



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: **390 268 B**

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 922/88

(51) Int.Cl.⁵ : **C12N 15/54**
C07H 21/04, C07K 15/00,
//(C07H 21/04, C12R 1:82)

(22) Anmeldetag: 8. 4.1988

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 9.1989

(45) Ausgabetag: 10. 4.1990

(73) Patentinhaber:

BIOCHEMIE GESELLSCHAFT M.B.H.
A-6250 KUNDL/TIROL, TIROL (AT).

(72) Erfinder:

PALMA NORBERT DR.
BREITENBACH, TIROL (AT).
WEBER GERHARD DR.
KUFSTEIN, TIROL (AT).
KNAUSEDER FRANZ DR.
KIRCHBICHL, TIROL (AT).
LEITNER ERNST DR.
KUNDL, TIROL (AT).

(54) DNA AUS PENICILLIUM CHRYSOGENUM SOWIE PROTEIN, FÜR WELCHES DIESE DNA CODIERT

(57) Die Erfindung betrifft Gen und Genprodukt eines in seiner Struktur und multivalenten Funktionalität neuen Schlüsselenzyms, welches die letzte Stufe der Biosynthese von Penicillin G und Penicillin V katalysiert.

AT 390 268 B

Die Erfindung betrifft Gen und Genprodukt eines in seiner Struktur und multivalenten Funktionalität neuen Schlüsselenzyms, welches die letzte Stufe der Biosynthese von Penicillin G und Penicillin V katalysiert.

Bereits 1953 beobachtete KATO (J. Antibiot. Ser. Tokyo, 6, 130-136, 1953) in precursorlosen Penicillinfermentationen eine Akkumulierung des Penicillinnukleus. Dieses β -Lactam wurde später von BATCHELOR et al. (Nature 183, 257-258, 1959) isoliert und als 6-Aminopenicillansäure (6-APA) identifiziert. 6-APA wird besonders in precursorlosen Penicillinfermentationen angehäufl. ERICKSON und BENNETT (Appl. Microbiol. 13, 738-742, 1965) betrachteten 6-APA als Nebenmetaboliten, der durch enzymatische 7-Desacylierung von Isopenicillin N in Abwesenheit von Phenyl- oder Phenoxyessigsäure als Precursor entsteht bzw. durch enzymatische Spaltung der natürlichen hydrophoben Penicilline gebildet wird. Später konnte nachgewiesen werden, daß die letzte Stufe der Penicillinbiosynthese in einem Austausch der L-Alpha-Aminoadipinsäureseitenkette von Isopenicillin N gegen Phenyl- oder Phenoxyessigsäure besteht, wobei die Seitenkettensäuren als Acyl-Coenzym A-Verbindungen in die Reaktion eintreten. Ein Enzym, das diesen Acyltransfer katalysiert, wurde von LODER (Postepy Hig. Med. Dosw. 26, 493-500, 1972) in Rohextrakten von *P. chrysogenum* nachgewiesen und als Penicillinacyltransferase (PAT) bezeichnet. Dieses Enzym wird in allen penicillinbildenden Pilzen gefunden und ist intrazellulär lokalisiert. Die Arbeiten von FAWCETT et al. (Biochem. J. 151, 741-746, 1975) bestätigen die Transacylierung von Isopenicillin N zu Penicillin G mit Enzymrohextrakten aus *P. chrysogenum* in Gegenwart von Phenylacetyl-Coenzym A.

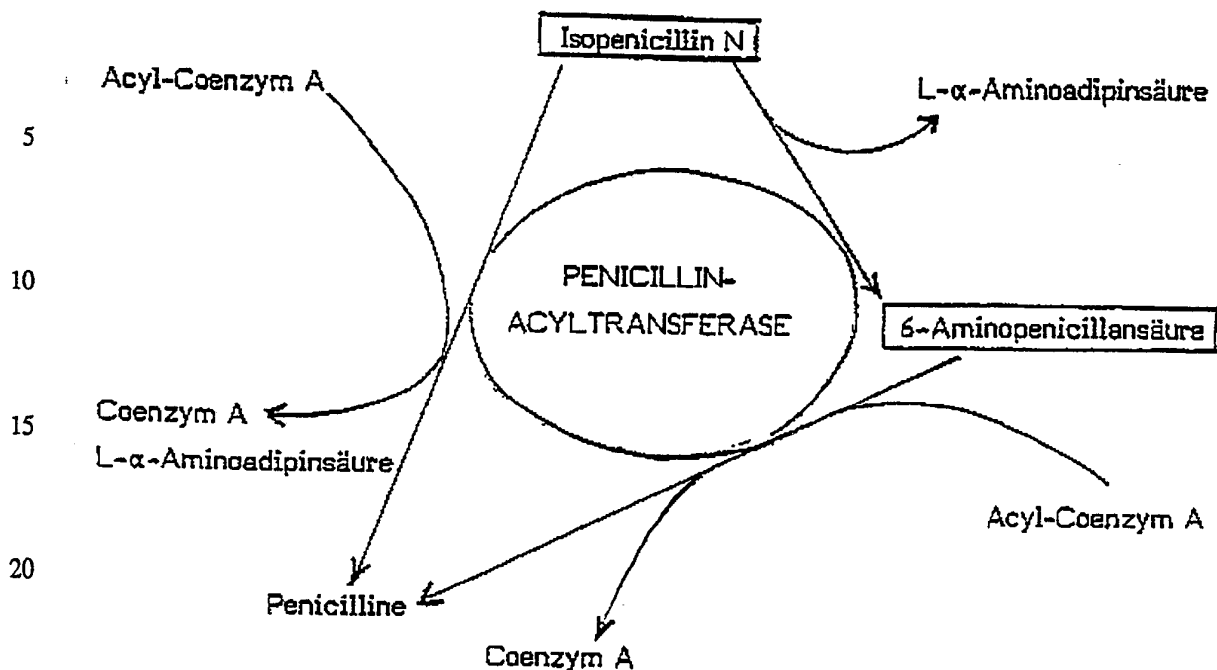
Die Bedeutung der Penicillinacyltransferase für die Biosynthese von Penicillin G oder V ist durch die Beobachtungen von BRUNNER et al. (Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 95-103, 1968), SPENCER (Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 170-175, 1968), GATENBACK und BRUNSBURG (Acta. Chem. Scand. 22, 1059-1061, 1968), SPENCER und MAUNG (Biochem. J. 118, 29-30, 1970), MEESSCHAERT et al. (J. Antibiotics 33, 722-730, 1980), KOGEKAR et al. (Indian J. of Biochemistry and Biophysics 20, 208-212, 1983), FREDERIKSEN et al. (Biotechnology Letters 6, 549-554, 1984), ABRAHAM (in Regulation of Secondary Metabolite Formation, Kleinkauf et al., eds., Proceedings of the 16th Workshop Conferences Hoechst, Gracht Castle, 12.-16. 5. 85, Vol. 16, Weinheim, p. 115-132, 1986), LUENGO et al. (J. Antibiotics 39, 1565-1573 sowie 1754-1759, 1986) sowie ALVAREZ et al. (Antimicrob. Agents and Chemotherapy 31, 1675-1682, 1987) erhärtet. Das thiolabhängige Enzym kann auch den Acylaustausch innerhalb verschiedener Penicilline katalysieren und ist in Penicillinstämmen mit hoher Syntheseleistung im vermehrten Maße gegenüber niedrig produzierenden Stämmen anzutreffen (PRUESS und JOHNSON: J. Bacteriology 94, 1502-1508, 1967).

Die vorliegende Erfindung betrifft die Isolierung, Charakterisierung und Aufklärung der Sequenz von Gen und Genprodukt dieses wichtigen Biosyntheseenzym, womit wesentliche Voraussetzungen für gentechnologische Arbeiten sowohl in Richtung Titersteigerung als auch in Richtung Hybrid- bzw. Mutasyntese bzw. Erschließung neuer enzymatischer β -Lactam-Transformationswege gegeben sind.

Die Proteinsequenzierung ist nach Laursen, Methods Enzymology 25, 344-359, (1972) bekannt. Ebenfalls ist es heute Stand der Technik, die für Proteine kodierenden Gene zu lokalisieren (Rothstein et al., Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, Vol. XLV, 99-105, 1981) und zu sequenzieren (Maxam and Gilbert, Methods Enzymology 65, 499-560, 1980). Das gezielte Ankoppeln eines Gens an einen starken, gegebenenfalls induzierbaren Promotor ist nach Pribnow, Biological Regulation and Development, Bd. 1, 231-277, Plenum Press No. 4 (Goldberger et al. 1979) bekannt.

Mehrere Enzyme der β -Lactambiosynthese wurden bereits in reiner Form isoliert und strukturmäßig charakterisiert. Ebenfalls wurden die kodierenden Genregionen mehrerer dieser Enzyme inzwischen isoliert, sequenziert, in entsprechende, für die Transformation geeignete Expressionsvektoren eingebaut und kloniert [z. B. die Isopenicillin N Synthetase aus *Cephalosporium acremonium*: Samson et al., Nature 318, 191-194 (1985); Baldwin et al., J. Antibiotics 40 (5), 652-659 (1987); EP 200425 (22. 4. und 18. 11. 85, ELI LILLY); die Isopenicillin N Synthetase aus *Penicillium chrysogenum*: Carr et al., Gene 48, 257-266 (1986); EP 225128 (25. 11. 85, ELI LILLY); die Expandase aus *Cephalosporium acremonium*: Samson et al., Biotechnology 5, 1207-1214 (1987); sowie mehrere die β -Lactambiosynthese katalysierende Enzyme aus *Streptomyces clavuligerus*: EP 233715 (31. 1., 22. 2. und 17. 5. 1986, BEECHAM)]. Die erste mit solchen Expressionsvektoren durchgeführte Transformation eines β -Lactam produzierenden Mikroorganismus ist ebenfalls bereits beschrieben (Skatrud et al., Curr. Genet. 12 (5), 337-48, 1987).

Die Penicillinacyltransferase (PAT), welche den letzten Schritt in der Penicillinbiosynthese, nämlich die Transacylierung von Isopenicillin N bzw. dessen Spaltung zu 6-Aminopenicillansäure (6-APA) sowie deren Acylierung zu Penicillin nach folgendem Reaktionsschema



25 katalysiert, wurde in penicillinproduzierenden Pilzstämmen bereits früher (siehe oben) nachgewiesen und in seiner multivalenten katalytischen Funktionalität beschrieben, konnte jedoch bisher infolge seiner extremen Instabilität nicht nachweisbar rein isoliert und strukturmäßig charakterisiert werden. Die in penicillinbildenden Stämme von *Penicillium chrysogenum* zwischen 40 und 100 Stunden Fermentationsdauer vermehrt gebildete, hoch instabile und leicht saure, thiolabhängige Penicillinacyltransferase katalysiert einerseits den Acyltransfer von Coenzym A aktivierten fermentativen Seitenketten (z. B. Acyl-Coenzym A-Verbindungen der hydrophoben Precursorsubstanzen Phenoxyessigsäure, Phenylessigsäure, Hexan- und Octansäure etc.) auf natürliche Penicilline (z. B. Isopenicillin N, Penicillin V, Penicillin G, 6-APA etc.) sowie andererseits zwischen natürlichen Penicillinen untereinander, d. h. bei dem über einen Acylenzymkomplex laufenden Acyltransfer fungieren die natürlichen Penicilline sowohl als Acyldonator als auch als Acylakzeptor, während die Coenzym A aktivierten hydrophoben Precursorverbindungen nur als Acyldonator in die enzymatische Reaktion eintreten können. Da der Acyltransfer im wässrigen Milieu stattfindet, konkurriert auch Wasser als Nukleophil mit dem Acylenzymkomplex, wobei die energiereichen Acyldonatoren einfach hydrolytisch gespalten werden. Daher findet man im Kulturbrei von Penicillinfermentationen immer auch 6-APA, den β -Lactamkern der natürlichen Penicilline.

40 Der Nachweis der Penicillinacyltransferase kann mit üblichen Analysenverfahren wie radioaktiven, mikrobiologischen oder chromatographischen Testmethoden durchgeführt werden. So wurden z. B. für die Bestimmung der 6-APA-Phenoxyacetyl-Coenzym A-Acyltransferaseaktivität der PAT, welche folgende enzymatische Reaktion katalysiert, 6-APA + Phenoxyacetyl-Coenzym A \longrightarrow Penicillin V + Coenzym A, folgende drei verschiedenen Testvarianten ausgearbeitet:

45 - Nachweis von Penicillin V über mikrobiologischen Agardiffusionstest mit spezifisch produktsensitiven Teststämmen, z. B. hat *Micrococcus luteus* ATCC 9341 gegenüber Penicillin eine um mehr als drei Zehnerpotenzen größere antibakterielle Sensitivität als gegenüber 6-APA.

