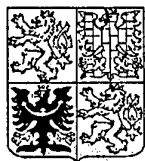


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

- (21) Číslo přihlášky: **2825-91**
 (22) Přihlášeno: 16. 09. 91
 (30) Právo přednosti:
 24. 09. 90 CH 90/03066
 (40) Zveřejněno: 15. 04. 92
 (47) Uděleno: 27. 02. 95
 (24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17. 05. 95

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 P 17/00
C 12 P 17/12
C 12 P 17/14
C 12 N 1/21
C 12 N 15/74

(73) Majitel patentu:
 LONZA A.G.
 Gampel/Wallis (Dir.: Basel)
 CH

(72) Původce vynálezu:
 Zimmermann Thomas dr., Naters, CH;
 Klener Andreas dr., Visp, CH;
 Harayama Shigeaki dr., Les Avanchets, CH;

(54) Název vynálezu:
**Způsob hydroxylace methylových skupin
 v aromatických heterocyklech, hybridní
 plasmidy pL05 a p L04 a mikroorganismy
 Pseudomonas putida a Escherichia coli**

(57) Anotace:
 Způsob hydroxylace methylových skupin aromatických pětičlenných nebo šestičlenných heterocyklů se provádí pomocí mikroorganismů, které obsahují geny Pseudomonas TOL-plasmidu, které tvoří aktivní xylenmonooxygenázu, netvoří žádnou účinnou chromosomálně nebo plasmidově kódovanou alkoholdehydrogenázu. Dále je uveden hybridní plasmid pL04, hybridní plasmid pL05, mikroorganismus Escherichia coli K12 DSM 6153 a mikroorganismus Pseudomonas putida JD7 DSM 6152.

Způsob hydroxylace methylových skupin v aromatických heterocyklech, hybridní plasmidy pL05 a pL04 a mikroorganismy *Pseudomonas putida* a *Escherichia coli*

Oblast techniky

Vynález se týká mikrobiologického způsobu hydroxylace methylových skupin v aromatických pětičlenných nebo šestičlenných heterocyklech. Vynález se také týká nových hybridních plasmidů a nových produkčních kmenů, které jsou zvláště vhodné pro uvedený způsob.

Tyto hydroxymethylované heterocykly jsou například důležitými meziprodukty pro výrobu farmaceutických prostředků a chemikálií používaných v zemědělství.

Dosavadní stav techniky

Mikrobiologický způsob terminální hydroxylace alifatických vedlejších řetězců pomocí mikroorganismů změněných technikami genového inženýrství je znám z evropského patentu č. A 277 674. Tato reakce je katalyzována alkanhydroxylázou, která je kódována geny *alkBA* z OCT-plasmidu z *Pseudomonas oleovorans*.

Tyto mikroorganismy byly geneticky tak změněny, že již nejsou schopné dále oxidovat vzniklé hydroxylové skupiny na kyselinu. Přírozená exprese a regulace (*alkR*) těchto genů byla však ponechána. Tyto mikroorganismy nemají žádnou aktivitu pro oxidaci methylových skupin v heterocyklech, ale jen katalyzují hydroxylaci alkanů a alkylovaných sloučenin s alkylovými zbytky se 6 až 12 atomy uhlíku.

Dále je z Harayama a spol., *J. Bacteriol.* 171, 1989 str. 5048 až 5055 známo, že mikroorganismy druhu *Pseudomonas putida* s plasmidem *pWWO* mohou oxidovat ve třech krocích methylovou skupinu na toluenu za vzniku kyseliny benzoové. Působením xylenmonooxygenázy (*xylMA*) vzniká přitom nejdříve benzylalkohol, který se potom ve dvou dalších krocích katalyticky převádí pomocí alkoholdehydrogenázy (*xylB*) a aldehyddehydrogenázy (*xylC*) na kyselinu. V tomto kmeni jsou jak *xyl*-geny, které kódují enzymy pro odbourání xylenu, tak geny, které odpovídají za regulaci *xyl*-genů, na plasmidu *pWWO*.

Tím jsou z toho známy vlastnosti, identifikace, klonování, selekce stejně jako restriční mapy genů *xylMABCN*, které jsou odpovědné za oxidaci methylových skupin. Funkce genu *xylN* je ještě neznámá. Není však znám žádný mikrobiologický způsob, který může hydroxylovat methylové skupiny v aromatických pětičlenných nebo šestičlenných heterocyklech.

Chemicky jsou navíc takovéto specificky hydroxymethylované heterocykly jen těžce dostupné.

Podstata vynálezu

Úlohou předloženého vynálezu je nalézt mikrobiologický způsob specifické hydroxylace methylových skupin v aromatických

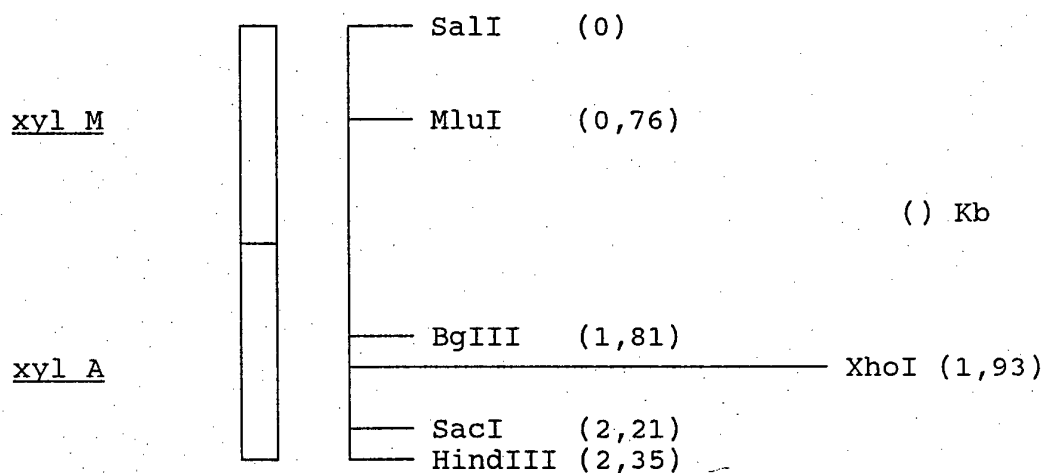
pětičlenných nebo šestičlenných heterocyklech za vzniku odpovídajících čistých hydroxymethylovaných derivátů, přičemž produkty nesmějí být dále katabolizovány.

