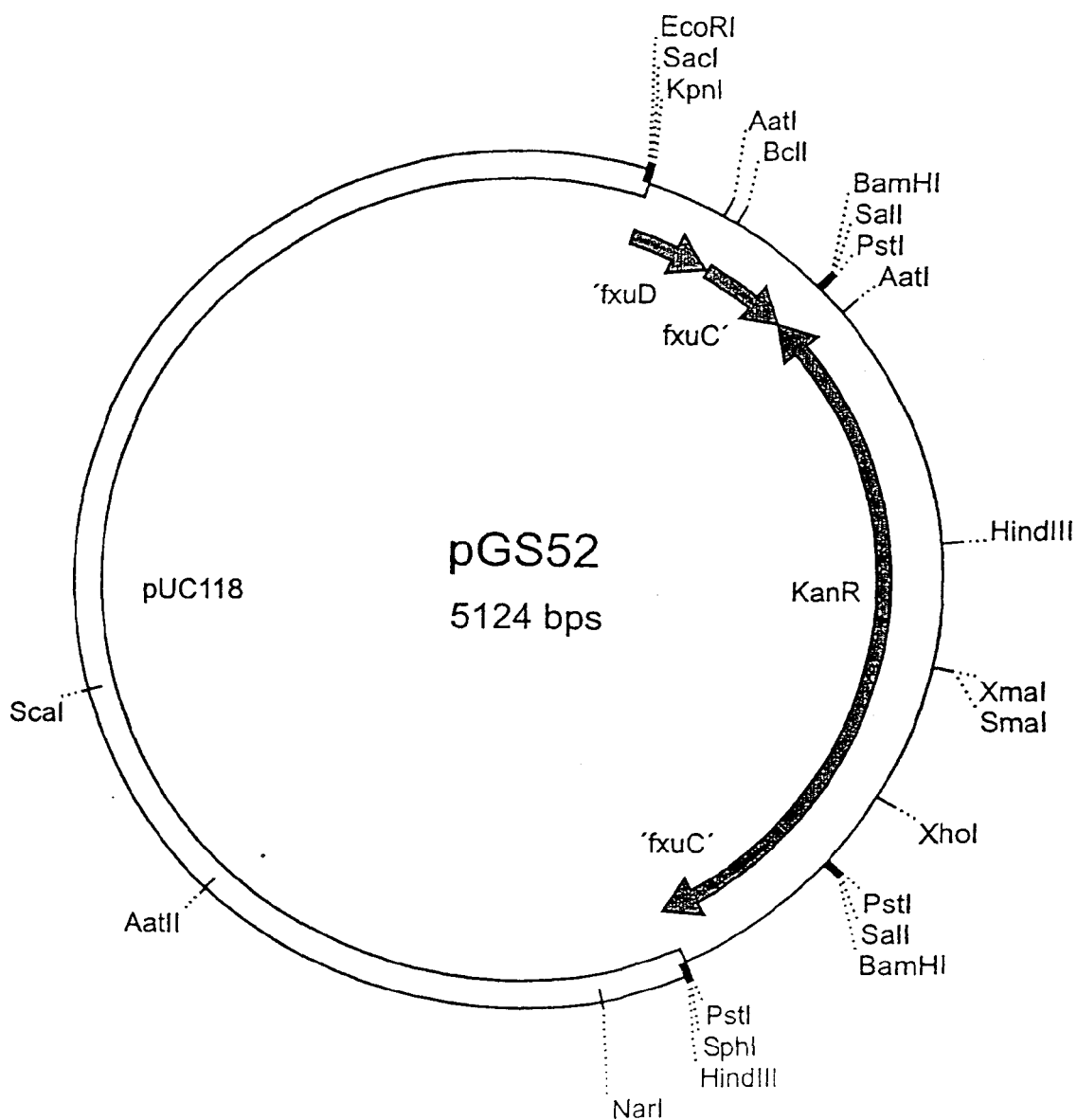
ügyvéd

1093 Budapest, Közvárker u. 24. I. 11/a.

Adószám: 41462036-2-43

OTP számlaszám: 11705008-20145410

pGS 52 plazmid restrikciós térképe