- Bei Einsatz von S 35-markierter 6-APA (enzymatisch aus S 35-Penicillin G) Nachweis des extrahierbaren S 35-Penicillin V im β -Counter.

50 - Nachweis des extrahierten Penicillin V mittels HPLC

Die enzymatische Transacylierungsreaktion erfolgt in Mikrotiterplatten mit folgendem Ansatzschema:

6-APA (2,5 mg/ml im Reaktionspuffer)	20 μ l
PaCoA (ca. 15-20 mg/ml in H ₂ O bidest.)	30 μ l
Enzym bzw. Reaktionspuffer	
<u>(0,1 M Phosphatpuffer pH 7,8 inkl. 1 mM DTT)</u>	<u>150 μl</u>
	200 μ l

60 Sofort bzw. zu verschiedenen Zeiten innerhalb einer einstündigen stationären Inkubation werden vom Ansatz jeweils 20 μ l Aliquots entnommen, in derselben Mikrotiterplatte 1:5 mit 50 % wässrigem Ethanol (= Stoppen der Enzymreaktion) bzw. 1:5 mit 5 U/ml Penicillinase von DIFCO (= β -Lactam-Kontrolle) verdünnt und im

Agardiffusionstest auf mit *Micrococcus luteus* ATCC 9341 bzw. mit dem lactamsupersensitiven Stamm *Pseudomonas aeruginosa* BC 248 beimpften Testplatten (Einsaat 0,5 %, Antibiotic Medium 1 von DIFCO, 50 µl pro Nöpfchen, Bebrütung 15 Stunden bei 37 °C) gegen Penicillin V getestet.

5 Zu verschiedenen Zeiten werden vom enzymatischen Transacylierungsansatz (gleicher Ansatz wie oben mit 2 ml Gesamtvolumen) Aliquots entnommen, 1:1 mit Diisopropylether bei pH 2,0 (HCl) extrahiert, die organische Phase mit Stickstoff abgedampft, der Rückstand im gleichen Volumen Reaktionspuffer resuspendiert und über HPLC (Bedingungen wie bei der PaCoA Gehaltsbestimmung, nur als Eluens 40 % Methanol und 60 % 0,01 M TBAS in 0,025 M Phosphatpuffer pH 7,0) auf Penicillin V getestet.

10	Retentionszeiten (min):	Phenoxyessigsäure	1,10
		Penicillosäure G	1,62
		Penicillosäure V	1,92
		Penicillin G	3,00
		Penicillin V	4,92
15		3-Desacetoxycephalosporin V	2,46
		Cephalosporin V	3,24

20 Die anderen Aktivitäten des multispezifischen PAT-Enzyms können ebenfalls über HPLC bestimmt werden, wobei als Eluens für die polaren Substrate bzw. Produkte 0,01 M TBAS in 0,025 M Phosphatpuffer pH 7,0 alleine Verwendung findet.

	Retentionszeiten (min):	Isoplin	1,67
		N 6-APA	4,00
		DTT red.	2,41
25		DTT oxid.	4,60

Isopenicillin N kann aus precursorlosen Penicillinfermentationen über Adsorberharz (DIAION-HP 20) und Reverse Phase Chromatographie (Nucleosil C 18, 10 µm) gewonnen werden.

30 Je nach Enzympräparation ist dabei besonders auf die Wahl der Indikatorreaktion zu achten, mit der die eigentliche Aktivität des multispezifischen Biosyntheseenzym erfasst werden soll. So ist es z. B. nicht besonders zielführend, als Indikatorreaktion für die PAT im Rohextrakt die 6-APA-Phenoxyacetyl-CoenzymA Acyltransferase-Aktivität zu verwenden, da in dieser rohen Enzympräparation anwesende Störaktivitäten sowohl Phenoxyacetyl-CoenzymA (abgekürzt PaCoA) und Penicillin V (Plin V) rasch hydrolysieren als auch 6-APA mit dem energiereichen Seitenkettenderivat PaCoA zu Plin V acylieren, was z. B. auch bekannte proteolytische 35 Enzyme wie Chymotrypsin katalysieren. Diese interferierenden Aktivitäten unterscheiden sich jedoch deutlich von der eigentlichen thiolabhängigen PAT. Sie zeigen z. B. ein anderes chromatographisches Elutionsverhalten, Stabilitätsprofil und Inhibierungsmuster. Diese interferierenden Störaktivitäten erklären einerseits die bisher in Rohpräparationen gefundenen sehr niedrigen spezifischen PAT-Aktivitäten (um 1-10 µU/mg Protein) sowie ebenfalls den als paradox erscheinenden Befund, daß die 6-APA-PaCoA-Acyltransferaseaktivität im Rohextrakt 40 mit zunehmender Enzymverdünnung bis zu einem Aktivitätsmaximum stark ansteigt. Ein essentieller Faktor im Nachweis der PAT ist die Anwesenheit von reduzierenden Verbindungen, wie Dithiothreitol oder β-Mercaptoethanol, welche das hoch oxidationsempfindliche SH-Enzym aktivieren bzw. stabilisieren.

Die hohe Temperaturinstabilität der PAT erschwert die Enzymreinigung ebenfalls wesentlich. So verliert z. B. eine frisch hergestellte Enzympräparation trotz Anwesenheit von verschiedenen Stabilisatoren (z. B. 5 mM 45 Dithiothreitol + 5 % Sorbit + 0,1 mM Phenylmethansulfonylfluorid) nach einstündiger stationärer Inkubation bei 37 °C die gesamte thiolabhängige 6-APA-PaCoA-Acyltransferaseaktivität. Es ist daher angebracht, alle Reinigungsarbeiten in einem Arbeitskühlraum bei 4 °C unter Oxidationsschutz durchzuführen. Grob vorgereinigte Enzymlösungen können über mehrere Wochen in Anwesenheit der Stabilisatoren ohne merklichen Aktivitätsverlust eingefroren (-196 °C, -20 °C) werden, wobei jedoch mehrere Einfrier-Auftauschritte die PAT- 50 Aktivität sofort vollständig deaktivieren. Ammonsulfatpräzipitate sind ebenfalls einige Tage bzw. Wochen bei 4 °C in Anwesenheit der genannten Stabilisatormischung mehr oder minder stabil.

Das in der Erfindung angewandte Reinigungsverfahren der PAT liefert, ausgehend von jungem, penicillinpositivem *Penicillium*-Myzel, nach Myzelauflösung, Nukleinsäurefällung, Proteinfällung, hydrophober 55 Interaktions- und Affinitätschromatographie ± stabile, mindestens 50 %ige, aktive Enzympräparationen, wie sie für die enzymkinetische bzw. proteinchemische Charakterisierung notwendig sind. Die Aufarbeitung bis zur ± lagerfähigen Proteinpräzipitation kann mit üblichen Reinigungsverfahren durchgeführt werden, z. B. durch Zellaufschluß mit einem Hochdruckhomogenisator oder Glaskugelmühle bzw. die Nukleinsäurefällung mit Cetyltrimethylammoniumbromid, Streptomycinsulfat oder Protaminsulfat. Für die Proteinfällung eignet sich u. a. Ammonsulfat, wobei eine 50 %ige Sättigung ausreicht, um die gesamte nachweisbare PAT-Aktivität zu 60 präzipitieren. Von Ammonsulfatpräzipitat ausgehend, wird die thiolabhängige PAT an Phenylsepharose Cl 4 B über hydrophobe Interaktion gebunden und nach Entfernung von über 90 % des Ballastproteins, mit einer wäßrigen Stabilisatorlösung niedriger Ionenstärke eluiert, über eine 10 kD cut off Ultrafiltrationsmembran

konzentriert und vorzugsweise über Affinitätschromatographie bzw. alternativ nach einem Gelfiltrationsschritt (Ultrogel Aca 54) über Anionenaustauscher- (DEAE-Sepharose FF) bzw. Adsorptionschromatographie (Hydroxylapatit) bis zu einer mindestens 50 %igen aktiven Enzympräparation weitergereinigt, was einem Anreicherungsfaktor von ca. 1000, bezogen auf das Ammonsulfatpräzipitat, entspricht.

Als Affinitätsmatrix können übliche makroporöse Trägermaterialien wie Sepharose, Zellulose, Polymermaterialien, stabilisiertes Kieselgel, Aluminiumoxid etc. eingesetzt werden. Als Affinitätsliganden, welche über einen C₂ bis C₁₀-Spacer bzw. ohne Spacer kovalent, oder durch hydrophobe bzw. ionogene Wechselwirkung an den Träger gebunden werden, eignen sich vorzugsweise Acyl- bzw. Amino-β-Lactamverbindungen. Die Bindung dieser Liganden an den Spacer bzw. die Matrix muß derart erfolgen, daß die Bindungsstelle am Liganden für das zu reinigende Enzym zugänglich bleibt. Erfindungsgemäß zeigen besonders Affinitätsmatrizes mit terminalen Amino-Spacern wie AH-Sepharose 4 B bzw. HMD-Ultrogel Aca 34, an die über N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin (EEDQ) Liganden wie natürliche Penicilline, vorzugsweise 6-APA, Plin V oder Plin G bzw. die analogen stabilen 3-Desacetoxycephalosporinverbindungen wie 7-Amino-3-desacetoxycephalosporansäure (7-ADCA) bzw. 7-Phenoxyacetamido- oder 7-Phenylacetamido-3-desacetoxycephalosporansäure (3-Desacetoxycephalosporin V und G) gebunden werden, einen besonders starken Reinigungseffekt. Die Amino-β-Lactamaffinitätsmatrizes können dabei ohne aufwendige Schutzgruppentechnologie mit löslicher Penicillin G-Acylase von E. coli aus den entsprechenden Phenylacetamido-β-Lactammatrizes hergestellt werden.

Die benötigten Mikroorganismen werden für die Enzymproduktion in üblichen Nährmedien für die Penicillinbildung herangezogen. Als Nährmedienbestandteile eignen sich alle Substrate, die ganz allgemein zur Züchtung von Pilzen verwendet werden. Zusätzlich zu diesen Nährstoffen kann man in geeigneter Kombination jene Additive verwenden, die das Wachstum der Mikroorganismen fördern und die Penicillinacyltransferaseaktivität steigern. Additive sind z. B. Magnesiumsulfat, Natriumchlorid, Calciumcarbonat, Phosphate und ähnliche organische Salze sowie Wachstumsstoffe, Vitamine und Spurenelemente. Durch Zusatz verschiedener Induktoren, vorzugsweise Phenoxy- bzw. Phenylelessigsäure und deren Derivate oder Analoga können die erzielten Enzymtiter erheblich gesteigert werden.

Die Anzucht erfolgt vorwiegend submers unter aeroben Bedingungen bei einer Temperatur im Bereich von 15 bis 35 °C und einem pH-Wert zwischen 4 und 8. Die Zeit, in der die Kulturbrühe die maximale Enzymaktivität erreicht, hängt von der Art des verwendeten Mikroorganismus ab, und die optimale Zeit für die Kultivierung ist daher vorzugsweise für jeden einzelnen Stamm getrennt zu bestimmen. Im allgemeinen liegt die Kultivierungsdauer im Bereich von vorzugsweise 2 bis 5 Tagen. Für die Transacylierung kann man die Kulturbrühe bzw. ein daraus bereitetes aktives Sekundärpräparat einsetzen. Beispiele für solche aktiven Sekundärpräparate sind die aus der Kulturbrühe gewonnenen und gewaschenen, nativen bzw. permeabilisierten Zellen; zellfreie Extrakte, die man durch physikalische, chemische oder enzymatische Behandlung des Myzels erhält (beispielsweise die Zellhomogenate, die man durch Aufschluß oder durch Ultraschallbehandlung des Myzels erhält, und Zellsate, die man durch Behandlung mit oberflächenaktiven Substanzen oder Enzymen bildet); teilweise oder vollständig gereinigte Präparate des gewünschten Enzyms, die man durch Reinigen der zellfreien Extrakte mit Hilfe üblicher Enzymreinigungsmethoden erhält, beispielsweise durch Aussalzen, durch fraktionierte Fällung, durch Dialyse, durch Gelfiltration, durch Ionenaustausch-, Adsorptions- und durch Affinitätschromatographie; stabilisierte Penicillinacyltransferasepräparate, die man dadurch erhält, daß man das Enzym bzw. die nativen bzw. permeabilisierten Zellen entweder physikalisch oder chemisch mit wasserunlöslichen hochmolekularen Trägersubstanzen durch Adsorption, Kovalentbildung, Quervernetzen, Einschluß oder Einkapseln immobilisiert.

Die enzymkinetische bzw. physikochemische Charakterisierung der oben resultierenden Enzymkonzentrate kann mit klassischen Methoden wie Chromatographie, Elektrophorese, N-terminale Sequenzierung, Untersuchungen hinsichtlich Substratspezifität, pH- und Temperaturprofil für Aktivität und Stabilität, Aktivierungs-, Inhibierungs- und Stabilisierungsstudien etc. durchgeführt werden.