Tato úloha je řešena způsobem podle nároku 1. Podle vynálezu se způsob provádí s mikroorganismy, které

- a) obsahují geny *Pseudomonas* TOL-plasmidu, které tvoří aktivní xylemmonooxygenázu
- b) netvoří účinnou chromosomálně nebo plasmidově kódovanou alkoholdehydrogenázu.

Tím jsou mikroorganismy schopné hydroxylovat methylové skupiny pětičlenných nebo šestičlenných aromatických heterocyklů za vzniku odpovídajících hydroxymethylderivátů. Přitom heterocyklus slouží jako substrát pro reakci a nemá žádný substituent na přilehlém atomu uhlíku k hydroxylovatelné methylové skupině. Hydroxymethylderivát není dále katabolizován.

Mikroorganismy obsahují účelně geny pro tvorbu xylemmonooxygenázy z *Pseudomonas* TOL-plasmidu pWVO, které jsou charakterizovány následující restrikční mapou a jsou již popsány v *J. Bacteriol.* 171 (1989), str. 5048-5055:



Zdroj genů xylemmonooxygenázy

Jako zdroj genů xylemmonooxygenázy lze použít *Pseudomonas putida* s TOL-plasmidem pWVO, který lze například získat pod ATCC 33015 uloženým v Americké sbírce typů kultur (American Type Culture Collection).

Genetickou informaci, která kóduje xylemmonooxygenázu, lze potom získat tak, že a) se izoluje TOL-plasmid-DNA z mikroorganismu, který slouží jako zdroj DNA, potom b) se štěpí tato TOL-plasmid-DNA pro izolaci genu xylemmonooxygenázy a specifická genová sekvence se potom c) vnese do expresního vektoru, a tím d) vznikne hybridní plasmid. Tento hybridní plasmid se potom vnese do vhodného mikroorganismu e) (hostitelského) s pomocí transformace f). Tento transformovaný hostitelský kmen tvoří potom produkční kmen g) (po selekci h)) pro způsob fermentace i) podle vynálezu.

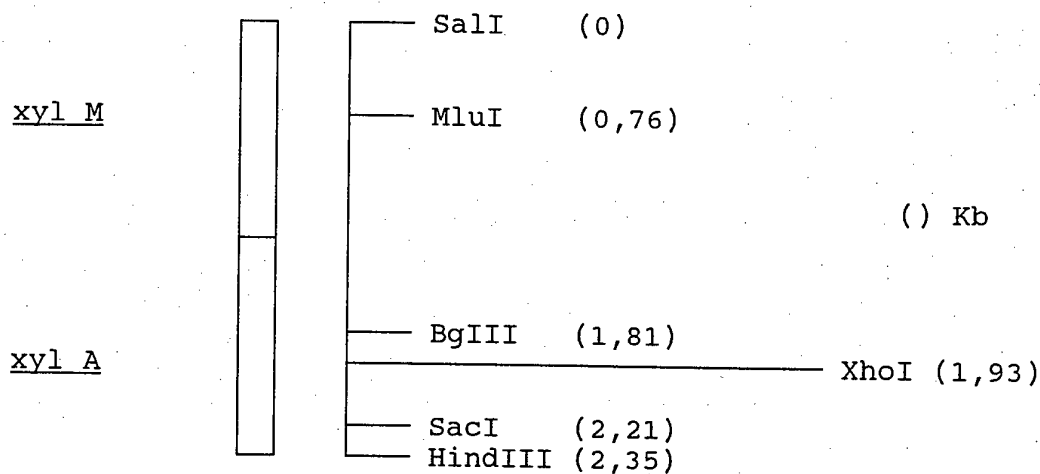
a) Izolace TOL-plasmid-DNA

TOL-plasmid-DNA lze získat metodami známými pro odborníka, jako například metodou podle Hansena a Olsena (J. Bacteriol. 135, 1978, str. 227 až 238) nebo podle Humphreyse a spol. (Biochim. Biophys. Acta 383, 1975, str. 457 až 483). Účelně se používá pro izolaci velkého množství TOL-plasmid-DNA metody podle Humphreyse a spol. (Biochim. Biophys. Acta 383, 1975, str. 457 až 483). Podle této metody se *Pseudomonas putida* (ATCC 33015) úplně lyzuje a následovně se izoluje TOL-plasmid odstředěním v gradientu hustoty.

b) Štěpení restričními enzymy a izolace DNA elektroforezou na agarosovém gelu.

Po izolaci TOL-plasmid-DNA se TOL-plasmid-DNA štěpí restričními enzymy Sali I a HindIII, přičemž se potom izoluje fragment DNA, který kóduje xylene-monooxygenázu, elektroforezou na agarosovém gelu. Tento postup se provádí podle Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1987, odstavec 2.6 "Izolace a čištění velkých restričních fragmentů DNA z agarosových gelů".

Tento fragment DNA je charakterizován následující restriční mapou, jak už bylo dříve uvedeno, a neobsahuje žádné geny, které kódují účinnou alkoholdehydrogenázu:



c) Ligace fragmentu DNA do expresního vektoru

Takto získaný genový fragment se pomocí obvyklých molekulárně biologických technik liguje s DNA expresního vektoru předem stejně štěpenou, za vzniku hybridního plasmidu.

