

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**INSZERCÍÓS MUTAGENEZIS ALKALMAZÁSA SZTERINLEBONTÁSÉRT
FELELŐS *MYCOBACTERIUM* GÉNEK MEGISMERÉSÉBEN**

**APPLICATION OF INSERTIONAL MUTAGENESIS TO IDENTIFY GENES
RESPONSIBLE FOR STEROL DEGRADATION IN *MYCOBACTERIUM***

Andor Attila

Témavezető: Prof. Dr. Szentirmai Attila



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

2011

1. Előzmények, célkitűzések

A 1980-as évektől kezdődően az ipari szteroid gyógyszerszintézisek kiindulási anyagként az olcsón és nagy mennyiségben hozzáférhető növényi eredetű szterinek kerültek előtérbe. Jelenleg a szteroid gyógyszerek többségét szójából nyert szitoszterinből állítják elő olyan módon, hogy a szterin-oldallánc mikrobiológiai úton történő eltávolításával nyernek előnyös szintézis-intermediereket a szteroid gyógyszerek előállításához.

Ahhoz, hogy a gyógyszerszintézisekhez alkalmas intermediereket kapjunk, az oldallánc lebontásával egyidejűleg végbemenő szteránváz bontást meg kell akadályozni. A váz bomlást előidéző két kulcsenzim a 9α -hidroxiláz és a $\Delta 1$ -dehidrogenáz. Ezek valamelyikének működését gátolva a szteránváz épen marad. Először a vastartalmú 9α -hidroxiláz enzim működését sikerült meggátolni Nagasawa-nak és munkatársainak a Noda Intézetben, Japánban és Dr. Wix Györgynek és munkatársainak a budapesti Gyógyszerkutató Intézetben Fe^{2+} ionokkal komplexet képző vegyületeket adagolva az átalakítást végző mikroorganizmus tenyészetéhez. A Gyógyszerkutató Intézet kutatócsoportjának a szitoszterin- és a koleszterin-oldallánc szelektív lebomlását sikerült elérni oly módon is, hogy e szterinek hidroxil-csoportját rövid szénláncú alkil-éter-, illetve karbamoil-védőcsoporttal látták el, ezzel megakadályozva annak ketonná alakulását, ami a szteránváz lebomlásának első lépése.

Az 1970-es években olyan szterin-oldallánc lebontási eljárásokat fejlesztettek ki, ahol a biokonverzióhoz használt mikobakteriumokban mutagén kezelésekkel inaktívták a váz bomlást előidéző enzimeket. A Gyógyszerkutató Intézetben a genetikailag módosított örökítő anyagú mikobaktériumokkal végzett szitoszterin-oldallánc lebontási kísérletek Szentirmai Attila professzor irányításával indultak meg. A Richter-gyári biotechnológiai kutatócsoporttal éveken át közösen végzett kutató-fejlesztő munka során a 4-androsztén-3,17-dion, és a 9α -hidroxi-4-androsztén-3,17-dion szteroid gyógyszerszintézis kulcsintermediere előállítására egyaránt sikerült ipari előállítási eljárást kifejleszteni. A 4-androsztén-3,17-diont a Richter Gedeon RT-ben két évtizede gyártják, és kiindulási anyagnak használják szteroid gyógyszertermékeik szintéziséhez.

E kutatási és fejlesztési munkák során klasszikus mutációs módszerekkel és szferoplaszt-fúzióval kivitelezett *in vivo* genetikai rekombinációs technika alkalmazásával előállított mikobaktérium törzsekkel 23 részlegesen lebontott oldalláncú terméket izolált kutatócsoportunk. Ezek közül a 9α -hidroxi-23,24-dinor-4,17(20)-koladién-22-savból

pregnánvázas kulcsintermediereket állítottunk elő új szintetikus eljárásokkal a kortikoid gyógyszerek előállításához a Gyógyszerkutató Intézetben.

A kívánt szterin-átalakító képességgel rendelkező ipari törzsek kifejlesztésére klasszikus mutációs szelekciós módszereket és *in vivo* genetikai rekombinációs technikát alkalmaztunk. Ezen módszereknél szelektívebb, például egy enzim működését serkentő vagy gátló hatást *in vitro* genetikai módszerekkel érhetünk el.