Für die Isolierung von Genen existieren zahlreiche Methoden. Einen allgemeinen Überblick dazu geben die Bücher von Watson et al. (Rekombinierte DNA - Eine Einführung, Heidelberg, 1983) und Winnacker (Gene und Klone - Eine Einführung in die Gentechnologie, Weinheim, 1984). Im Falle des pat-Gens (Gen für das Enzym Penicillinacyltransferase, PAT) scheint es am sinnvollsten, synthetische DNA-Sonden zu verwenden, da die dazu nötigen Aminosäuresequenzen vorliegen. Dazu kann man aus der Aminosäuresequenz des Polypeptides (1) der PAT eine DNA-Sequenz auf Grund des genetischen Codes ableiten und die entsprechenden Oligonukleotide chemisch synthetisieren. Fig. 5 zeigt die Anordnung der Aminosäuren (2) bis (22) des Polypeptides (1) der PAT. Da einigen Aminosäuren (2), (3), (4) oder (6) Kodons zugeordnet werden, ergibt sich eine Nukleotidsequenz, wie sie unter der Aminosäuresequenz angegeben ist. Der Abschnitt, der den Aminosäureresten (16) bis (21) entspricht, wäre z. B. gut geeignet, da hier nur 16 verschiedene Gensequenzen möglich sind. Diese (16) Oligonukleotide, welche der RNA komplementär sind, kann man als vier Gemische mit je vier Oligonukleotiden synthetisieren (Oligonukleotidgemische (1), (2), (3), (4) in Abbildung 5). Eine sichere Identifizierung des Gens ist mit diesen Oligonukleotiden vermutlich nicht möglich, da im Genom von Penicillium chrysogenum weitere DNA-Sequenzen vorkommen, die diesen DNA-Sequenzen sehr ähnlich sind. Eine Unterscheidung dieser unterschiedlichen DNA-Sequenzen kann methodisch sehr aufwendig sein. Deshalb ist

es ratsam, über ein weiteres Oligonukleotid als Suchsequenz zu verfügen.

Die Strategie, Gene mit Hilfe von DNA-Sonden zu isolieren, wird von Lathe (J. Mol. Biol. 183 [1985] 1-12) diskutiert. Sind z. B. Informationen über die Häufigkeit bestimmter Kodons oder bestimmter Dinukleotidfolgen bekannt, kann eine längere DNA-Sequenz synthetisiert werden. Für *Penicillium chrysogenum* sind solche Informationen nicht verfügbar. Um trotzdem ein längeres Oligonukleotid als Sonde zu erhalten, kann man die vorhandenen Oligonukleotide als Sequenzierprimer verwenden: Das Enzym Reverse Transcriptase kann einen DNA-Strang synthetisieren, der zu einer vorgegebenen RNA komplementär ist, aber nur dann, wenn ein geeignetes Startermolekül (= Primer) vorhanden ist. Im beschriebenen Fall können als Primer die Oligonukleotidgemische 1 bis 4 eingesetzt werden. Dadurch wird es möglich, nur die pat mRNA zu sequenzieren, obwohl zahlreiche andere mRNAs in der Präparation vorhanden sind. Die Sequenzierreaktion wird in Gegenwart von basenspezifischen Kettenabbruch-Reagentien durchgeführt (Dideoxynucleosid-Triphosphate). Dadurch entstehen zahlreiche verlängerte Oligonukleotide, deren gelelektrophoretische Analyse es erlaubt, die Basenabfolge einer DNA zu ermitteln, die zur pat mRNA komplementär ist. Der Vorteil dieser Methode ist, daß die erhaltene Sequenzinformation erlaubt, direkt neue Oligonukleotide zu synthetisieren. Zusätzlich ist es sehr bedeutsam, daß diese Sequenz mit der Sequenz, die aus der Aminosäuresequenz abgeleitet wird, übereinstimmen muß und so absichert, daß tatsächlich eine pat spezifische Sequenz vorliegt.

Die eigentliche Isolierung des Gens kann dann aus einer Genbank erfolgen. Eine Genbank ist eine Sammlung rekombinanter DNA-Vektoren, die jeweils einen kleinen Teil der DNA von *Penicillium chrysogenum* enthalten (im Falle einer Lambda EMBL3-Genbank sind dies je rekombinantem Molekül ca. 0,05 %). Mittels Plaquehybridisierung kann man Lambda-Klone isolieren, die mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisieren. Von der DNA dieser Klone kann eine physikalische Karte angefertigt werden. Eine solche Restriktionskarte gibt die Anordnung von Restriktionsendonuclease-Schnittstellen an, die als Orientierungshilfe dienen können. Durch DNA-Hybridisierungstechniken läßt sich ermitteln, mit welchem Teilbereich der DNA die DNA-Sonden hybridisieren. Die entsprechenden Teilfragmente werden in Plasmid- oder Bakteriophagen-Vektormoleküle eingebaut und mit molekulargenetischen Methoden weiter charakterisiert. Die Einklonierung eines DNA-Segmentes in den Vektor M13mp19 erlaubt dann die Bestimmung einer DNA-Sequenz, wobei die pat-spezifische DNA-Sonde als Primer verwendet werden kann. Eine weitere Sequenzierung der DNA erlaubt es, den kodierenden Anteil des Gens und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz der PAT zu ermitteln. Die bereits bestimmten Aminosäure-Teilsequenzen können die dazu erforderliche Information liefern.

Das pat-Gen aus *Penicillium chrysogenum* kann aufgrund der DNA-Sequenz-Information in Expressionsvektoren eingebaut werden, die eine Expression der PAT in gut bekannten Produktionsorganismen erlauben (Reznikoff und Gold, Maximizing Gene Expression, Boston, 1986). Die DNA mit dem pat-Gen kann in Vektoren eingebaut werden, mit denen eine Transformation von *Penicillium chrysogenum* oder anderen β -Lactam produzierenden Mikroorganismen möglich ist (z. B. Kolar et al., Gene 62 (1988) 127-134). Da Transformanten häufig die eingebrachte DNA in mehreren Kopien enthalten (z. B. Kolar et al.) ist auch eine stärkere Transkription des Gens möglich, die in einer gesteigerten Penicillinausbeute resultiert. Weiterhin ist die Manipulation der DNA denkbar (z. B. der Austausch von Promotorabschnitten), die ebenfalls die Transkription verbessern. Der Austausch spezieller Aminosäurereste durch ortsspezifische Mutagenese (z. B. Winnacker) würde es ermöglichen, spezielle Mutanten zu isolieren, die die Stabilität des Enzyms oder seine Aktivität oder Spezifität verändern.

Die DNA der vorliegenden Erfindung wurde aus *Penicillium chrysogenum* isoliert. Die Vorgangsweise ist in den Beispielen 10 bis 13 beschrieben und durch die Fig. 4, 5 und 6 illustriert. Ausgehend von der Aminosäuresequenz des Polypeptides (1) der PAT (Fig. 5) wurden vier Oligonukleotidgemische synthetisiert (Fig 5: Oligonukleotidgemische (1) bis (4), Fig. 6 C), die als Sequenzierprimer verwendet wurden (Beispiel 11). Die ersten 29 Basen der so ermittelten Sequenz (Fig. 6 D) stimmen mit der postulierten pat mRNA Sequenz überein (Fig. 6 B). Aufgrund dieser Information wurde ein 30mer synthetisiert (Fig. 6 E), das als radioaktive Sonde zur Isolierung eines Lambda-Klons aus der *Penicillium chrysogenum* Genbank (Beispiele 12 und 13) verwendet wurde. Nach einer Subklonierung in M13-Vektoren wurde die DNA sequenziert (Fig. 6 F). Die ersten 75 Basen dieser Sequenz stimmen mit den Basen 35 bis 109 der zur mRNA komplementären Sequenz (Fig. 6 D) überein. Die Zusammenhänge zwischen diesen einzelnen Sequenzen demonstrieren, daß tatsächlich das pat-Gen isoliert wurde.

Die PAT hat ein Molekulargewicht von ca. 38.000 D. Aus einem mittleren Aminosäure-Molekulargewicht von 110 D läßt sich für den kodierenden Anteil des Gens eine Größe von 1100 bp schätzen. Da Gene von filamentösen Pilzen meist nur wenige und wenn, dann kleine Introns enthalten (Ballance, Yeast 2 [1986] 229), kann man davon ausgehen, daß das vollständige Gen auf dem beschriebenen DNA-Molekül liegt und daß Kontrollregionen ebenfalls vollständig vorhanden sind.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung, ohne sie jedoch zu beschränken. In den Beispielen stehen die Abkürzungen ml, l, mg, g, Upm, TS, GV %, U für Milliliter, Liter, Milligramm, Gramm, Umdrehungen pro Minute, Trockensubstanz, Gewicht/Volumenprozent und Internationale Enzymeinheit (1 Internationale Enzymeinheit = 1 μ Mol Substrat/min). Gewichtsteile verhalten sich zu Volumsteilen wie g zu ml, die Temperatur wird in Celsiusgraden angegeben. Die Charakterisierung der Produkte wurde unter Verwendung der folgenden Techniken bestimmt: Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC), Hochdruck-

Flüssigchromatographie (HPLC), Ultraviolett-Spektrophotometrie (UV), Infrarotspektrometrie (IR) und magnetische Kernresonanz (NMR). Die den in den Beispielen angeführten Stammmamen beigefügten Nummern entsprechen den eingetragenen Stammbezeichnungen jener Kultursammlungen, bei denen die Stämme als solche deponiert sind, z. B. bei ATCC (= American Type Culture Collection, Rockville, Maryland 20852, USA).

5

Herstellung und Gehaltsbestimmung von Phenoxyacetyl-coenzym A (PaCoA)

Prinzip: Coenzym A + Phenoxyessigsäurechlorid \longrightarrow PaCoA

901 mg CoA werden unter Eiskühlung in 15 ml bidestilliertem Wasser gelöst und mit Natronlauge auf pH 7,0 (Verbrauch 2,56 ml 1 N NaOH und 1,60 ml 0,5 N NaOH) gestellt. Anschließend werden in Portionen insgesamt 235 mg Phenoxyessigsäurechlorid unter kräftigem Rühren zugesetzt und der pH-Wert auf 7,0 gehalten (Verbrauch 1,8 ml 1 N NaOH). Nach einstündigem Rühren unter Eiskühlung wird 3 x mit je 40 ml Diethylether bei pH 2,0 (6 bzw. 1 N HCl) extrahiert, dann die wäßrige Phase mit NaOH neutralisiert, im Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur vom restlichen Ether befreit, kurz mit Stickstoff begast, anschließend 1:50 mit bidest. Wasser verdünnt, in Portionen zu je 500 µl ampulliert und in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Gehaltsbestimmung erfolgt über HPLC, wobei als Standard Phenylacetyl Coenzym A (PeCoA) verwendet wird.