Expresní vektory obvykle obsahují vhodný, většinou regulovatelný promotor. Za tímto promotorem leží výhodně ve směru transkripce jedno nebo více singulárních míst štěpení pro restriční enzymy. Do těchto míst štěpení se potom obvyklým způsobem inseruje příslušný genový fragment, o jehož expresi je zájem.

Jako expresní vektory se účelně používají ty, které jsou uvedeny v tabulce 1. Jako expresní vektory se účelně podle vyná-

lezu používají vektory se širokým hostitelským spektrem (broad host range), jako jsou pME285, pKT240, pMMB67EH nebo pMMB67EH*.

Účelně jsou tyto expresní vektory štěpeny restričními enzymy Sall a HindIII, a vzniklé restriční konce se ligují s izolovanou TOL-plasmid-DNA pomocí například T4-DNA-ligázy. Popřípadě je možné použít jiné metody ligace, jako se například popisuje v Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1989, odstavec 3.16, Subklonování fragmentů DNA.

d) Hybridní plasmidy

Účelně takto vzniklé hybridní plasmidy pL03, pL04 a pL05 jsou také součástí vynálezu, vykazují široké hostitelské spektrum a mohou se tedy použít v hostitelských kmenech s vysokou tolerancí vůči substrátu a produktu.

Účelně jsou tyto hybridní plasmidy odpojovány přírodními regulačními systémy.

Hybridní plasmid pL04 (sestavající z expresního vektoru pMMB67EN a TOL-plasmid-genu popsaného shora uvedenou restriční mapou) s promotorem P_{tac} je tedy řízen represorovým genem lacI_g.

Expresi TOL-plasmid-genu lze indukovat isopropylthiogalaktosidem (IPTG).

Exprese TOL-plasmid-genu v hybridní plasmid pL05 (sestavající z vektoru exprese pMMB67EH* a TOL-plasmid-genu a charakterizovaný restriční mapou na str. 3) s promotorem P_{tac} je stále (konstitutivně) indukována z důvodu chybějícího genu represoru lacI_g. Proto se účelně gen represoru lacI_g mutuje do pMMB67EH* zavedením kanamycinové rezistence. Také je možné použít hybridní plasmid s užším hostitelským spektrem. Účelně se jako hybridní plasmid s užším hostitelským spektrem používá pGSH2836 s promotorem λP_L , přičemž je exprese TOL-plasmid-genu stále (konstitutivně) indukována. Jestliže například slouží Escherichia coli (E.coli) K12* jako hostitel pro pGSH2836, musí se chromosómně integrovaný gen represoru cI857 tepelně inaktivovat, aby se dosáhla exprese promotoru λP_L .

Hybridní plasmid pGSH2836 je uložen v E.coli K12* pod číslem DSM 6154 u Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur /Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascherodeweg 1b, D-3300 Braunschweig/. Hybridní plasmidy pL04 a pL05 jsou uloženy v E.coli K12* (pL04) nebo v Pseudomonas putida (pL05), jak je popsáno v dalších odstavcích.

e) Hostitelské kmeny

Na základě širokého hostitelského spektra mohou být takto vzniklé hybridní plasmidy (pL03, pL04, pL05) vneseny do velkého počtu hostitelských kmenů.

Účelně se používají hostitelské kmeny s vysokou tolerancí k substrátu a produktu, jako například rodu *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* nebo *Escherichia*.

f) Transformace

Vnesení hybridních plasmidů do dříve popsaných hostitelských kmenů lze uskutečnit pomocí obvyklých metod, výhodně podle metody Lederberga a Cohena (*J.Bacteriol.*, 119, 1974, str. 1072 až 1074).

g) Produkční kmeny

Jako produkční kmeny jsou účelně používány všechny ty kmeny, které jsou uvedeny v tabulce 2. Mikroorganismy (tabulka 2) transformované hybridními plasmidy pL03, pL04 a pL05 jsou nové a jsou také součástí vynálezu.

Výhodně se používá mikroorganismus *E.coli* K12* transformovaný hybridním plasmidem pL04, uložený 29.8.1990 pod číslem DSM 6153 nebo mikroorganismus *Pseudomonas putida* JD7 transformovaný hybridním plasmidem pL05, uložený 29.8.1990 pod číslem DSM 6152, a jejich deszendenty a mutanty.

Mikroorganismy jsou uloženy u Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*) Mascheroderweg 1b, D-3300 Braunschweig.

Jako produkční kmeny lze také použít takové mikroorganismy, které obsahují přírodní TOL-plasmid a u kterých je odstraněn nebo inaktivován gen, který kóduje účinnou alkoholdehydrogenázu. Inaktivaci případně odstranění genu lze uskutečnit klasickou mutací, například s acridinovou oranží pomocí inserce transposonu (*Transposon-insertion*) nebo metodou genového replacementu (*Gene-replacements*) s homologovou rekombinací (*A. Zimmermann a spol., Molecular Microbiology* 5, 1991, str. 1483 až 1490).

V těchto produkčních kmenech se potom uskuteční exprese TOL-plasmid-genů, například indukci sloučeninami jako jsou toluen, xylen nebo cymen a buněčných kultur, Mascheroderweg 1b, D-3300 Braunschweig.

Odstranění genu alkoholdehydrogenázy se účelně provádí tak, že se homologovou rekombinací vnese do přirozeného TOL-plasmidu předem připravený pomocný hybridní plasmid, ve kterém je již gen alkoholdehydrogenázy odstraněn ("*Gene-replacement*" homologovou rekombinací).