A géntechnológiai módszerek mikobaktériumoknál történő alkalmazása az 1980-as évek végén kezdődött. A kutatásokat az ösztönözte, hogy a mikobaktériumok okozzák a világon a két legnagyobb arányú halálozással járó bakteriális fertőzést, a tuberkulózist és a leprát. Az első ingázó vektorok egyikét, a pYUB12 *Mycobacterium-E. coli* vektort Jekkel Antalné dr. állította elő ösztöndíjas tanulmányútján Angliában, a Norwich-i John Innes Kutatási Központban, 1988-ban.

A szitoszterin oldalláncának szelektív lebontására kifejlesztett eljárásokat már hosszú ideje alkalmazzák a gyógyszeriparban világszerte, így ezek lényeges fermentációs technológiai továbbfejlesztése már nem várható. Elképzelhető viszont, hogy az oldallánc lebontási eljárások teljesítőképessége növelhető az oldallánc lebontásban szerepet játszó és főleg annak sebességét meghatározó enzimek működésének fokozásával. A szitoszterin-oldallánc lebontás intermedierjeinek izolálásával és szerkezetük meghatározásával sikerült megismerni az oldallánc lebontásának mechanizmusát, de az e folyamatban résztvevő enzimeknek és génjeiknek szerkezete még nem ismert. Ezen enzimek génjeinek a szterinlebontó mikobaktériumok genomjában való megtalálására és ezáltal szerkezetük meghatározására az inszerciós mutagenézis módszerének alkalmazását véltük legcélszerűbbnek. E célkitűzés megvalósítására végzett kísérleteimről számolok be értekezésemben.

Kitűzött célok:

1. Inszerciós mutagenézis alkalmazása szterinhasznosító mikobaktériumoknál a szitoszterin lebomlási metabolizmus blokkmutánsainak előállítása céljából.
 - a) Inszerciós mutáns könyvtárak előállítása ipari szempontból jelentős szterinátalakító *Mycobacterium* törzsekben.
 - b) Szűrővizsgálati („screening”) módszer kifejlesztése a mutáns könyvtárakat alkotó törzsek szterin-átalakító képességének meghatározására.

2. Az ipari szempontból jelentős 9 α -hidroxiláz enzim klónozása működésében gátolt inszerciós mutáns felhasználásával.
 - a) Inszerciós mutagenézis módszerrel inaktivált 9 α -hidroxiláz enzim génjének kinyerése a blokkmutáns kromoszómális DNS-éből.
 - b) A natív 9 α -hidroxiláz enzim génjének izolálása a szülői *Mycobacterium* törzs genomiális génkönyvtárából és molekuláris jellemzése.
3. A rekombináns 9 α -hidroxiláz enzim expressziója.
 - a) Homológ fehérje expresszió a 9 α -hidroxiláz enzimaktivitással nem rendelkező, 4-androsztén-3,17-diont termelő *Mycobacterium phlei* törzsben.
 - b) A 9 α -hidroxiláz enzim expresszálása *E. coli*-ban.

2. Új tudományos eredmények

1. A Tn611 transzpozont hordozó pCG79 jelű hőérzékeny plazmid DNS alkalmazásával inszerciós mutáns könyvtárakat hoztunk létre ipari szempontból is jelentős *Mycobacterium smegmatis* mc²155 és *Mycobacterium phlei* M51-Ept törzsekben. Mindkét törzs képes a szitoszterint metabolizálni; a *M. smegmatis* mc²155 intermedier képződés nélkül teljesen lebontja a szitoszterint, míg a *M. phlei* M51-Ept 4-androsztén-3,17-diont képez főtermékként. Célunk az volt, hogy a transzpozont hordozó vektor szterinátalakító *Mycobacterium* törzsekbe juttatásával szterin-átalakító képességben blokkolt inszerciós mutánsokat állítsunk elő. Ilyen mutánsok birtokában ugyanis lehetőség nyílik a szterinátalakítás génszintű vizsgálatára. A pCG79 jelű plazmid DNS-t elektroporációs módszerrel transzformáltuk a szterinátalakító *Mycobacterium* törzsekbe, majd a tenyésztési hőmérsékletet 30°C-ról 39°C-ra emelve kiváltottuk a transzpozont hordozó plazmid kromoszómába való integrációját. Southern-blot hibridizációval bizonyítottuk a kromoszómális integráció tényét, valamint Guilhot és munkatársai által leírt random jellegét, ami előfeltétele annak, hogy kellően nagyszámú törzs levizsgálása után szterinátalakító képességben blokkolt mutánsokat izoláljunk.