10

15

HPLC-System: HP 1090 Liquid Chromatogram (Hewlett Packard)
 Säule: Hypersil ODS 5 µm, C 18, 150 x 200 mm
 Integrator: Modell 3392 (Hewlett Packard) / ATT 3
 Fluß: 0,5 ml/min
 Detektion: 230 nm
 Eluens: 35 % Methanol
 65 % 0,01 M Tetrabutylammoniumsulfat (TBAS)
 in 0,025 M Phosphatpuffer pH 7,0

20

25

Auswertung:

Probe	Retentionszeit (min)	Fläche (Flächencounts ⁺)	Höhe (Höhencounts ⁺⁺)
400 µg/ml PeCoA	9,41	8466900	210692
200 - " -	9,68	4105400	107689
100 - " -	9,88	2092100	54990

30

⁺) Summenintegration (Höhencounts x Zeit)

⁺⁺) 1 Höhencount $\hat{=}$ 1,25 x 10⁻⁴ mV

35

PaCoA Stlsg. 1:200	10,53	1966600	47737
PaCoAStlsg. 1:50	10,68	7850700	172983
PaCoAStlsg. 1:40	10,47	1038900	222475

40

Flächenintegration \longrightarrow 19,2 mg PaCoA/ml
 Höhenauswertung \longrightarrow 16,8 mg PaCoA/ml
 18 mg PaCoA/ml

Beispiel 1: Heranführung der enzymatisch aktiven Biomasse:

45

Der Inhalt einer Ampulle mit lyophilisierten Sporen von *Penicillium chrysogenum* P2/ATCC 48271 wird in 8 ml Medium A (Zusammensetzung pro Liter: 15 g Lactose, 0,11 g Stickstoff als Maisquellwasser, 5 g Witte Pepton, 4 g NaCl, 0,5 g MgSO₄·7 H₂O, 0,6 g KH₂PO₄, 5 mg FeCl₃·6 H₂O, 2 mg CuSO₄·5 H₂O, alles ad 1000 ml mit H₂O destilliert, pH 4,85, Sterilisation: 20 min bei 120 °) suspendiert. Mit 2 ml dieser Sporensuspension wird ein 2 L Erlenmeyerkolben mit 225 ml Gerste beimpft. Die Gerste wird vor dem Abfüllen mit Wasser klar gewaschen, 20 bis 30 Minuten in Medium A gequollen, über ein Sieb filtriert und ca. eine Stunde auf Filterpapier getrocknet, anschließend in 2 L Erlenmeyerkolben zu je 225 ml abgefüllt, dreimal bei 100 °, jeweils ca. eine Stunde, mit eintägigen Intervallen sterilisiert und vor dem Animpfen noch 2 Tage bei 40-45 ° getrocknet. Nach der Sporeneinsaat werden die Erlenmeyerkolben kurz geschüttelt, dann ungefähr 8 Tage bei 24 ± 1 ° und 60 ± 10 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

50

55

Nach dieser stationären Bebrütungszeit werden die Pilzsporen mit 250 ml 0,9 % NaCl + 0,1% Polyethoxysorbitanoleat auf einem vertikalen Schüttler für 3-5 Minuten bei 140 Upm resuspendiert. Nach erneutem Zusatz von 250 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung (Polyethoxysorbitanoleat) wird die Sporensuspension in eine 1 L Impfkanne steril dekantiert. Mit je 8 ml von diesem bei 4 ° ca. einen Monat lagerfähigem Impfgut werden jeweils 50 Stück 2 L Erlenmeyerkolben zu je 200 ml Medium B (Zusammensetzung pro Liter: 9 g Kaliumphenoxyacetat, 150 g Lactose Monohydrat, 2,25 g Stickstoff als Pharmamedia, 10,5 g (NH₄)₂SO₄, 4 g

60

Na₂SO₄, 0,5 g KH₂PO₄, 10 ml tierisches Öl (Lardoil), 25 g CaCO₃, alles ad 1000 ml mit H₂O destilliert; pH 6,5; Sterilisation: 20 min bei 120 °) beimpft und drei Tage bei 25 ± 1 ° bei 260 Upm geschüttelt. Nach dieser Schüttelinkubation werden 1820 g an enzymatisch aktiver Biomasse geerntet. Der Penicillintiter beträgt 1,9 g Penicillin V pro L Brei.

5

Beispiel 2: Herstellung einer enzymatisch aktiven Enzymrohpräparation:

1786 g feuchtes Mycel (= 220 g TS), erhalten gemäß Beispiel 1, werden in 3,5 L 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5 inkl. 5 mM Dithiothreitol (DTT), 0,196 Triton X 100 sowie 0,1 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) resuspendiert und unter Kühlung bei 2/3 ° kontinuierlich in der Glaskugelmühle (600 ml Stahlmahlbehälter mit 510 ml 500-750 µm Glasperlen, Drehzahl 2000 Upm, 0,1 mm Reibspaltbreite, Durchfluß 30 L/Stunde, Vorlauf 2 bis 3 °, Rücklauf 5 °, Solekühlung mit Vorlauf -20/8° und Rücklauf -5/-1 °) homogenisiert. Das Homogenat wird anschließend 30 Minuten bei 15.000 Upm und 4 ° zentrifugiert, der Überstand mit 0,5 GV % Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) bei 0 ° versetzt und 30 Minuten gerührt. Die präzipitierte Nukleinsäure wird durch Zentrifugation (10 Minuten, 15.000 Upm, 4 °) abgetrennt, der Überstand durch Zugabe von festem Ammonsulfat auf 50 GV % Sättigung gebracht und zur Vervollständigung der Proteinfällung über Nacht bei 4 ° gehalten. Der Niederschlag wird anschließend zentrifugiert, mit kalter gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen und nach Zusatz von 5 GV % Sorbit, 5 mM DTT, 2 mM EDTA und 0,1 mM PMSF bis zum nächsten Chromatographieschritt bei 4 ° gelagert. Der Aufschluß bzw. die beiden Fällungsstufen werden mit Protein-(Bradford) bzw. Aktivitätsbestimmung (mikrobiologische Erfassung der 6-APA-PaCoA-Acyltransferaseaktivität mit dem lactamsensitiven Pseudomonas aeruginosa Stamm BC 248) verfolgt. Die gefundenen Werte sind in der Tabelle 1 angeführt.

10

15

20

(Es folgt Tabelle 1)

25

30

35

40

45

50

55

60

Tabelle 1:

Aufschluß und Fällung der thiolabhängigen Penicillin-Acyltransferase aus *Penicillium chrysogenum*
P2 / ATCC 48271

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Reinigung	Aufschlußdauer (min)	Gesamtvolumen (ml)	Protein		Mikrobiologische 6-APA-PaCoA-Acyltransferase-Aktivität (mm HH ø gegen BC 248)								
			(mg ges.)	(mg/ml)	1) OST unverdünnt			OST 1 : 10			OST 1 : 50		
					sofort	30'	30'+	sofort	30'	30'+	sofort	30'	30'+
					Penase			Penase			Penase		
Zellaufschluß mit Dyno mill Type KDL (1786 g Bfm \cong 220 g TS in 3,5 l)	0	4900	676	0,138	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5 + + 5 mM DTT + + 0,1 % Triton X 100 +0,1 mM PMSF	30		20776	4,24	SPUR	18,0	0	0	24,4	0	0	SPUR	0
600 ml Stahlmantelbehälter mit 510 ml 500 - 750 μ m Glasperlen	60		25431	5,19	SPUR	17,19	0	SP	27,0	0	0	15,7	0
im kont. Betrieb; Drehzahl: 2000 Upm (\cong 6,7 m/sek.) Reibspaltbreite; 0,1 mm	90		29204	5,96	15,2	22,0	0	13,8	29,9	0	0	16,5	0
Flußrate - Mahlgut = 30 l/h Temp. Mahlgut - VL 2/3 °C RL 5 °C													
Temp. Kühlung - VL -20/-8°C RL -5/-1 °C	120		29302	5,98	SPUR	17,1	0	0	24,8	0	0	0	0
OST nach Nucleinsäurefällung mit 0,5 % CTAB		4650	12927	2,78	14,4	26,0	0	0	25,8	0	0	0	0
Proteinpräzipitat mit 50 GV % Ammonsulfat (AS # 16/12)		480 (\cong 544 g)	10965	22,8	27,4 ²⁾	28,8	0	18,4	28,2	0	16,1	27,1	0

1) Die unverdünnten Aufschlußproben wurden von der Aktivitätstestung über PD 10 Säulen pufferausgetauscht (Abtrennung des Plin V-Restgehaltes, 2,5 ml OST-Probe mit 3,5 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5 + 1 mM DTT)

2) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Präzipitat vor Aktivitätstestung mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5 + mM DTT 1:5 verdünnt Penase \longrightarrow Penicillinase (DIFCO)

60

Beispiel 3: Mikrobiologischer Nachweis der Transacylierungs- bzw. Plin V-Spaltungsaktivität in der Enzympräparation AS-Präzipitat mit bzw. ohne Zusatz von Inhibitoren:

Die, wie in Beispiel 2 beschrieben, hergestellte Enzymrohpräzipitation wird im mikrobiologischen Agardiffusionstest hinsichtlich Transacylierung von 6-APA bzw. Isoplin N mit PaCoA und Spaltung von Kalium Plin V mit bzw. ohne Inhibitorzusatz folgendermaßen getestet:

- Testkeime: Micrococcus luteus ATCC 9341/BC 85, 0,5 % Einsaat
- Testmedium: Antibiotic Medium 1 (Difco), 110 ml
- Testplatte: Nunc 243 x 243 x 18 mm
- Probe: 50 µl pro Näpfchen (6 mm ø)
- Inkubation: 37°, 15 Stunden
- Enzym: AS-Präzipitat (hergestellt wie in Beispiel 2 beschrieben):
1 ml zentrifugiert (20.000 Upm 10 min)
Überstand verworfen, Pellet in 20 ml RP + Z resuspendiert
- RP + Z 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5 + 1 mM DTT + 10 mM MgCl₂

A Transacylierung

Ansatz in Mikrotiterplatten

- Substrat 6-APA bzw. Iso Plin N (2,5 mg/ml) 10 µl
- PACoA (ca. 15 mg/ml) 15 µl
- Enzym bzw. RP + Z mit bzw. ohne Inhibitor 75 µl

- Inhibitor: a) ohne Inhibitor (= Kontrolle)
- b) 2 mM Jodacetamid
- d) 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid

Sofort bzw. nach 7, 30 und 60 min Inkubationszeit werden 20 µl Aliquots der Ansätze entnommen, 1:5 mit 50 % Ethanol (Stoppen der Enzymreaktion) verdünnt und im Agardiffusionstest auf Penicillingehalt getestet.

Transacylierung von Iso-Plin N(≠ 28 und 36) mit PaCoA(HH ø mm)

	a)				b)				c)			
	s	7'	30'	60'	s	7'	30'	60'	s	7'	30'	60'
#28	22,5	25,5	26,0	23,0	21,1	20,8	18,3	14,3	22,7	24,7	25,7	20,7
#36	27,0	28,3	30,8	28,7	25,2	25,0	23,6	22,1	26,3	27,2	27,7	26,7
	Iso N Std. µg/ml				Plin V Std. µg/ml							
	50	25	12,5		2,0	1,5	1,0	0,5	0,25			
#28	20	16,5	12,4		25,3	24,0	21,7	17,8	9,7			
#36	24,5	22,1	18,4									

Transacylierung von 6-APA mit PaCoA in Abhängigkeit von der Enzymverdünnung

1 : 5				1 : 10				1 : 50				1 : 100			
S	7'	30'	60'	S	7'	30'	60'	S	7'	30'	60'	S	7'	30'	60'
18,3	24,4	24,3	15,7	18,6	25,4	28,5	25,4	16,0	24,2	30,7	30,7	14,5	21,3	26,7	27,0
1 : 500				1 : 1000				Plin V Std. µg/ml							
S	7'	30'	60'	S	7'	30'	60'	2,0	1,5	1,0	0,5	0,25			
14,8	17,8	20,6	22,8	0	9,6	10,5	11,1	25,3	24,0	21,7	17,8	9,7			

B Penicillin V-Spaltung

Ansatz in Mikrotiterplatten:

5	K-Plin V 100 µg/ml	10 µl
	0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5	15 µl
	Enzym bzw. RP + Z (+ Inhibitor)	75 µl
	a) ohne Inhibitor (= Kontrolle)	
	b) + 2 mM Jodacetamid	
10	c) + 2 mM Ethylmaleinimid	
	d) + 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid	
	e) + RP + Z	

Spaltung von K-Plin V (HH ø mm) in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren

15

a)				b)				c)				d)			
S	7'	30'	60'	S	7'	30'	60'	S	7'	30'	60'	S	7'	30'	60'
25,7	21,8	0	0	25,7	23,1	0	0	25,0	23,0	0	0	25,3	0	0	0

20

e)				K-Plin V Std. µg/ml					Als Vergleich			
S	7'	30'	60'	2,0	1,5	1,0	0,5	0,25	Transacylierung			
26,9	25,8	26,2	26,4	27,4	24,7	23,4	18,4	11,9	6-APA + PaCoA → Plin V			
									S	7'	30'	60'
									17,0	23,2	26,9	25,9

25

Beispiel 4: Aktivierungs-, Inhibierungs-, Stabilisierungs- und pH-Profil der PAT:

Das, wie in Beispiel 2 beschrieben, hergestellte PAT-Ammonsulfatpräzipitat wird 1:10 mit 0,1 M Reaktionspuffer, in Anwesenheit verschiedener Aktivatoren bzw. Inhibitoren oder Stabilisatoren verdünnt und sofort bzw. nach eintägiger Inkubation bei 4 bzw. -20 ° im mikrobiologischen Testmodell auf 6-APA-PaCoA-Acyltransferaseaktivität getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

30

(Es folgt Tabelle 2)

35

40

45

50

55

60

Tabelle 2

Stabilität bzw. Aktivität der thiolabhängigen Penicillinacyltransferase aus *Penicillium chrysogenum* P2/ATCC 48271
in Abhängigkeit von der Temperatur, Zeit, pH-Wert und Stabilisatorzusätzen