Tímto vnesením se v přirozeném TOL-plasmidu vhodně odstraní alkoholdehydrogenáza.

h) Selektce transformovaných mikroorganismů (produkčních kmenů)

Transformované mikroorganismy se vyberou obvyklým způsobem na minimálním médiu glukosa-agar vhodným antibiotikem s odpovídající inhibiční koncentrací. Použité známky resistance proti antibiotiku jsou uvedeny v tabulce 1.

i) Způsob fermentace

Produkční kmeny, jejich descendenty a mutanty, připravené podle dříve popsanych postupů, se podle vynálezu použijí pro způsob hydroxylace methylových skupin v pětičlenných nebo šestičlenných aromatických heterocyklech.

Jako substráty se pro reakci mohou používat methylované aromatické pětičlenné nebo šestičlenné heterocykly, které obsahují jeden nebo více heteroatomů ze skupiny kyslík, dusík, síra. Vhodnými pětičlennými heterocykly jsou například deriváty thiofenu, furanu, pyrrolu, thiazolu, pyrazolu a imidazolu, které nemají žádný substituent na sousedním atomu uhlíku k methylové skupině, která má být hydroxylována. Výhodně se jako pětičlenné heterocykly používají 3,5-dimethylpyrazol, 4-methylthiazol a 2,5-dimethylthiofen.

Vhodné šestičlenné heterocykly jsou například methylované deriváty pyridinu, pyrimidinu, pyrazinu a pyridazinu, které nemají žádný substituent na sousedním atomu uhlíku k methylové skupině, která má být hydroxylována. Výhodně se jako šestičlenné heterocykly používají 2-chlor-5-methylpyridin, 2,5-dimethylpyrazin a 2,6-dimethylpyrimidin.

Před přidáním substrátu se buňky kultivují v kultivačním médiu na optickou hustotu 1 až 200 při 650 nm (OD_{650}), výhodně až na optickou hustotu 5 až 100.

Reakce se provádí buď při jednorázovém, nebo kontinuálním přidání substrátu tak, aby koncentrace substrátu v kultivačním médiu nepřesáhla 20 % (hmotn./obj.) popřípadě (obj./obj.) pro kapalné substráty, přičemž zkratka (hmotn./obj.) znamená hmotnost na objem a zkratka (obj./obj.) znamená objem na objem.

Výhodně se substrát přidává tak, aby koncentrace substrátu v kultivačním médiu nepřesáhla 5 % (hmotn./obj.) popřípadě (obj./obj.).

Reakce se obvykle provádí s buňkami v klidu při hodnotě pH od 4 do 11, výhodně od 6 do 10.

Reakce se obvykle provádí při teplotě od 15 do 50 °C, výhodně při teplotě od 25 do 45 °C.

Po reakci lze odpovídající hydroxymethylderiváty izolovat postupem známým v oboru.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Klonování genů xylMA

1.1. Příprava plasmidu

(Humphreyes a spol., Biochim. Biophys. Acta 383 (1975), str. 457-483).

Buňky z 1 l vyprané bakteriální kultury *Pseudomonas putida* pWWO (ATCC 33015) se odstředí. Po resuspendování buněk v 10 ml 25 % sacharózy v 0,05 M tris-puftru, pH 8,0 se přidá 1,5 ml roztoku lysozymu (20 mg/ml v 0,25 M tris-puftru, pH 8,0). Následuje inkubace po dobu 5 min na ledu. Přidá se 10 ml 0,25 M Na₂EDTA (pH 8) a následuje další inkubace na ledu po dobu 5 min. Dále se přidá 15 ml roztoku Brij[®] polyoxyethylenlaurylether/DCL (1 % Brij[®] 58, 0,4% natriumdesoxycholát v 0,01 M tris-puftru, 0,001 M Na₂EDTA, pH 8,0). Následuje dobré rovnoměrné promíchání, inkubace na ledu po dobu 30 min až k úplné buněčné lyse.

Po odstředění po dobu 45 min při 4 °C při 16 000 otáčkách za min se supernatant dekantuje do autoklávovaného odměrného válce. Přidá se 3% roztok NaCl (hmotn./obj.) a 10% PEG (polyethylenglykol). Opatrným obrácením válce uzavřeného filmem parafinu se získá roztok, který se inkubuje 2 hodiny při 4 °C. Ten se potom odstředí 2 minuty při 5 000 otáčkách za minutu. Supernatant se potom dekantuje, a sraženina se rozpustí v 5 ml TES-puftru (0,05 M tris, 0,005 M Na₂EDTA, 0,05 M NaCl, pH 8,0) a přenesse se do autoklávované 15 ml Corex-trubičky s 8,0 g chloridu vápenatého. Potom se přidá 0,6 ml roztoku bromidu ethidia (10 mg/ml) a inkubuje se 30 minut na ledu. Následuje odstředění po dobu 30 minut při 4 °C při 12 000 otáčkách za minutu, potom se opatrně dekantuje, aby se z roztoku odstranil vysrážený PEG. Roztok se potom podrobí ultracentrifugaci v uzavřených trubičkách s rotorem 50TI při 40 000 otáčkách za minutu po dobu 30 hodin a při teplotě 18 °C. Potom se pásy plasmidů izolují z gradientů CsCl₂ kanylou před UV-transiluminátorem. Potom se odstraní bromid ethidia z plasmidového preparátu vytřepáním s n-butanolem. Plasmid-DNA se vysráží isopropanolem a sraženina se suší v rychlovakuové odparce (Speed Vac[®] Concentrator). Plasmidový preparát se resuspenduje v 0,01 M tris-puftru, 0,001 M Na₂EDTA, pH 8,0.