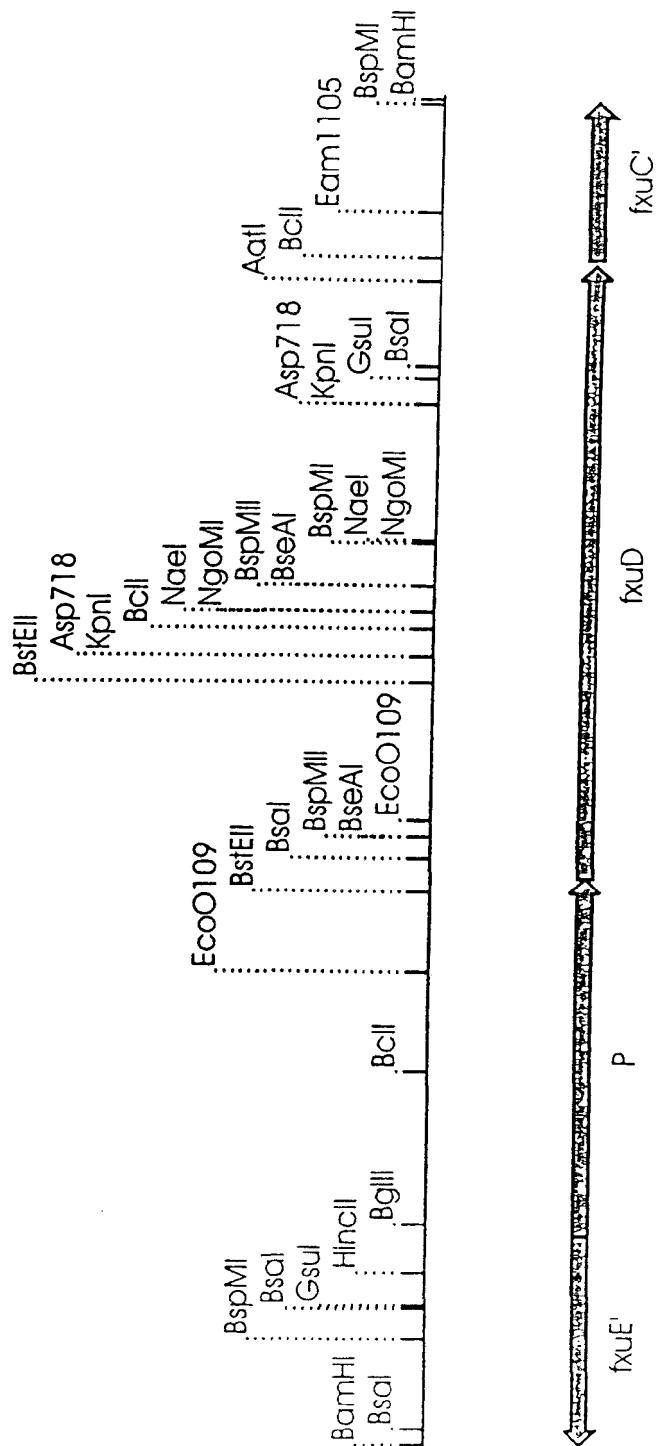
Dr. Totu-Urgan Laszlo

ügyvéd

1093 Budapest, Közvásár u. 24. I. 11/a
Adószám: 41402056-2-43

OTP számlaszám: 11705008-20145410

pGS 41 plazmid inzertje (1748 bps)