5	Testung	sofort	24 h bei +4 °C			24 h bei -20 °C			
10	Stabilisierungskonditionen	Mikrobiologische 6-APA-PaCoA ATCC 9341/BC 85	sofort	30 min	30 min + Peni- cillase	sofort	30 min	30 min + Peni- cillase	
15	Aktivierung	sofort	30 min	30 min + Peni- cillase	sofort	30 min	30 min + Peni- cillase	sofort	
20	ohne Zusatz + 1 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT) + 10 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT) + 10 mM Mercaptoäthanol (Beta-ME) + 10 mM MgCl ₂ + 2 mM EDTA + 1 mM DTT + 10 mM MgCl ₂ + 10 mM MgCl ₂ + 2 mM EDTA + 5 % Sorbit, 1 mM DTT, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF + 5 % Sorbit, 1 mM DTT + 1 mM PMSD	11 23,5 22,7 15,4 9,8 0 26,9 16,3 26,0 25,5	15,5 37,1 39,0 27,8 17,1 16,0 36,7 25,4 38,6 36,6	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	- 15 16 SPUR 18,5 - - 12,2 SPUR 11,3 16,8	- 38 33 28,3 15 - 37 23 33 36	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	
25									
30	pH-Profil								
35	0,1 M HEPES 0,1 M NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 0,1 M NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 0,1 M NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 0,1 M TRIS/HCl 0,1 M TRIS/HCl	26,6 0 22,1 33,8 14,3 0	37,3 17,3 32,7 35,0 19,6 SPUR	0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0	0 - 0 0 0 -	12,5 - 0 17 0 -	33,5 - 29,3 36,5 16 -	0 0 0 0 0 0

Tabelle 2 (Fortsetzung)

		sofort	30 min	30 min + Peni- cillase	sofort	30 min	30 min + Peni- cillase	sofort	30 min	30 min + Peni- cillase
5										
10	Inhibierung									
	ohne Zusatz	22,6	33,6	0	SPUR	SPUR	0	11,6	34	0
	+ 2 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	22,1	32,3	0	0	SPUR	0	13,8	27	0
	+ 2 mM Diisopropylfluorophosphat (DIPFP)	22,6	34,5	0	0	SPUR	0	10	35	0
	+ 2 mM 2,2' Bipyridyl	0	0	0	-	-	0	-	-	0
	+ 2 mM Hydroxychinolin	n.	34,5	0	0	12	0	13,5	38	0
15	+ 2 mM O-Phenanthrolin	18,9	29,9	0	SPUR	SPUR	0	11	33	0
	+ 2 mM N-Äthylmaleinimid (NEM)	0	0	0	-	-	0	-	-	0
	+ 2 mM 4-Hydroxymercuri-Na-benzoat	19,4	32,3	0	0	11,6	0	12,2	39	0
20	Stabilisierung									
	ohne Zucker	21,5	33,4	0	0	SPUR	0	15,2	38	0
	+ 5 % Sorbit	23,3	34,1	0	0	12,2	0	16,3	38	0
	+ 20 % Sorbit	21,9	34,2	0	0	12	0	15,2	37	0
25	+ 1 mM PMSF	22,0	33,7	0	0	SPUR	0	15	40	0
	+ 1 % BSA	SPUR	20,0	0	0	0	0	0	18	0
	+ 10 % Glycerin	22,0	33,1	0	0	11,5	0	15,2	38	0
	+ 5 % Mannit	24,0	36,2	0	0	SPUR	0	16,8	38	0
30	+ 100 µg 6-APA/ml	26,8	35,4	0	15	24	0	17,2	38	0
35		µg/ml Plin V Standard			mm HH ø gegen BC 85					
		2			27,4					
		1,5			24,7					
		1,0			23,4					
		0,5			18,4					
		0,25			11,9					

Enzym: PAT-Ammonsulfatpräzipitat
Lagerung und Testung → 1 + 10 mit 0,1 M HEPES Reaktionspuffer PH 7,5 unter verschiedenen Stabilisierungskonditionen

Beispiel 5: Temperaturstabilität der PAT:

5 Das, wie in Beispiel 2 beschrieben, hergestellte PAT-Ammonsulfatpräzipitat wird 1:20 mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5 inkl. 1 bzw. 10 mM DTT verdünnt, scharf zentrifugiert, der Überstand bei -196, -20, +4, +20 und +37 ° stationär inkubiert und sofort bzw. nach 1, 4, 26 und 120 Stunden im mikrobiologischen Testmodell auf 6-APA-PaCoA-Acyltransferaseaktivität getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 angeführt.

(Es folgt Tabelle 3)

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Tabelle 3
Temperaturstabilität der Phenoxacetyl-CoA-6-APA-Acyltransferaseaktivität aus *Penicillium chrysogenum* (Thiolenzym)

DTT (mM)	Inkubationsdauer	-196 °C		-20 °C		+4 °C		RT		37 °C				
		sofort	30'	30'	30'+	sofort	30'	30'	30'+	sofort	30'	30'+		
Mikrobiologische 6-APA-PaCoA Transacylierungsaktivität (mm HH ø gegen <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9241/BC 85) Penicillinase														
1	sofort	14	40	0	0	14	40	0	14	40	0	14	40	0
	1 h	14	36	0	0	Sp	38	0	Sp	37	0	0	Sp	0
	4 h	12	37	0	0	17	36	0	12	16	0	0	0	0
	26 h	17	33	0	0	17	35	0	10	14	0	0	0	0
	120 h	26	32	0	0	23	34	0	0	0	0	0	0	0
10	sofort	24	40	0	0	24	40	0	24	40	0	24	40	0
	1 h	15	35	0	0	11	35	0	14	34	0	0	17	0
	4 h	-	-	-	-	12	34	0	11	28	0	0	0	0
	26 h	18	32	0	0	17	34	0	11	Sp	0	0	0	0
	120 h	-	-	-	-	28	32	0	0	0	0	0	0	0

Enzym: AS-Präzipitat / 1:20 mit RP verdünnt, zentrifugiert, OST → Test
Lagerung: 0,1 M PP pH 7,5 inkl. 1 bzw. 10 nM DTT

Beispiel 6: Reinigung der Pat über hydrophobe Interaktionschromatographie auf Phenylsepharose Cl-4B (HIC-Lauf) und Affinitätschromatographie auf 6-APA-AH-Sepharose 4 B (Affinitätslauf):

240 g der, wie in Beispiel 2 beschrieben, gewonnenen Ammonsulfatpräzipitation werden in 2000 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 inklusive 1 M (NH₄)₂SO₄ sowie 1 mM DTT gelöst und im Arbeitskühlraum bei +4° auf eine BP 113-Säule mit 2000 ml äquilibrierter Phenylsepharose Cl-4B aufgegeben. Anschließend wird die Säule mit einem Fluß von 50 ml/min mit 3 Bettvolumen an 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 inklusive 1 M (NH₄)₂SO₄ und 1 mM DTT gewaschen, dann mit weiteren 2 Bettvolumen 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 inklusive 1 mM DTT das Ballastprotein entfernt, sodann mit 3 Bettvolumen entionisiertem Wasser (E-H₂O) inklusive 1 mM DTT das PAT-Enzym eluiert, die aktive Fraktion im PELLICON-Kassettsystem über eine Polysulfanultrafiltrationsmembran mit einem cutoff von 10 kD auf ein Zehntel Volumen konzentriert, mit 1 GV % Sorbit, 5 mM DTT, 2 mM EDTA und 0,1 mM PMSF stabilisiert und bei -20 ° bis zum nächsten Chromatographieschritt eingefroren.

Die mikrobiologisch erfaßte 6-APA-PaCoA-Acyltransferaseaktivität sowie der Gesamtproteingehalt der einzelnen, je ein Bettvolumen umfassenden Fraktionen sind anschließend wiedergegeben:

15

Probe	Mikrobiologische PAT-Aktivität (mm HH ø gegen Pseudom.aerug.BC 248) (mg)			Gesamtprotein/Bradford
	sofort	30 min	30 min + Penicillinase	
Einsatz	19	24	0	5483
PL 150/1	17	18	0	230
PL 150/2	16	15	0	102
PL 150/3	14	15	0	98
PL 150/4	0	0	0	2750
PL 150/5	0	0	0	390
PL 150/6	Spur	15	0	52
PL 150/7	18	31	0	389
PL 150/8	0	0	0	14

Das aktive Retentat der HIC-Fraktion wird am nächsten Tag unter schonenden Bedingungen aufgetaut und auf eine K 26/40 Pharmacia-Säule mit 50 ml Affinitätsmatrix 6-APA-AH-Sepharose 4 B, welche durch Kuppeln von Penicillin G an AH-Sepharose 4 B (Pharmacia) mit N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin (EEDQ) nach dem LKB-Protokoll "Practical guide for use in affinity chromatography and related techniques", Reactifs IBF-Societe Chimique Pointet-Girard, France 1983, S.133, und durch anschließende Abspaltung der Phenylessigsäure mit löslicher Penicillin-G Amidase von E. coli hergestellt wurde, aufgegeben. Die Säule wird darauf mit einem Fluß von 3 ml/min mit folgenden Medien bei 4 ° eluiert:

- AL 278/1: 12 Bettvolumen 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 + 1 mM DTT + 0,1 M NaCl
- AL 278/2: 3 Bettvolumen 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 + 1 mM DTT + 0,1 mM NaCl + 1 mM 6-APA
- AL 278/3: 6 Bettvolumen 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 + 1 mM DTT + 0,1 M NaCl + 1 mM 6-APA

Die mit dem spezifischen Eluenten 6-APA in der Fraktion 278/2 eluierte PAT-Aktivität wird im MINITAN-Kassettsystem über eine Polysulfon-UF-Membran mit einem cutoff von 10 kD auf ein Zehntel Volumen aufkonzentriert, erneut mit der Stabilitätsmischung 1 GV % Sorbit, 5 mM DTT, 2 mM EDTA und 0,1 mM PMSF versetzt und in Portionen tiefgefroren.

Die über HPLC bestimmte Substratspezifität dieser mindestens zu 50 % reinen Enzympräparation ist in Tabelle 4 festgehalten.

55

60

Tabelle 4

Substratspezifität der gereinigten thiolabhängigen Penicillinacyltransferase aus *Penicillium chrysogenum* P 2 / ATCC 48271 (aktive Fraktion Al 278/2 nach Affinitätschromatographie)

	Substrat		Produkt	mittels HPLC bestimmte spezifische Enzymaktivität (mU/mg Protein) Al 278/2
	Acylakzeptor	Acylonor		
10	Iso Penicillin N	PaCoA	Penicillin V	146
	Iso Penicillin N	PaCoA	Penicillin G	80
	6-APA	PaCoA	Penicillin V	393
	6-APA	PaCoA	Penicillin G	329
15	7-ADAC	PaCoA	3-Desacetoxy- cephalosporin V	49
	7-ACA	PaCoA	Cephalosporin V	0
	Cephalosporin C	PaCoA	Cephalosporin V	0
	Penicillin G	PaCoA	Penicillin V	25
20	Penicillin V	PaCoA	Penicillin G	99
	H ₂ O	Iso Penicillin N	6-APA	150
	H ₂ O	Penicillin V	6-APA	75
	H ₂ O	Penicillin G	6-APA	17
	H ₂ O	7-Glutaryl-APA	6-APA	106

PaCoA = Phenoxyacetyl-Coenzym A

PeCoA = Phenylacetyl-Coenzym A

Beispiel 7: Chromatofokussierung der affinitätschromatographisch hergestellten PAT-Enzympräparation auf Mono P/Pharmacia (Chromatofocussing AL 310):

Eine 1 ml Portion der, wie in Beispiel 6 beschrieben, über Affinitätschromatographie gereinigten und konzentrierten PAT-Enzympräparation wird unter schonenden Bedingungen aufgetaut, über eine äquilibrierte PD 10 Sephadex G 25 Fertigsäule gegen 25 mM bis Tris/HCl Puffer pH 6,3 pufferausgetauscht, dann auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte 4 ml FPLC Mono P-Fertigsäule aufgegeben, anschließend sofort mit einem Fluß von 60 ml/Stunde mit 100 ml eines 1:10 verdünnten und auf pH 4,0 gestellten Polypuffers 74 eluiert, peakweise fraktioniert und die Fraktionen original bzw. über Centricon 10 zehnfach konzentriert über Reverse Phase Chromatographie, SDS-Gradientenpolyacrylamidgelelektrophorese isoelektrische Fokussierung auf Immobiline Basis und Gelfiltration analysiert.

Abbildung 1 zeigt das Elutionsprofil des PAT-Enzyms auf der Mono P. Das multifunktionelle Enzym wird in mindestens drei isoelektrische Formen (PAT 310/3, PAT 310/4 und PAT/310/5) aufgespalten. Diese verschiedenen geladenen Enzymvarianten können entweder echte Isoenzyme oder verschiedene Redoxformen desselben Enzyms darstellen.