1.2. Isolace xylMA fragmentů DNA z agarosových gelů

Plasmid-DNA štěpená Sali a HindIII (vždy 4 jednotky na µg plasmid-DNA) se podrobí preparativní elektroforéze na agarosovém gelu /0,6 % (hmot./obj.) agarosa v TBE-puftru (0,09 M tris-borát, 2,5 mM Na₂EDTA, pH 8,3, ethidiumbromid (100 µg/100 ml)/. Malé proužky membrány z DEAE-celulosity se připraví v H₂O a vloží se do zářezu v agarosovém gelu těsně před příslušným pásem fragmentu DNA. DNA se nechá shlukovat na membráně v napětovém poli. Popřípadě se na další membráně zadržují vyšší pásy DNA. Nahloučená DNA

se z membrány vymyje 500 μ l elučního pufru (20 mM tris, pH 7,5, 1 mM Na_2EDTA , 1,5 M NaCl) během 1 hodiny při 65 °C. Membrána se odstraní a opláchne. Ethiniumbromid se z roztoku DNA extrahuje n-butanolem nasyceným H_2O , DNA se precipituje isopropanolem. Sraženina se suší v rychlovakuové odparce (Speed Vac[®] Concentrator). Fragmentový preparát se resuspenduje v 0,01 M tris-pufre, 0,001 M Na_2EDTA , pH 8,0.

1.3. Ligace xylMA fragmentů DNA s expresními vektory (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1989), odstavec 3.16, Subklonování fragmentů DNA).

a) Příprava hybridního plasmidu pL04

Příprava DNA expresního vektoru

Před ligací se DNA vektoru pMMB67EH (2 μ g) štěpí 10 jednotkami Sall I a HindIII v odpovídajícím ligačním pufru (20 mM tris-pufr, 10 mM DTT (dithioerythritol), 10 mM MgCl_2 , 0,6 mM ATP, pH 7,2). Tato rozštěpená DNA se potom defosforyluje 4,8 jednotkami alkalické fosfatázy. DNA se opakovaně vysráží a promývá isopropanolem.

Ligace xylMA-DNA s DNA expresního vektoru

Jednotlivé vzorky DNA (v různých poměrech množství při nadbytku insertní DNA) se spojí a podrobí se srážení isopropanolem. Vysušené sraženiny se vnesou do 40 až 100 μ l ligačního pufru (20 mM tris-pufr, 10 mM DTT, 10 mM MgCl_2 , 0,6 mM ATP, pH 7,2).

K ligaci dojde po přidání 0,2 jednotek T4-DNA-ligázy na 1 μ g DNA při inkubaci přes noc při 12 až 16 °C. Potom se ligační směs použije přímo pro transformaci.

b) Příprava hybridního plasmidu pL05

Shodně s příkladem 1.3.a) se připraví expresní vektor pMMB67EH* a shodně podle příkladu 1.3.a) se potom do tohoto vektoru liguje xylMA-gen.

1.4. Transformace příslušných buněk DNA hybridního plasmidu (pL04)

a) Koncentrování DNA hybridního plasmidu (pL04)

Buňky 25 ml kultury E.coli S17-1 jako pomocného kmenu se pěstují při $\text{OD}_{546} = 2,0$ a zpracují se podle metody Lederberga a Cohena (J.Bacteriol., 119 (1974), 1072 až 1074).

Po promytí těchto buněk v 10 ml 0,1 M MgCl_2 se buňky inkubují po dobu 30 minut v 10 ml 0,1 M CaCl_2 na ledu. Potom se tyto buňky odstředí a resuspendují v 1 ml 0,1 M CaCl_2 . Každých 0,2 ml buněčné suspence se smíchá s 0,5 μ g ligované DNA hybridního plasmidu pro transformaci. Následuje inkubace po dobu delší než 30 minut na ledu a dvouminutový tepelný šok při 42 °C. Potom se buněčné suspence doplní na 5 ml předehřátým kvasinkovým živným

prostředím (Nutrient Yeast Broth, Oxoid, Wesel, BRD). Potom se suspence inkubuje 1 hodinu bez třepání a další hodinu s třepáním při optimální teplotě růstu buněk příjemce (*E.coli* S17-1) pro expresi genů. Alikvótní části transformovaných kultur se umístí na odpovídající selektivní média (živný agar, 100 µg ampicilinu na 1 ml).

b) Transformace pL04 do produkčního kmene

Z kmene *E.coli* S17-1 s pL04 se izoluje hybridní plasmid pL04 podle příkladu 1.1. a 1.2. Potom se *E.coli* K12* transformuje hybridním plasmidem pL04 podle metody uvedené v příkladu 1.4.a). Selektce se provádí pomocí selektivního média (živný agar, 100 µg ampicilinu na 1 ml).

1.5. Transformace příslušných buněk s hybridním plasmidem pL05

Hybridní plasmid pL05 v *Pseudomonas putida* JD7 se transformuje podle příkladu 1.4. Selektce se provádí pomocí selektivního média (živný agar, 50 µg kanamycinu na 1 ml).

Příklady 2 až 8

Hybridní plasmid pL03 se připraví podle příkladu 1.3. Hybridní plasmidy pGSH2836, pL03, pL04 a pL05 se transformují do hostitelských kmenů *E.coli* K12*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO25, *Pseudomonas putida* JD7 a *Pseudomonas putida* podle příkladů 1.4 a 1.5. Výtěžky reakce těchto produkčních kmenů jsou shrnuty v tabulce 2.

Příklad 9

Konstrukce mutantů xylB

9.1. Konstrukce plasmidu pL010

Geny xylMABCN se izolují z plasmidu pGSH2816 (Haramaya a spol., *J.Bacteriol.*, 171, 1989) pomocí EcoRI a HpaI - restrikce a následuje ligace do vektoru pBR322 podobně rozštěpeného (Bolívar a spol., *Gene* 2, 1977, str. 95 ff).