Dr. Toth-Urban László

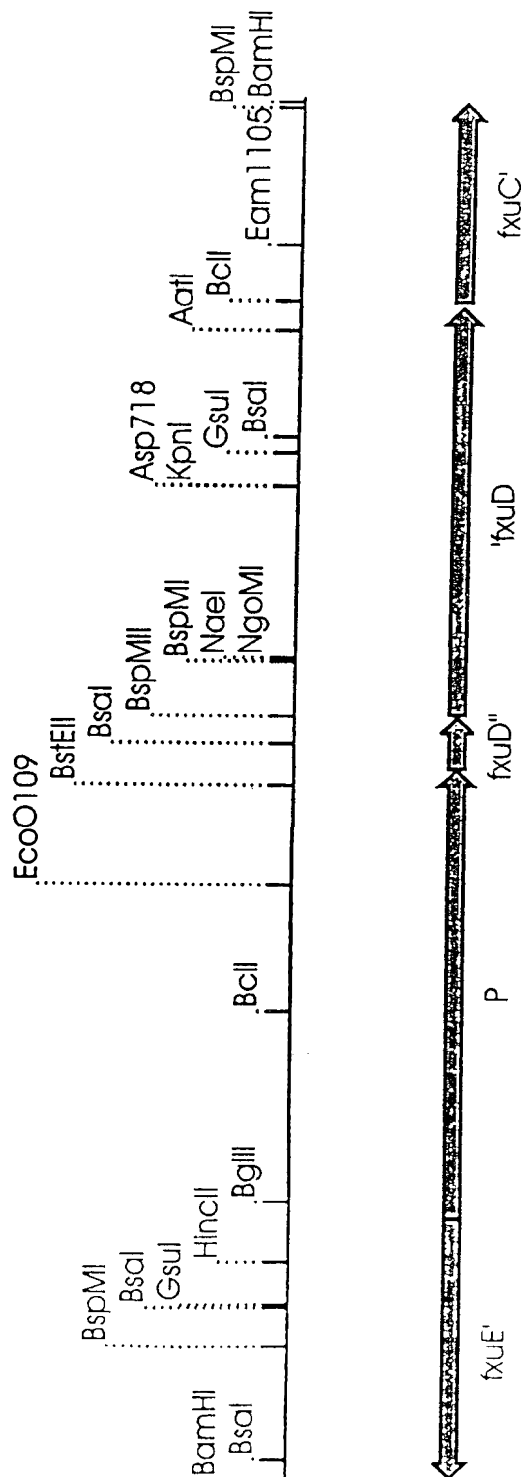
ügyvéd

1093 Budapest, Közpark u. 24. I. 11/a

Adószám: 4142556-2-17

OTP számszám: 11705008-20145416

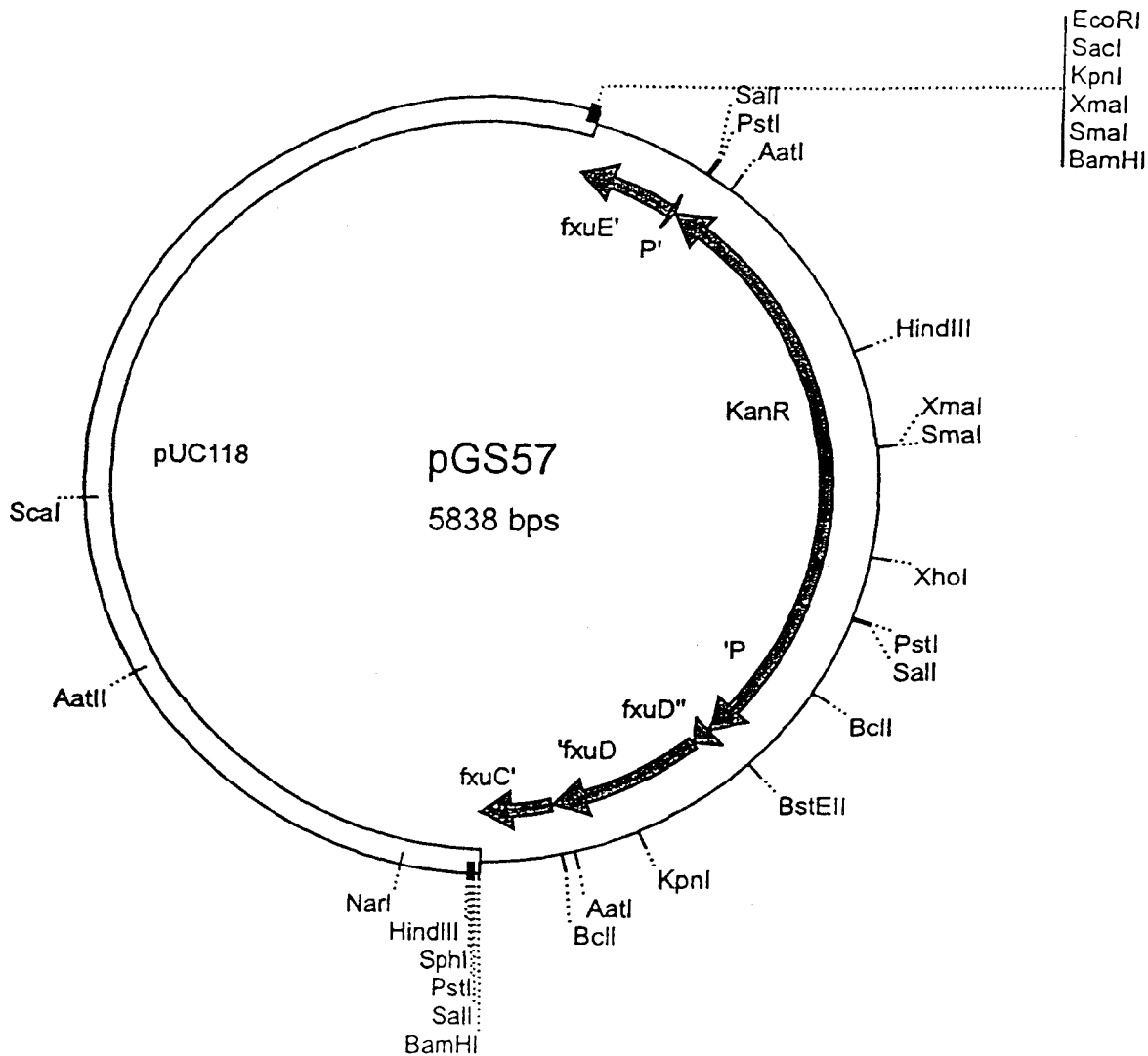
pGS 56 plazmid inzertje (1428 bps)



1093 Budapest, Könyvek u. 24. 11/a
 Áll. sz.: 41462036-2-43
 OTP számszám: 11705008-20145416

8. ábra

pGS 57 plazmid restrikciós térképe



Dr. Tóth-Urban László

ügyvéd

1093 Budapest, Közvartár u. 24. I. 11/a.

Adószám: 41402936-2-43

OTP számlaszám: 11705008-20145410