Wie der Abbildung 2 zu entnehmen ist, zerfällt die thiolabhängige PAT aus *Penicillium chrysogenum* unter den denaturierenden Bedingungen der Reverse Phase Chromatographie (Säule = Biorad Hi Pore RP 304, 250 x 4,6 mm, Cat.-Nr. 1250550; HPLC-Parameter: 0,5 ml/min, 45 bar, 280 nm, 40 °C, 25 µl Injektionsvolumen; linearer Gradient zwischen Eluens A: 35 %iges wäßriges Acetonitril mit 0,01 % Trifluoressigsäure und Eluens B: 80 %iges wäßriges Acetonitril inkl. 0,01 % Trifluoressigsäure, 30 min) in ein Polypeptid (1) und je nach Iso- bzw. Redoxvariante in ein bzw. zwei unterschiedlich hydrophobe Polypeptidvarianten (2a) und (2b).

In der SDS-Gradienten Polyacrylamidgelelektrophorese (siehe Abb. 3a, Bedingungen nach Laemmli, Nature 227, p. 680-685, 1970; aber Gradientengel mit 8-20 % T) zerfällt das PAT-Enzym in zwei verschieden große Polypeptide mit einem MG um 30 und 8 kD. Durch RPC und anschließende SDS-Gradienten-PAGE kann gezeigt werden, daß das in der RPC zuerst eluierende Polypeptid (1) mit der ca. 30 kD Komponente und die beiden stärker retentierten, hydrophoben Polypeptide (2a) und (2b) mit der 8 kD Komponente identisch sind. Weiters kann durch solche multidimensionalen Analysen gezeigt werden, daß die kleinen Polypeptide (2a) und (2b) auf der SDS-Gradienten PAGE dieselbe Wanderungstrecke besitzen, während das große ca. 30 kD Polypeptid (1) der basischen Iso- bzw. Redoxvariante etwas schneller wandert als das entsprechende Polypeptid (1) der mehr sauren Form.

Bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) auf Ampholinebasis (siehe Abb. 3b, methodische Durchführung nach LKB Application Note 1804) zeigt der aktive Affinitätspool drei eng beisammenliegende Banden mit einem isoelektrischen Punkt um 5,1.

AS-Teilsequenz 4 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid (1)):

1 5 10
 Glu-Leu-Asp-Pro-Leu-Pro-Asp-Ser-Trp-Asn-Arg

5

AS-Teilsequenz 5 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid (1)):

1 5 10
 Met-Glu-Phe-Leu-_-Asp-Gly-Phe-Asp-Gly-Thr-Lys

10

AS-Teilsequenz 7 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid (1)):

1 5 10 14
 Ile-Ala-Leu-Glu-Ser-Thr-Ser-Pro-Ser-Gln-Ala-Tyr-Asp-Arg

15

AS-Teilsequenz 8 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid (1)):

1 5 10 15 20
 Val-Gly-Phe-Asn-Ser-Ala-Gly-Val-Ala-Val-Asn-Tyr-Asn-Ala-Leu-His-Leu-Gln-Gly-Leu-Arg-Pro-Thr-Gly-
 25 30 32
 Val-Pro-Ser-His-Ile-Ala-Leu-Arg

20

Beispiel 10: Isolierung von poly(A)⁺RNA aus Mycel von *Penicillium chrysogenum*:

Eine Sporensuspension von *Penicillium chrysogenum* P2/ATCC48271 wird in 5 Erlenmeyerkolben (zu je 1000 ml) mit je 100 ml CDS-Medium (für 1 l CDS-Medium werden nach dem Autoklavieren gemischt: 900 ml Lösung A: 3 g NaNO₃, 0,5 g MgSO₄·7H₂O, 0,5 g KCl, 0,1 g FeSO₄·2H₂O, 5 g Hefeextrakt, 10 g Caseinpepton, 20 g Saccharose, pH 5,8 und 100 ml Lösung B: 250 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 5,8) etwa 70 Stunden bei 25 ° und 250 Upm in einem Schüttler inkubiert. 12 Erlenmeyerkolben (zu je 1000 ml) mit je 300 ml CDLP-Medium (Zusammensetzung wie CDS-Medium, an Stelle von 20 g Saccharose jedoch 150 g Lactose/l und 50 ml 10 % Phenoxyessigsäure [gelöst in H₂O, pH 7,5 mit KOH eingestellt]) werden mit je 30 ml der Vorkultur beimpft und 40 Stunden bei 25 ° und 250 Upm im Schüttler inkubiert. Das Mycel wird mittels eines Büchner-Trichters abfiltriert, kurz mit TE gewaschen (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA) und in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben. Dieses Pulver wird in Lyse-Puffer (5 M Guanidinmonothiocyanat, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 8 % β-Mercaptoethanol) suspendiert (3 ml Lyse-Puffer pro g Mycelfeuchtmasse) und 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgt nach einer beschriebenen Methode (Cathala et al., DNA 2 [1983], 329-335). 60 g Mycel-Feuchtmasse erlauben es, etwa 18 mg Roh-RNA zu isolieren, die mit Ethanol gefällt und bei -70 ° aufbewahrt wird. Die Anreicherung der poly(A)⁺RNA geschieht durch eine Oligo (dT)Cellulose-Affinitätschromatographie, wie sie in Maniatis et al. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982) beschrieben ist. Dazu wird die Roh-RNA nach Zentrifugation und Trocknung in H₂O gelöst. Nach der Chromatographie werden Fraktionen, die poly(A)⁺RNA enthalten, erneut mit Ethanol gefällt und bei -70 ° aufbewahrt. Die Integrität der poly(A)⁺RNA wird durch Gelelektrophorese in Gegenwart von Glyoxal (Maniatis et al.) überprüft, die Konzentration durch UV-Absorption.

Beispiel 11: Partielle Sequenzierung einer RNA, die für das Enzym PAT kodiert:

Aus der Aminosäuresequenz des Polypeptides (1) der PAT (Beispiel 8) läßt sich aufgrund des genetischen Codes eine DNA-Sequenz ableiten (Fig. 5). Ein Bereich von 17 bp, der eine minimale Anzahl von unterschiedlichen Sequenzen zuläßt, wird für die Synthese von Oligonukleotidgemischen ausgewählt. 4 Gemische mit je 4 unterschiedlichen Oligonukleotiden, die zu dem Sinn-Strang und damit auch zur RNA komplementär sind, werden synthetisiert (Oligonukleotidgemische (1), (2), (3), (4) in Fig. 5). Diese Oligonukleotide werden enzymatisch phosphoryliert und dadurch radioaktiv markiert (Maniatis et al.). 150 ng Oligonukleotide werden in 12 µl Reaktionsansatz (50 mM Tris-HCl, pH 9,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTE, 5 % Glycerin) mit 250 µCi ATP (Amersham PB 10218) mit 16 Einheiten Polynukleotidkinase für 30 Minuten bei 37 ° inkubiert. 10 µg der poly(A)⁺RNA (Beispiel 10) werden in 250 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3 mit 2 µl ³²p markiertem Oligonukleotidgemisch in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß vermischt. Die Mischung wird 2 Minuten auf 75 ° erhitzt und dann 45 Minuten bei 50 ° erwärmt. In 4 Eppendorfgefäße werden je 3,3 µl Reaktionspuffer (24 mM Tris-HCl, pH 8,3, 16 mM MgCl₂, 8 mM DTE, 0,4 mM dATP, 0,8 mM dGTP, 0,4 mM dCTP, 0,4 mM dTTP, 6 Einheiten Reverse Transcriptase und außerdem je 1 µl 1 mM ddATP oder 1 µl 1 mM ddGTP oder 1 µl 1 mM

45

50

55

ddCTP oder 1 µl 1 mM ddTTP gegeben. Nach der Zugabe von je 2 µl poly(A)⁺RNA-Oligonukleotid-Gemisch wird der Inhalt des Eppendorfgefäßes kurz zentrifugiert und 45 Minuten bei 50 ° erwärmt. Die Reaktion wird durch 2 µl Stop-Puffer (99 % Formamid, 0,3 % Bromphenol-Blau, 0,3 % Xylencyanol) und dreiminütiges Kochen beendet. Je 4 µl der Proben werden auf ein 8 %iges Polyacrylamid/Harnstoffgel aufgetragen und 2,5 Stunden bei 40 W aufgetrennt. Nach dem Lauf wird das Gel für 20 Minuten in 5 % Methanol, 5 % Essigsäure gelegt und 1 Stunde bei 80 ° getrocknet. Das abgekühlte Gel wird in Haushaltsfolie eingeschlagen. Ein Röntgenfilm (Kodak XOMat AR) wird für 20 Stunden aufgelegt. Die Sequenz, die sich von diesem Röntgenfilm ablesen läßt, ist wiedergegeben:

10 5'-CCATTTGGAAGTTGACAATAGGCAGTGGTG
CAGCCATCACGGGCTCCTTGAGCCCGTATG
CAAATTCGGTGCGGGTATTAAGCATGACAA
TCTGGAGACATCGCGTTCA-3'

15 Die Positionen 1 bis 29 sind komplementär zur DNA-Sequenz, die sich aus der Aminosäuresequenz des Polypeptides (1) der PAT ableiten läßt (Fig. 5, 6 D). Ein Oligonukleotid, das die ersten 30 Nukleotide dieser Sequenz umfaßt, wird synthetisiert.

Beispiel 12: Konstruktion einer genomischen Genbank von *Penicillium chrysogenum*:

20 Aus dem Mycel einer in CDS Medium gewachsenen *Penicillium chrysogenum*-Kultur (Beispiel 10) wird DNA isoliert. Das Mycel wird in flüssigem Stickstoff zerrieben, dann in 1 % Sarkosyl, 0,1 M EDTA, pH 8, 100 µg Proteinase K/ml gegeben (1 g Mycel/25 ml) und 48 Stunden bei 37 ° geschüttelt. Die Mischung wird dreimal mit Phenol extrahiert und nach Zugabe von 0,1 Volumenanteilen 3 M Natriumazetat, pH 5,2, mit Ethanol gefällt. Anschließend wird eine CsCl-EtBr-Zentrifugation durchgeführt (Maniatis et al.) und nach Extraktion mit Isoamylalkohol und Dialyse gegen TE die Konzentration durch UV-Absorption bestimmt. Die DNA wird außerdem durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. 300 µg *Penicillium chrysogenum* DNA werden mit 5 U Sau3A (BRL) 60 Minuten bei 37 ° in 10 mM Tris-Cl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTE, 50 mM NaCl) 60 Minuten bei 37 ° gespalten. Das Ausmaß der Spaltung wird auf einem Agarose-Gel überprüft. Erwünscht ist, daß ein großer Teil der DNA zwischen 10 und 20 kb groß ist. Die DNA wird dann auf zwei NaCl-Gradienten (hergestellt durch Einfrieren und Wiederauftauen von 2 Beckman-SW28.1-Ultrazentrifugenröhrchen mit 20 % NaCl in TE [10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA]) aufgetragen und in der Ultrazentrifuge im Rotor SW 28.1, 16 Stunden bei 14.000 Upm zentrifugiert. Der Inhalt der Röhrchen wird fraktioniert. Fraktionen mit DNA größer als 10 kb werden vereinigt und gegen TE dialysiert. Nach einer Konzentrierung der DNA (500 µg/ml) wird sie mit Lambda-EMBL3-DNA (Frischhauf et al., J.Mol.Biol. [1983] 170, 827-832), die mit BamHI und EcoRI gespalten worden ist, vereinigt. In 30 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTE, 2,5 mM ATP wird nach Zugabe von 0,5 U T4DNA-Ligase über Nacht bei 16 ° ligiert (DNA-Konzentration 200 µg/ml, Vektor zu *Penicillium chrysogenum*-DNA im molaren Verhältnis von 1:1). Das Ligationsgemisch wird mit Hilfe von Proteinextrakten ("packaging mixes", Maniatis et al.) in vitro verpackt. Die entstandenen Lambda-Lysate werden auf dem Indikatorstamm NM539 (Frischhauf et al.) getitert. Erhalten werden etwa 40 10⁶ pfu.