2. Nagy-áteresztőképességű szűrőmódszert fejlesztettünk ki mikrotiter lemezre a szterinátalakító képességben megváltozott mutáns törzsek kiválasztásához. Mindkét inszerciós mutáns könyvtárból 10-10 ezer törzset szaporítottunk szitoszterin jelenlétében mikrotiter lemezek lyukaiban és szterin-átalakító képességüket e „mini” fermentorokban felhalmozódott intermedierek vékonyrétegekromatográfiás analízisével vizsgáltuk. A

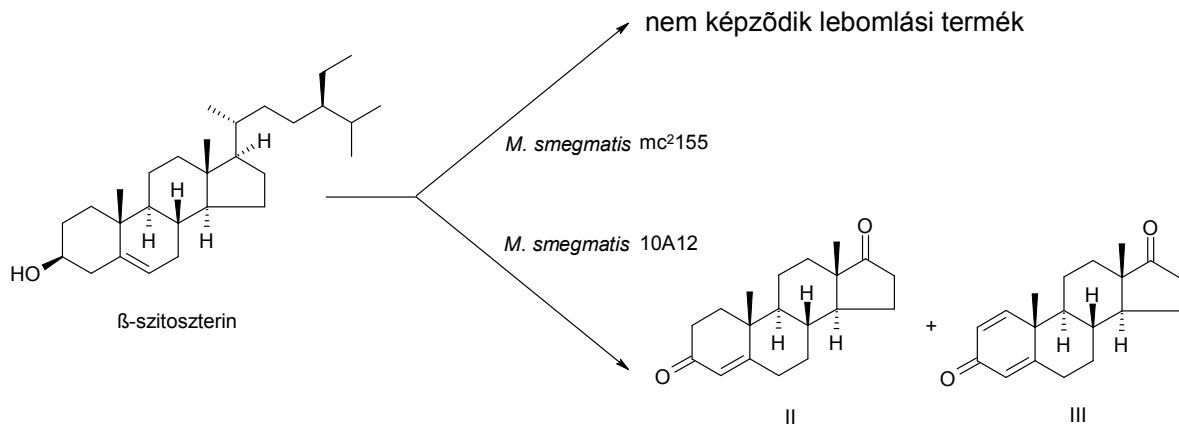
fermentációhoz 200 µg/ml β-szitoszterinnel kiegészített M-ADC-TW (Difco) táptalajt használtunk, mely a β-szitoszterint nagyon finom szemcséjű szuszpenzió formájában tartalmazta, amely alig ülepedett.

3. Négy törzset találtunk, amelyek szterinlebontó enzimaktivitásai különböztek a szülői törzsekétől (1. táblázat).

<i>Mycobacterium</i> törzsek		Szitoszterin lebontási termékek
Szülői törzsek	Inszerációs mutánsok	
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	Kontrol	Nincs termékképződés
	10A12	4-androsztén-3,17-dion (II) 1,4-androsztadién-3,17-dion (III)
<i>M. phlei</i> . M51-Ept	Kontrol	4-androsztén-3,17-dion (II)
	3B7	22-hidroxi-23,24-dinor-4-kolén-3-on (VI) 3-oxo-23,24-dinor-4,17(20)-koladién-22-sav- metilészter (VII) 3-oxo-23,24-dinor-4-kolén-22-sav-metilészter (VIII)
	5G4, 10G9	17β-hidroxi-4-androsztén-3-on (V) 4-androsztén-3,17-dion (II)