9.1.1. Štěpení restrikčními enzymy a izolace DNA elektroforesou na agarosovém gelu.

pGSH2816-DNA štěpená pomocí EcoRI a HpaI (vždy 5 jednotek na 1 µg DNA) se rozdělí pomocí preparativní elektroforesy na agarosovém gelu (0,7 % agarosy v 0,09 M tris-borátu, 2,5 mM Na-EDTA, pH 8,3) a izolují se fragmenty DNA hledané velikosti (podle příkladu 1.2.).

9.1.2. Ligace fragmentu DNA s xylMABCN do pBR322

(*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York 1988: odstavec 3.16, Subklonování fragmentů DNA).

a. Příprava vektorové DNA

Před ligací se rozdělí pBR322-DNA (2 µg) pokaždé s 10 jednotkami EcoRI a ScaI preparativní elektroforesou na agarosovém gelu v restričním pufru (50 mM tris, 10 mM MgCl₂, 100 mM). Isolují se pruhy požadované velikosti 3850 bp, jak se popisuje v příkladu 9.1.1.

b. Ligace

Pro ligaci se spojí vzorky DNA (v různých poměrech množství při přebytku insertní DNA), přidá se k nim ligační pufr (20 mM tris, 10 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 0,6 mM ATP, pH 7,2) a po přidání 1 jednotky T4-DNA-ligázy se inkubuje přes noc při 12 až 16 °C. Potom se tato ligační směs přímo použije pro transformaci.

c. Transformace E.coli C600
(podle příkladu 1.4.)

Selekce se provádí na živném agaru tetracyklinem (25 µg/µl). Po kontrole restrikce se čistí větší množství pL010-DNA pomocí gradientu CsCl.

9.2. Konstrukce plasmidu pL011

9.2.1. Štěpení pL010-DNA restričními enzymy

5 µg pL010-DNA se štěpí 22 jednotkami HindIII v restričním pufru (10 mM tris, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,5) a podrobí se preparativní elektroforesi na agarosovém gelu. Isolují se dva fragmenty o velikosti 3,8 kb popřípadě 2,9 kb, jak je popsáno v příkladě 9.1.1. a vloží se do 45 popřípadě 30 µl vody. Fragmenty obsahují vektor pBR322 a rozsah xyl-genů kromě xylB.

9.2.2. Ligace

Oba fragmenty izolované podle příkladu 9.2.1. se použijí pro ligaci, jak je popsáno v příkladě 9.1.2b. K tomuto účelu se smíchá 45 µl fragmentu 3,8 kb, 30 µl fragmentu 2,8 kb, 10 µl ligačního pufru, 10 µl 10 mM ATP a 1 µl T4-DNA-ligázy. Směs se inkubuje přes noc při 12 až 16 °C. Potom se DNA sráží ethanolem a vnese do 10 µl vody.

9.2.3. Transformace E.coli HB101

DNA připravená podle příkladu 9.2.2. se přímo použije pro transformaci E.coli HB101 (podle příkladu 9.1.2c). Transformované buňky se podrobí selekci na živném agaru s tetracyklinem (25 µg/µl).

9.3. Převedení pL011 do E.coli HB101 obsahující PRK2013

E.coli HB101 obsahující PRK2013 je zvoleno jako hostitel pro pL011. Pomocí funkce kódované na PRK2013 je možná mobilizace do jiných gram-negativních bakterií, jako například Pseudomonas putida JD7 s pWOW.

Isolovaná pL011-DNA se transformuje do E.coli HB101 obsahující pRK2013 podle příkladu 9.1.2a. Selektce se uskutečňuje na živném agaru s tetracyklinem (25 µg/µl) a kanamycinem (25 µg/µl).

9.4. Konjugace E.coli HB101 obsahující pRK2013 pL011 s Pseudomonas putida JD7 obsahující pWWO

Z kultur obou partnerů konjugace pěstovaných přes noc se odstředí 2 ml, několikanásobně se promyjí 0,9% roztokem NaCl (solankou), zředí v 100 µl solanky a smíchají se na destičkách z živného agaru. Pro konjugaci se destičky inkubují po dobu 6 hodin při 30 °C. Vzniklý bakteriální drn (trávník) se resuspenduje v 1 ml solanky a ve vhodném zředění se nanese na destičky z živného agaru s tetracyklinem (50 µg/µl). Ze získaných transkonjugátů se některé dostanou do TOL-plasmidu na základě homologní rekombinace pL011.

9.5. Výměna markerů mezi pL011 a pWWO

Pro zamezení homologní rekombinace xylB na TOL-plasmid pWWO do Pseudomonas putida JD7, se kultivuje více než 100 generací dříve získaných transkonjugátů E.coli, které nebyly podrobeny selekci s tetracyklinem. Přitom je žádoucí vyloučení (odstranění) vektoru pBR322 a intakního genu xylB.

Ke zvýšení počtu mutantů xylB sensitivních na tetracyklin, se provede selekce proti integrovanému vektoru pBR322.

Buňky se umístí do 25 ml komplexního média tvořeného živným kvasinkovým prostředím (Nutrient Yeast Broth, Oxoid, Wesel, BRD) a tetracyklinem (50 µg/µl) a inkubují se až k optické hustotě přibližně 3,0 při OD₆₅₀ a při teplotě 30 °C. Potom se přidá 500 µg/ml cykloserinu C a 100 µg/ml piperacilinu. Po několikahodinové inkubaci při 30 °C se uskuteční téměř úplná buněčná lyse. Buňky, které přežijí, se odstředí, několikrát se promyjí solankou a ve vhodné koncentraci se nanese na destičky živného agaru. Až 85 % získaných kolonií je senzitivních na tetracyklin.