Beispiel 13: Isolierung von Lambda-Klonen, die mit einem PAT-spezifischen Oligonukleotid hybridisieren:

40.000 rekombinante Phagen der *Penicillium chrysogenum* Genbank in EMBL3 (Beispiel 12) werden mit dem Stamm NM538 (Frischhauf et al.) auf 90 mm TB-Platten in 0,7 % Agarose ausgegossen (TB Medium enthält 10 g Bacto Trypton und 5 g NaCl pro l, der pH 7,5 wird mit NaOH eingestellt). Von diesen Platten werden je 2 Abdrücke auf Nylon-Filter hergestellt (Amersham Hybond N-Filter). Nach der UV-Fixierung der DNA werden diese Filter für die Hybridisierung eingesetzt. Das in Beispiel 11 beschriebene 30mer, dessen Sequenz komplementär zu der DNA-Sequenz ist, die aus der Aminosäuresequenz des Polypeptides (1) der PAT ist, wird radioaktiv markiert (T4-Polynukleotid-Kinase-Reaktion wie in Beispiel 11). Die Hybridisierung wird bei 37 ° in 6xSSPE (1xSSPE ist 0,15 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7,4), 30 % Formamid, 5x Denhard, 0,1 % SDS, 100 µg/ml Heringssperma-DNA, 0,1 mM ATP, 3 ng/ml ³²P-markiertes Oligonukleotid für etwa 20 Stunden durchgeführt. Die Filter werden dann dreimal 10 Minuten bei Raumtemperatur in 2x SSC (1xSSC ist 0,3 M NaCl, 0,03 M Natriumcitrat, pH 7,0), 0,1 % SDS und anschließend dreimal 20 Minuten bei 56 ° in 1x SSC, 0,1 % SDS gewaschen und nach dem Trocknen autoradiografiert. Regionen in der Agaroseschicht der ursprünglichen Platte, die positiven Hybridisierungssignalen auf dem Röntgenfilm entsprechen, werden mit einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen und in SM-Puffer (5,8 g NaCl, 2 g MgSO₄·7H₂O und 50 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5) resuspendiert. Eine geeignete Verdünnung wird mit NM538 als Indikatorstamm erneut auf TB-Platten ausgegossen. Die Phagen auf diesen Platten werden auf Nylonfilter übertragen und wie oben beschrieben hybridisiert. Aus Plaques, die zum zweiten Mal positive Signale ergeben, werden die entsprechenden rekombinanten Lambda-Phagen isoliert. Die

gereinigte DNA dieser Phagen wird für Restriktionsanalysen und Southernhybridisierungen verwendet. Außerdem werden Subklonierungen in Plasmide (pUC 12, Messing, Methods Enzymol. 101, 20, 1983) und M13-Vektoren durchgeführt (M13mp18, M13mp19, Norrender et al., Gene 26, 101, 1983).

Die Sequenzierung eines M13mp19-Subklons mit dem Oligonukleotid ergibt folgende Sequenz:

5
 5'-CATCACGGGCTCCTTGAGCCCGTATGCAA
 TTCCGTGCGGGTATTAAGCATGACAATCTG
 GAGACATCGCGTTCACCCCTTGCAATACC
 TGGTTTTTCGGGGTTCATCGGTCAGCATTG
 10 GTGCAGAAAATGTAGGAAAGACCGAAGTGG
 CACTCACCGCGAATCTCCTCGTAGTATTTG
 GGCCATCTTTCCTCGATC-3'

15 Die Nukleotide 35 bis 109 der DNA-Sequenz, die mit Hilfe der RNA bestimmt werden (Beispiel 11), stimmen mit den Nukleotiden 1 bis 75 dieser DNA-Sequenz überein (Fig. 6 F).

20

PATENTANSPRÜCHE

25

1. DNA aus *Penicillium chrysogenum*, die für das Enzym Penicillinacyltransferase (PAT) kodiert und eine Restriktionskarte aufweist, wie sie in Fig. 4 schematisch wiedergegeben ist.

30 2. DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie die folgende Teilsequenz aufweist (nicht codierender Strang):

5'-CCATTTGGAAGTTGACAATAGGCAGTGGTG
 CAGCCATCACGGGCTCCTTGAGCCCGTATG
 35 CAAATTCCGTGCGGGTATTAAGCATGACAA
 TCTGGAGACATCGCGTTCA-3'

40 3. DNA nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem Oligonukleotid der Sequenz 5-CCATTTGGAAGTTGACAATAGGCAGTGGTG-3', die komplementär zu der aus der Aminosäureabfolge des Polypeptides (1) der PAT abgeleiteten DNA ist, hybridisiert.

3. DNA nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie die folgende weitere Teilsequenz aufweist (nicht codierender Strang):

45 5'-CATCACGGGCTCCTTGAGCCCGTATGCAA
 TTCCGTGCGGGTATTAAGCATGACAATCTG
 GAGACATCGCGTTCACCCCTTGCAATACC
 TGGTTTTTCGGGGTTCATCGGTCAGCATTG
 GTGCAGAAAATGTAGGAAAGACCGAAGTGG
 50 CACTCACCGCGAATCTCCTCGTAGTATTTG
 GGCCATCTTTCCTCGATC-3'

55 5. DNA nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie die für die Transkription und Translation des *Penicillium chrysogenum* pat Gens notwendigen Sequenzen aufweist.

6. DNA nach den Ansprüchen 1 bis 5 oder ein Teil dieser DNA, eingebaut in eine Vektor-DNA, die zur Transformation verwendet werden kann.

60 7. Protein, für welches die nach den Ansprüchen 1 bis 4 beanspruchte DNA codiert, dadurch gekennzeichnet, daß es folgende Aminosäure-Sequenz enthält:

AS-Teilsequenz 1 (N-terminale Sequenz von Polypeptid (1)):

5 1-Thr-Thr-Ala-Tyr-Cys-Gln-Leu-Pro-Asn-Gly-Ala-Leu-Gln-Gly-Gln-Asn-Trp-Asp-Phe-Phe-Ser-Ala-Thr-Lys-
Glu-Asn-Leu-Ile-Arg-

AS-Teilsequenz 2 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid (1)):

10 Gly-Ala-Thr-Leu-Phe-Asn-Ile-Ile-Tyr-Asp-His-Ala-Arg

AS-Teilsequenz 3 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid (1)):

15 Pro-Thr-Asn-Pro-Asp-Glu-Met-Phe-Val-Met-Arg

AS-Teilsequenz 4 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid (1)):

20 Glu-Leu-Asp-Pro-Leu-Pro-Asp-Ser-Trp-Asn-Arg

AS-Teilsequenz 5 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid (1)):

25 Met-Glu-Phe-Leu-_-Asp-Gly-Phe-Asp-Gly-Thr-Lys

AS-Teilsequenz 7 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid (1)):

30 Ile-Ala-Leu-Glu-Ser-Thr-Ser-Pro-Ser-Gln-Ala-Tyr-Asp-Arg

AS-Teilsequenz 8 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid (1)):

35 Val-Gly-Phe-Asn-Ser-Ala-Gly-Val-Ala-Val-Asn-Tyr-Asn-Ala-Leu-His-Leu-Gln-Gly-Leu-Arg-Pro-Thr-Gly-
Val-Pro-Ser-His-Ile-Ala-Leu-Arg

40 8. Protein nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Protein als natives Enzym in der Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen in ein Polypeptid (1) mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kD und der N-terminalen Aminosäure-Teilsequenz (1) und in ein Polypeptid (2) mit einem Molekulargewicht von ca. 8 kD und folgender N-terminalen Aminosäure-Sequenz zerfällt:

AS-Teilsequenz 6 (N-terminale Sequenz von Polypeptid (2)):

45 Met-Leu-His-Ile-Leu-Cys-Gln-Gly-Thr-Pro-Phe-Glu-Ile-Gly-Tyr-Glu-His-Gly-Ser-Ala-Ala-Lys-Ala-Val-Ile-
Ala-Arg-Ser-Ile-Asp-Phe-Ala-Val-Asp-

50 9. Protein nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das native Enzym aus mehreren Isovarianten mit einem isoelektrischen Punkt um 5,1 besteht.

10. Protein nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Polypeptid (1) der basischen Isovariante in der Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen etwas rascher wandert als das Polypeptid (1) der sauren Isovariante.

55 11. Protein nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß es als Enzym durch reduzierende Verbindungen wie Dithiothreitol, β -Mercaptoethanol, Glutathion und Cystein aktiviert bzw. durch Sorbit, Saccharose oder Glycerin stabilisiert und durch Jodacetamid inaktiviert wird.

60 12. Protein nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß es von Penicillin G und Penicillin V produzierenden Stämmen der Gattung *Penicillium* gebildet wird.

13. Protein nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die aktive Form des Enzyms Isopenicillin N in Gegenwart von Phenylacetyl- oder Phenoxyacetyl-Coenzym A zu Penicillin G bzw. Penicillin V transacyliert.
- 5 14. Protein nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die aktive Form des Enzyms Penicillin V in Gegenwart von Phenylacetyl-Coenzym A zu Penicillin G bzw. dieses in Gegenwart von Phenoxyacetyl-Coenzym A zu Penicillin V transacyliert.
- 10 15. Protein nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die aktive Form des Enzyms 6-Aminopenicillansäure in Gegenwart von Phenylacetyl-Coenzym A bzw. Phenoxyacetyl-Coenzym A zu Penicillin G bzw. Penicillin V acyliert.
- 15 16. Protein nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die aktive Form des Enzyms 7-Amino-3-desacetoxycephalosporansäure in Gegenwart von Phenylacetyl-Coenzym A bzw. Phenoxyacetyl-Coenzym A zu den entsprechenden 7-Acyl-3-desacetoxycephalosporinverbindungen acyliert.
- 20 17. Protein nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die aktive Form des Enzyms Isopenicillin N, Penicillin V bzw. Penicillin G in Abwesenheit eines aktivierten Acyldonators zu 6-Aminopenicillansäure spaltet.
- 25 18. Protein nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die aktive Form des Enzyms als Acyltransferase Acyldonatoren wie natürliche Penicilline, deren Derivate bzw. Analoga sowie Coenzym A aktivierte hydrophobe fermentative Precursorsäuren bzw. deren Derivate auf Acylakzeptoren wie natürliche Penicilline, deren Derivate bzw. Analoga sowie Wasser überträgt.
- 30 19. Protein nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß mit der aktiven Form des Enzyms die enzymatische Reaktion in einem pH-Bereich zwischen 6,0 und 9,0, bevorzugt bei pH 7,5 bis 8,0, und in einem Temperaturbereich zwischen 10 und 40 °C, bevorzugt bei 25 bis 30 °C, stattfindet.

Hiezu 6 Blatt Zeichnungen

Fig: Reinigung der thiolabhängigen PAT aus *Penicillium chrysogenum* P2/ATCC 48271
Chromatofokussierung der affinitätschromatographisch hergestellten PAT-Enzympräparation AL 278/2 auf Mono P = AL 310

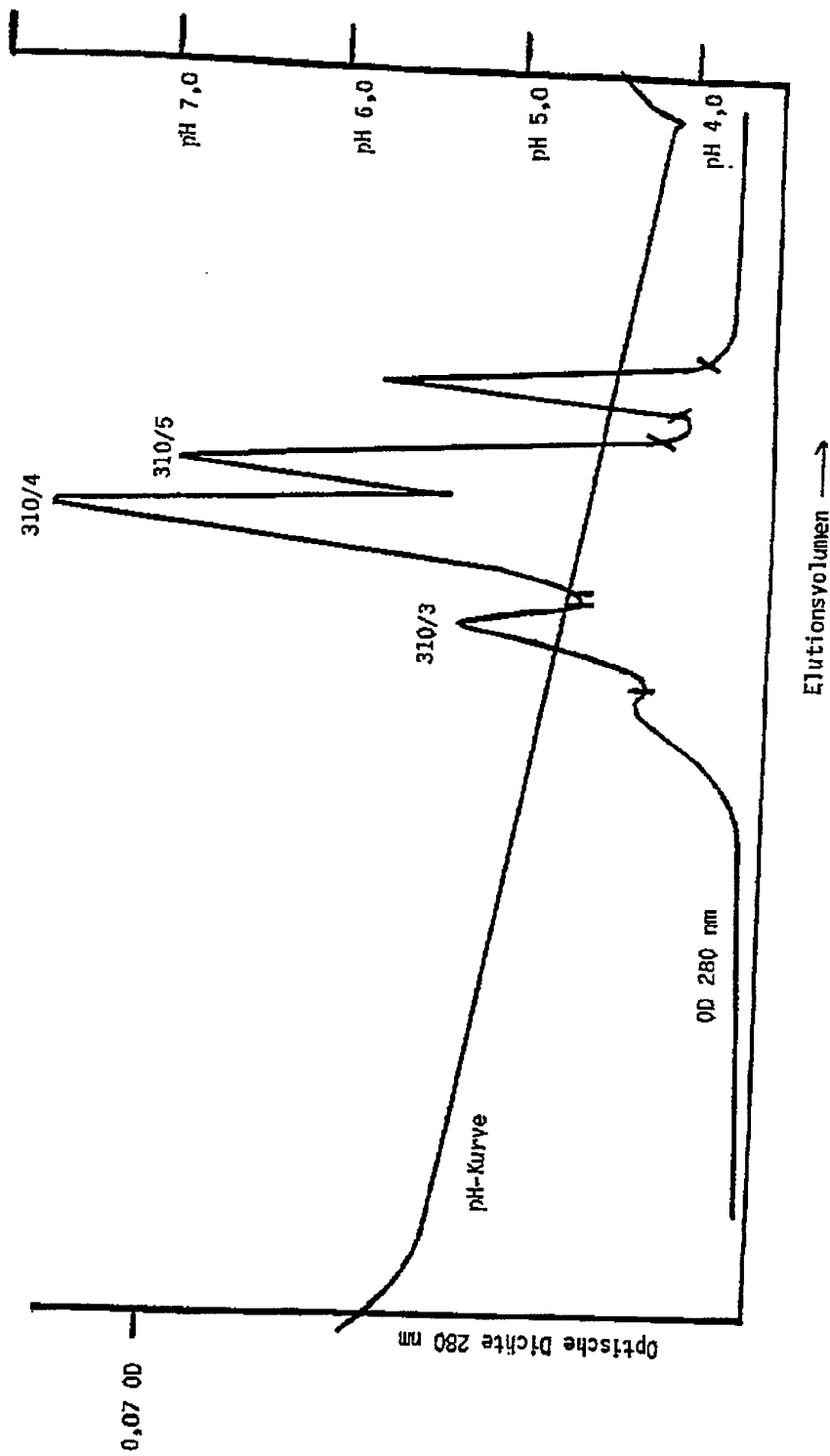


Fig. 2: Reinigung der thiolabhängigen PAT aus *P. chrysogenum* P2/ATCC 48271

RPC (MN Nucleosil 300-5/G4) von Fraktionen 3-5 aus AL 310/Chromatofokussierung des aktiven Pools AL 278/2 (nach Affinitätschromatographie) auf Mono P