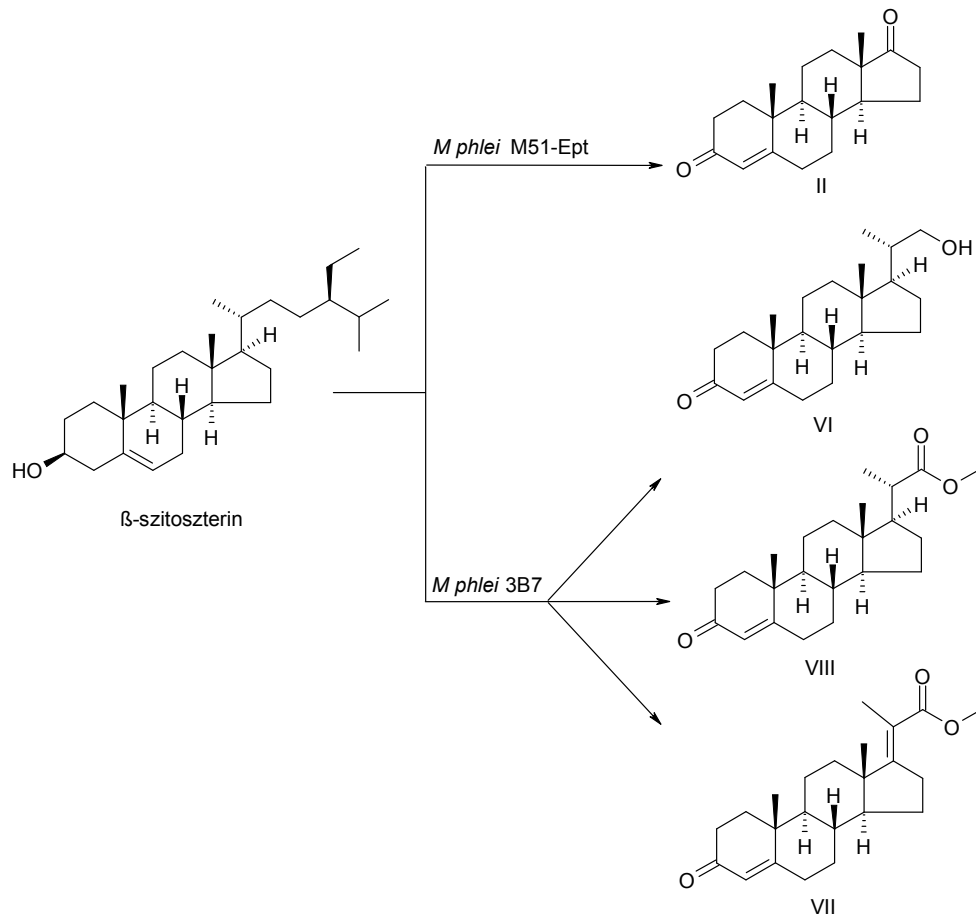
1. táblázat *Mycobacterium* inszerációs mutánsokkal előállított szitoszterin-oldallánc lebontási termékek

A szitoszterint intermedier képződés nélkül teljesen lebontó *Mycobacterium smegmatis* mc²155 inszerációs mutáns könyvtárából izoláltuk az 1,4-androsztadién-3,17-dion termelő 10A12 jelű inszerációs mutánt, amely a 9α-hidroxiláz működésében gátolt (1. ábra).



1. ábra A szteránváz lebomlásának gátlása *Mycobacterium smegmatis* mc²155 jelű törzs 10A12 mutánsban a 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz enzimet kódoló DNS régió inaktiválása révén