9.6. Test kolonie na přítomnost xylB-delece

9.6.1. Důkaz delece pomocí Southern-Blot-hybridizace pWWO'-DNA z obdržných klonů se izoluje podle Kado a Liu

(J.Bacteriol., 145, str. 1365 až 1373 /1981/). 1 ml kultury pěstované přes noc se odstředí a resuspenduje v 40 mM tris-acetátovém pufru, 2 mM EDTA, pH 7,9. Buňky se podrobí lyse přidáním 200 µl 3 % SDS, pH 12,6, potom se inkubují 1 hodinu při 65 °C a potom se několikanásobně extrahují fenol-chloroformem (1:1).

Vodný roztok DNA se zbaví fenolu opakovaným promýváním diethyletherem a smísí se s 3 M roztokem acetátu sodného o pH 4,8 v objemovém poměru 1:10.

Potom se DNA precipituje ethanolem a po sušení se přidá 100 µl vody.

Přibližně 40 µl vzorku DNA takto připraveného se nechá štěpit 100 jednotkami EcoRI a 5 jednotkami HpaI ve štěpném pufru (50 mM tris, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,5) a podrobí se elektroforese na agarosovém gelu. DNA přemístěná na nitrocelulosoovou membránu se hybridizuje proti 500 ng sondy pL011 značené ³²P-ATP. Delece xylB 1,4 kb je přímo rozeznatelná po autoradiografii.

Příklad 10

Příprava hydroxymethylovaných heterocyklů

E-coli K12* s pL04 (DSM č. 6153) se kultivují přes noc při 30 °C v kvasinkovém živném médiu (Nutrient Yeast Broth, Oxoid, Wesel, BRD) za přídavku odpovídajícího antibiotika uvedeného v tabulce 1 podle metody uvedené v příkladu 1.4. pro stabilizaci plasmidů. Alikvótní část se potom přenese do čerstvého média a inkubuje se další 2 hodiny při 30 °C, před tím než se indukují geny xylenmooxygenázy podle systému exprese (tabulka 1). To se stane přidáním 1 mM IPTG pro indukci exprese pomocí tac-promotoru. Indukční fáze trvá pokaždé mezi 2 až 4 hodinami. Suspense bakterií se odstředí a buněčný sbalek (peleta) se potom resuspenduje v čerstvém médiu bez antibiotika tak, aby se dosáhla hodnota optické hustoty 10 při OD₆₅₀. Tato suspense se pak přidá k 0,1 % roztoku (obj./obj. pro kapalné substráty, hmotn./obj. pro pevné substráty) heterocyklů, které mají být oxidovány, a dále se inkubuje při 30 °C. Po určité době se zjišťuje tvorba produktu v bakteriální suspenzi.

Příklad 11

Pseudomonas putida JD7 s pL05 se pěstuje podle příkladu 10. Z důvodu chybějícího receptorového genu lacI_g není třeba indukovat pomocí IPTG. Kmenu se používá pro reakci heterocyklů stejně jako v příkladu 10.

Příklad 12

E.coli K12* s pGSH2836 (DSM č. 6154) se pro reakci použije ve shodě s příkladem 10. Indukce se uskuteční inaktivováním receptorového genu cI857 působením teploty 42 °C po 2 hodiny.

Příklady 13 a 14

Produkční kmeny připravené v příkladech 2 až 8 se použijí pro reakci podle příkladu 10.

Příklady 15 až 20

Údaje o výtěžcích reakce různých heterocyklů s produkčním kmenem z příkladu 12 jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 1

Vektory exprese (bez xylMA)	popsané v	hybridní plasmidy s xylMA	charakterizovány	velikost v kb
pLV85	J.Bacteriol.169 (1987) str.4457-4462	pGSH2836	ampicilin-resistentní promotor lambda PL	5,25
pME285	Gene 36 (1985) str. 27-36	pL02	kanamycin-senzitivní soli rtuti-resistentní <u>mob⁺</u>	12,95
pKT240	Gene 26 (1983) str. 273-282	pL03	kanamycin-senzitivní ampicilin-resistentní <u>mob⁺</u>	15,25
pMMB67EN	Gene 48 (1986) str. 119-131	pL04	ampicilin-resistentní promotor <u>P_{tac}-lacIq⁺</u>	11,15
pMMB67EH*	-	pL05	ampicilin-resistentní promotor <u>P_{tac}-lacIq⁻</u> kanamycin-resistentní	13,5

Tabulka 2: Produkční kmeny pro hydroxylaci methylových skupin

Příklad	produkční kmeny	obsahující hybridní plasmid nebo mutovaný plasmid (pWVO')	č. uložení DSM	výtěžek v % reakce 2-chlor-5-methyl-pyrimidinu jako substrátu v koncentraci 0,1 % (obj./obj.)
2	E.coli K12*	pGSH2836	6154	80
3	E.coli K12*	pL04	6153	80
4	E.coli K12*	pL03	-	80
5	E.coli K12*	pL05	-	80
6	Pseudomonas aeruginosa PA025	pL05	-	10
7	Pseudomonas putida JD7	pL05	6152	5
8	Pseudomonas putida	pL05	-	5

Tabulka 3: Mikrobiologická oxidace methylovaných aromatických heterocyklů kmenem mikroorganismu: E.coli k12*, který obsahuje vektor exprese pGSH2836

Příklad	substrát	koncentrace substrátu v kult. médiu	doba reakce v h.	konečný produkt	výtěžek v %
15	2-chlor-5-methylpyridin	0,1 % (obj./obj.)	16	2-chlor-5-hydroxymethylpyridin	80
16	2,5-dimethylpyrazin	0,1 % (obj./obj.)	16	2-hydroxymethyl-5-methylpyrazin	50
17	2,6-dimethylpyrimidin	0,1 % (hmot./obj.)	16	2-hydroxymethyl-4-methylpyrimidin	10
18	3,5-dimethylpyrazol	0,1 % (hmot./obj.)	16	3-hydroxymethyl-6-methylpyrazol	10
19	4-methylthiazol	0,1 % (obj./obj.)	16	4-hydroxymethylthiazol	10
20	2,5-dimethylthiofen	0,1 % (obj./obj.)	16	2-hydroxymethyl-5-methylthiofen	10