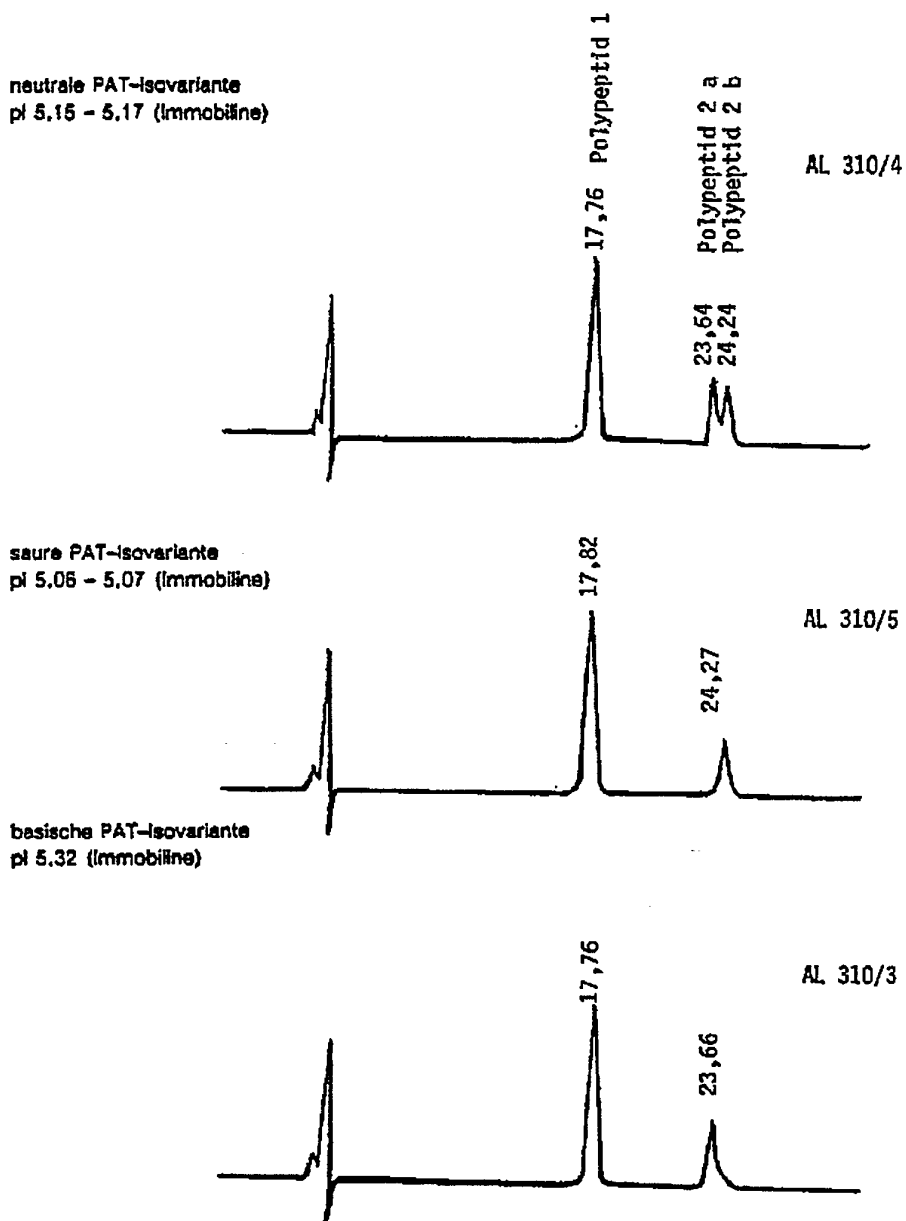
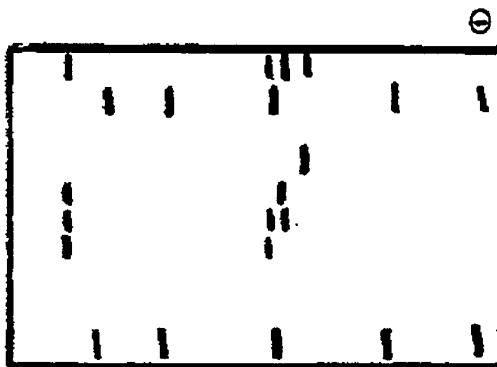


Fig. 3: Elektrophoretische Charakterisierung der thiolabhängigen PAT aus *Penicillium chrysogenum* P2/ATCC 48271

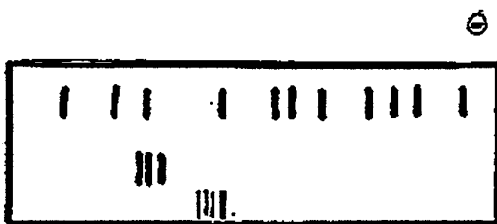
Gradienten SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und isoelektrische Fokussierung auf Ampholine (pH 3,5 - 9,5) bzw. Immobiline (pH 4,5 - 6,5) von AL 310/Chromatofokussierung der affinitätschromatographisch hergestellten PAT-Enzympräparation AL 278/2 auf Mono P.

3a: Gradienten SDS-PAGE (8-20% T)



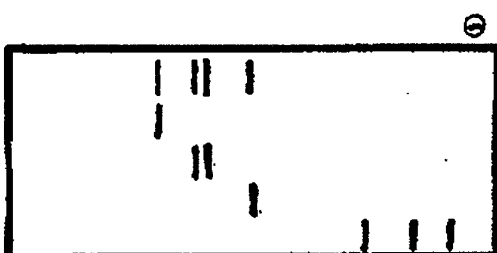
Spur	Bezeichnung	
1	Einsetz 278/2	
2	Low-MW-Std. 66. 45. 31. 22. 14 kD	
3	AL 310/7	pH-Bereich von 6.0 - 4.0 (→) A 25 mM b6-TRIS/HCl pH 6.3 B Polypuffer 74 10%lg pH 4.0
4	AL 310/8	
5	AL 310/5	
6	AL 310/4	
7	AL 310/3	
8	AL 310/2	
9	AL 310/1	
10	Low-MW-Std. 66. 45. 31. 22. 14 kD	

3b: Ampholine (pH 3,5 - 9,5)



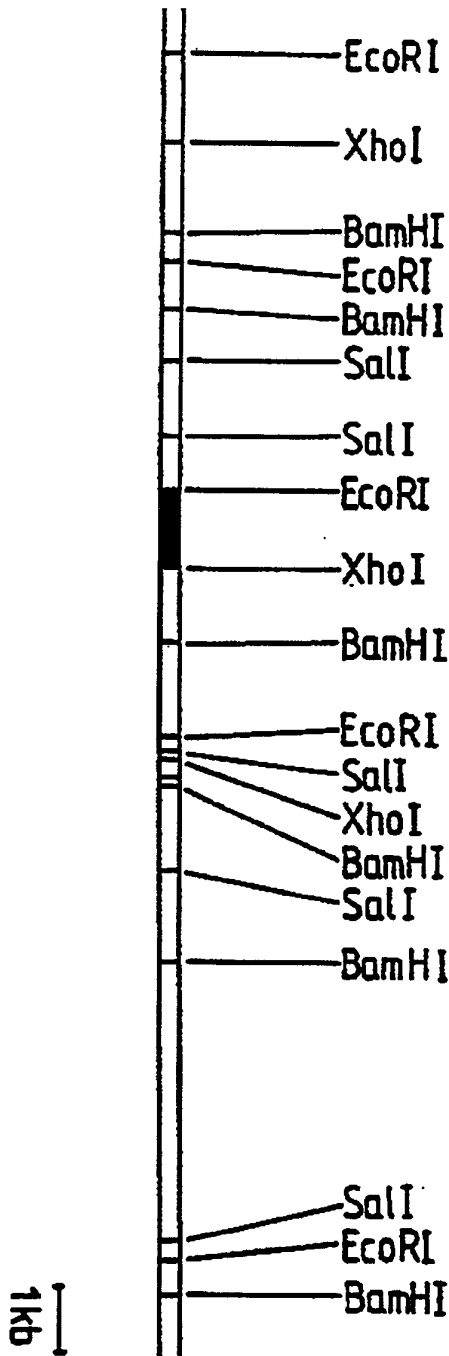
Spur	Bezeichnung
1	pI-Std. Pharmacia von - nach + (9.30: 8.85: 8.45: 8.15: 7.35: 6.85: 6.55: 5.85: 5.20: 4.55: 3.50)
2	AL 278/2
3	Carboanhydrase

3c: Immobiline (pH 4,5 - 6,5)



Spur	Bezeichnung	Herkunft
1	AL 278/2	Affinitätschromatogr., S-APA-AH-Sep.
2	AL 310/5	Chromatofokussierung
3	AL 310/4	
4	AL 310/3	
5	Carboanhydrase	

Fig. 4 Restriktionskarte aus *Penicillium chrysogenum*, die das pat-Gen umfaßt



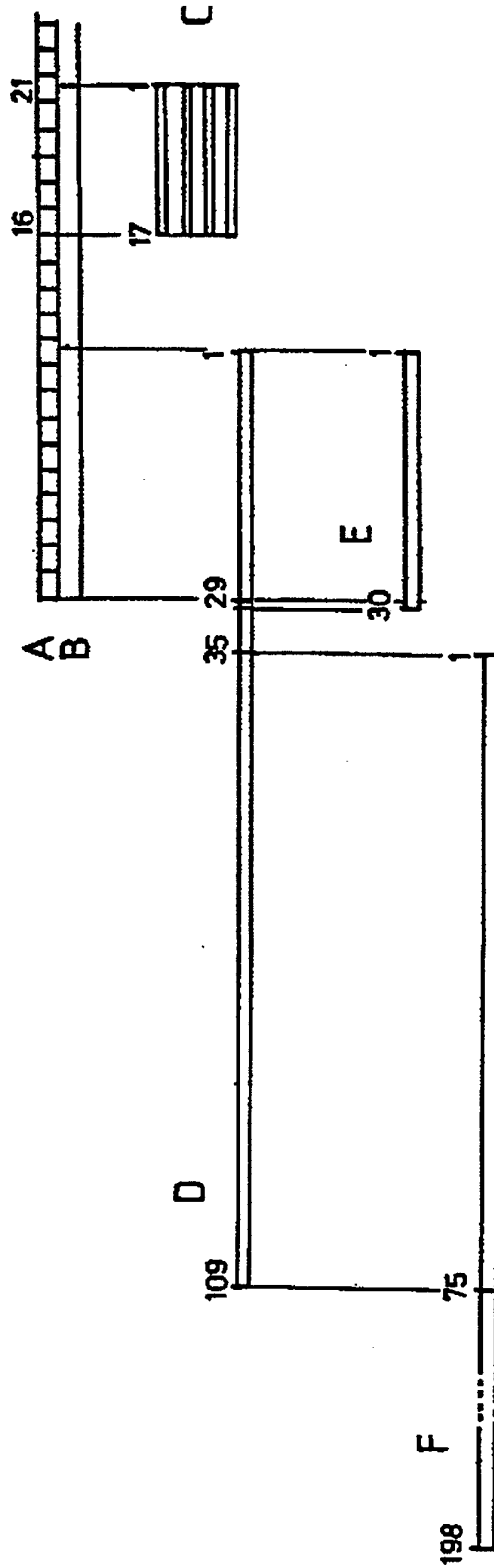


Fig. 6: Schematische Darstellung der Zusammenhänge zwischen den sequenzfernten Bereichen (D, F), den Oligonukleotiden (C, E), dem Polypeptid I der PAT (A) und der Sequenz des daraus abgeleiteten kodierenden DNA-Stranges (B)