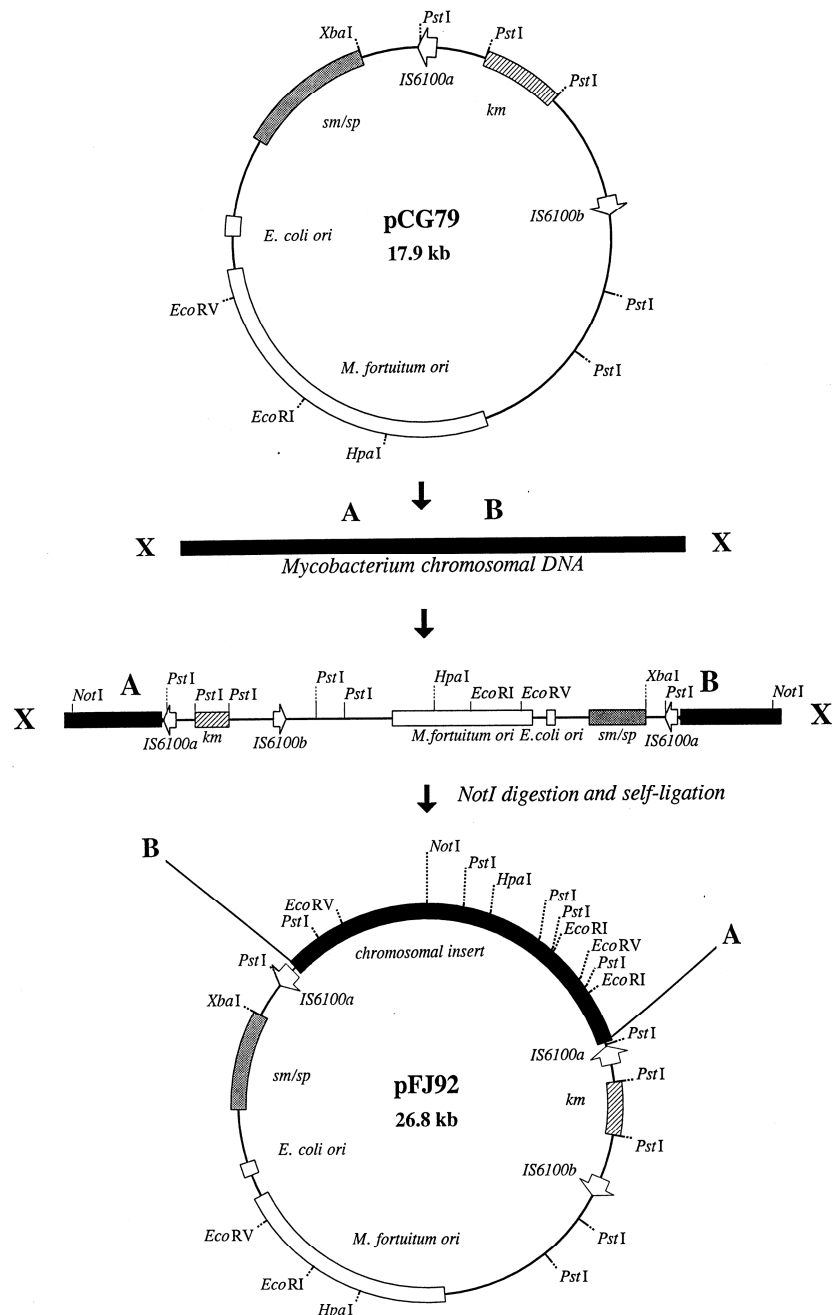
A 4-androsztén-3,17-dion termelő *Mycobacterium phlei* M51-Ept szülői törzsből nyert *Mycobacterium phlei* 3B7 jelű mutáns dinorkolánváz vegyületeket képez (2. ábra). Az általa termelt 3-oxo-23,24-dinor-4,17(20)-koladién-22-sav-metilészter előnyös kiindulási anyaga a 17 α -hidroxi-4-pregnén-3,20-dion intézetünkben kidolgozott új szintézisének. A 17 α -hidroxi-4-pregnén-3,20-dionból kortikoszteroidok állíthatók elő ismert módon.



2. ábra A szitoszterin-oldallánc lebontó képesség megváltoztatása *Mycobacterium phlei*-ben transzpozon mutagenézis alkalmazásával

4. A *Mycobacterium smegmatis* 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz enzimjének terminális oxigenáz komponensét elsőként izoláltuk és molekulárisan jellemeztük a *Mycobacterium smegmatis* 10A12 inszerciós mutánst felhasználva.

A 10A12 törzs kromoszómális DNS-éből visszanyertük a 9 α -hidroxiláz génbe inszertálódott pCG79 plazmid DNS-t oldalain a kettészakított a 9 α -hidroxiláz gén darabjaival. A rekombináns plazmidot pFJ92-nek neveztük el és restrikciós endonukleázokkal feltérképeztük (3. ábra).