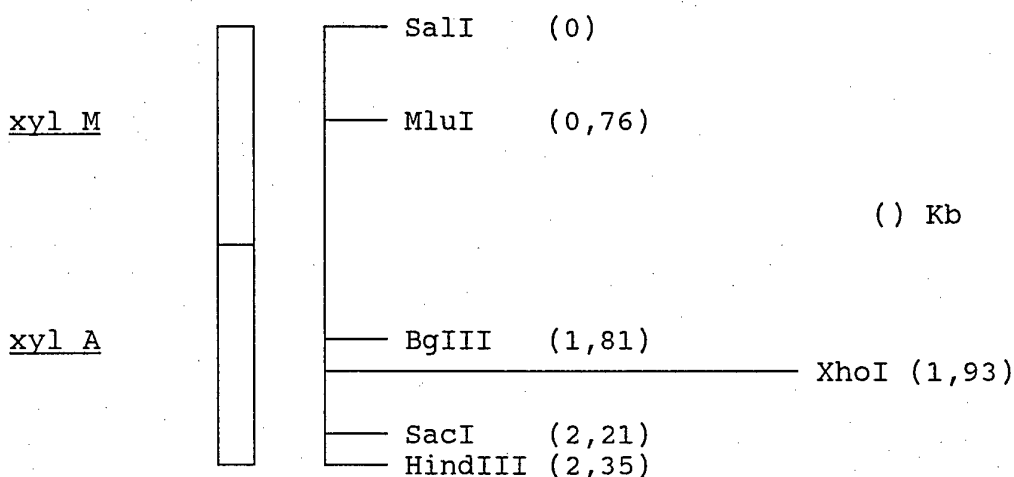
Průmyslová využitelnost

Mikroorganismy a mikrobiologický způsob hydroxylace methylových skupin lze použít všude tam, kde je zapotřebí vyrobit hydroxymethylované aromatické pětičlenné nebo šestičlenné heterocykly. Tyto hydroxymethylované heterocykly jsou například důležité meziprodukty pro výrobu farmaceutických prostředků a chemikálií používaných v zemědělství.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob hydroxylace methylových skupin v aromatických heterocyklech, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se přeměna provádí s mikroorganismy, které

a) obsahují geny Pseudomonas TOL-plasmidu, které tvoří aktivní xyleneoxygenázu a jsou charakterizovány následující restrikční mapou:



b) netvoří účinnou chromosomálně nebo plasmidově kódovanou alkoholdehydrogenázu,

a tím jsou schopné hydroxylovat methylové skupiny aromatických pětičlenných nebo šestičlenných heterocyklů, které obsahují jeden nebo více heteroatomů z řady kyslík, dusík, síra, za vzniku odpovídajícího hydroxymethylderivátu, přičemž heterocyklus slouží jako substrát pro přeměnu a nemá žádný substituent na sousedním atomu uhlíku methylové skupiny, která se má hydroxylovat, a hydroxymethylderivát se dále nekatabolizuje.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se přeměna provádí s mikroorganismy, které patří k rodu Pseudomonas, Acinetobacter, Rhizobium, Agrobacterium nebo Escherichia.

3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se přeměna provádí s mikroorganismy obsahujícími přírodní TOL-plasmid, ve kterých je odstraněn nebo inaktivován gen, který kóduje účinnou alkoholdehydrogenázu.

4. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se přeměna provádí s mikroorganismem druhu Escherichia coli K12* transformovaným hybridním plasmidem pGSH2836 DSM 6154, a/nebo s jeho spontánními mutanty.

5. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 2, v y z n a č u - j í c í s e t í m, že se přeměna provádí s mikroorganismem druhu Escherichia coli K12* transformovaným hybridním plasmidem pL04 DSM 6153, a/nebo s jeho spontánními mutanty.
6. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 2, v y z n a č u - j í c í s e t í m, že se přeměna provádí s mikroorganismem druhu Pseudomonas putida JD7 transformovaným hybridním plasmidem pL05 DSM 6152, a/nebo s jeho spontánními mutanty.
7. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 6, v y z n a č u - j í c í s e t í m, že se přeměna provádí buď při jednorázovém, nebo kontinuálním přidávání substrátu tak, že koncentrace substrátu v kultivačním médiu nepřesáhne 20 % hmot./objem nebo objem/objem.
8. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 7, v y z n a č u - j í c í s e t í m, že se přeměna provádí při hodnotě pH od 4 do 11 a při teplotě od 15 do 50 °C.
9. Hybridní plasmid pL04 DSM 6153 uložený v Escherichia coli K12*, který se skládá z expresního vektoru pMMB67EH a genů z Pseudomonas TOL-plasmidu podle nároku 1, o délce 2,35 Kb, které vykazují místo štěpení SalI a HindIII.
10. Hybridní plasmid pL05 DSM 6152 uložený v Pseudomonas putida JD7, který se skládá z expresního vektoru pMMB67EH* a genů z Pseudomonas TOL-plasmidu podle nároku 1, o délce 2,35 Kb, které vykazují místo štěpení SalI a HindIII.
11. Mikroorganismus druhu Escherichia coli K12* DSM 6153 transformovaný hybridním plasmidem pL04, který je schopný hydroxylovat methylové skupiny v aromatických heterocyklech.
12. Mikroorganismus druhu Pseudomonas putida JD7 DSM 6152 transformovaný hybridním plasmidem pL05, který je schopný hydroxylovat methylové skupiny v aromatických heterocyklech.

Konec dokumentu