3. ábra. Tn611 transzpozon replikatív integrációja és a 9 α -hidroxiláz hordozó pFJ92 plazmid visszanyerése *M. smegmatis* 10A12 kromoszómális DNS-éből

A pFJ92 plazmid két, radioaktív izotóppal jelzett kromoszómális szegmensét felhasználva izoláltuk az intakt 9α -hidroxiláz gént hordozó *NotI* kromoszómális fragmentumot a szülői *M. smegmatis* mc²155 jelű törzsből.

A 9α -hidroxiláz gént hordozó *NotI* kromoszómális fragmentumot higromicin rezisztenciát kódoló pOLYG *Mycobacterium-E. coli* ingázó vektorba inszertáltuk. Az így nyert pAA23 jelű rekombináns plazmiddal transzformálva a 10A12 jelű inszerciós mutáns, helyreállt a 9α -hidroxilező aktivitása, melynek következtében a szitoszterint intermedier képződés nélkül ismét teljesen lebontotta. Az eredetileg 9α -hidroxiláz aktivitást nem mutató *Mycobacterium phlei* transzformánsai a 4-androsztén-3,17-diont 9α -helyzetben hidroxilezték a rekombináns 9α -hidroxiláz expressziója révén. Szubsztrátumként 1,4-androsztadién-3,17-diont adva a tenyészethez, 9α -hidroxil-1,4-androsztadién-3,17-dion átmeneti terméken keresztül 3-hidroxil-9,10-szeko-1,3,5(10)-androsztatrién-9,17-dion keletkezett.

Komplementációs kísérletekkel egy 3 kb nagyságú *EcoRI-EcoRV* restrikciós enzimekkel határolt régióra szűkítettük a 9α -hidroxiláz aktivitást, majd szekvenálással meghatároztuk az inszerció pontos helyét és a 9α -hidroxiláz kódoló ORF-1 szekvenciáját.

A 9α -hidroxilázunk a DNS szekvenciájából lefordított fehérje homológia vizsgálata alapján a monooxigenázok IA osztályba tartozó terminális oxigenázai közé sorolható. A fehérjeszekvencián azonosítható az IA osztályba tartozó terminális oxigenázokban jellemzően konzervált Rieske [2Fe-2S]_R domén és egy nem-hem Fe(II) domén (4. ábra).

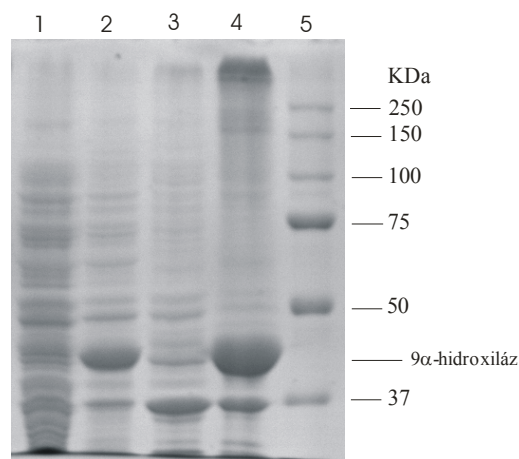
	Rieske [2Fe-2S] domén		Nem-hem Fe (II) domén			
	C	H	D/E	D	H	H
M. s. 9α -hidroxilázA	63	AYCRHMGGDL SKGTVKGD KVCAPFHDWRWGGDG	95	171	I D	NVTDMAHFFYIH 184
Rv 3526	65	GYCRHMGGDLSEGT VKGDEVACPFHDWRWGGDG	97	173	I D	NVTDMAHFFYIH 186
KshA	78	AYCRHMGGNLAHGT VKGDSIACPFHDWRWGGNG	110	186	V D	NVVDMAHFFVYH 199

4. ábra. Rieske [2Fe-2S] domén és egy nem-hem Fe(II) domén azonosítása 3-ketoszteroid- 9α -hidroxilázok terminális oxigenázában (DDBJ/EMBL/GeneBank hozzáférési szám zárójelben): M.s. 9α -hidroxilázA (DQ357196), 3-ketoszteroid- 9α -hidroxiláz terminális oxigenáz komponense *M. smegmatis* mc²155-ben; Rv 3526 (CAB05051), feltételezett 3-ketoszteroid- 9α -hidroxiláz terminális oxigenáz komponense *M. tuberculosis* H37Rv-ben; KshA (AY083508) 3-ketoszteroid- 9α -hidroxiláz terminális oxigenáz komponense *Rhodococcus erythropolis* SQ1-ben

5. A 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz enzim terminális oxigenáz komponensét *E. coli*-ban funkcionálisan aktív formában expresszáltuk a kereskedelmi forgalomban lévő pET rendszert alkalmazva. A pET-plazmidokban klónozott gének a T7 bakteriofág erős transzkripció szignáljának ellenőrzése alá kerülnek. A kívánt gén transzkripciójához szükséges T7 RNS-polimeráz csak indukció útján termeltethető.

A 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz enzim terminális oxigenáz komponensét pET-28a(+) expressziós vektorban klónoztuk, majd *E. coli* BL21- λ DE3 törzsbe transzformáltuk. A 9 α -hidroxiláz enzimet expresszáló törzsek közül egy klónt szelektáltunk és pOX17-nek neveztük el. Az *E. coli* BL21/pOX17 törzset LB táptalajon 25 μ g/ml kanamicin jelenlétében növesztettük 37°C-on. Amikor a tenyészet optikai denzitása 600 nm-en elérte a 0,5-1,0 értéket, 100 μ g/ml 4-androsztén-3,17-dion szubsztrátumot adagoltunk és a lac promótert 0,4 mM izopropil- β -D-tiogalaktozid (IPTG) hozzáadásával indukáltuk. Az indukció után egy nappal a szubsztrátumként adott 4-androsztén-3,17-dion 9 α -hidroxilezését tudtuk kimutatni a fermentáléban kromatográfiás módszerekkel.

A fehérjeexpressziót SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (PAGE) vizsgáltuk (5. ábra). A tenyészet egy aliquotjából származó sejteket szonikáltuk, majd az oldhatatlan test formájában képződött fehérjéket centrifugálással kiülepítettük. A felülúszó tartalmazta az oldható formában képződött fehérjéket. Az IPTG-vel indukált, 9 α -hidroxilezésre képes *E. coli* BL21/pOX17 tenyészeiből nyert fehérje-extraktumok SDS-PAGE analízise nagy mennyiségű rekombináns terminális oxigenáz termelést mutatott.



5. ábra. *E. coli* BL21/pOX17-ben expresszált *M. smegmatis* mc²155-ből származó 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz enzim terminális oxigenáz komponensének SDS-PAGE analízise

Sáv 1: nem indukált sejtek lizátumának oldható frakciója; sáv 2: 0,4 mM IPTG-vel indukált sejtek lizátumának oldható frakciója; sáv 3: nem indukált sejtek lizátumának oldhatatlan test frakciója; sáv 4: 0,4 mM IPTG-vel indukált sejtek lizátumának oldhatatlan test frakciója; sáv 5: Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad), 250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa

A rekombináns fehérje főként oldhatatlan test formájában képződött és csak kisebb hányadban volt jelen oldható állapotban (5. ábra). Mivel az *E. coli* BL21/pOX17 képes *in vivo* szteroid transzformációra a hidroxiláz enzim mikobakteriális reduktáz komponensének hiánya ellenére is, valószínűleg ezt az *E. coli* egyik reduktáz enzime pótolja.

A 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz terminális oxigenáz komponensének heterológ rendszerben, aktív formában való expressziója további bizonyítékul szolgál az izolált DNS szerepére.

3. Ipari perspektívák

A DNS szekvenálási technika fejlődésével egyre több genomsekvenciális projekt valósul meg prokarióták és eukarióták körében egyaránt. A *Mycobacterium* genusból a *M. tuberculosis* szekvenciáját 1998-ban publikálták Cole és munkatársai. Jelenleg a *Mycobacterium smegmatis* genomális DNS-ének „négybetűs szövegkódja” is rendelkezésre áll. A szekvencia adatok azonban csak a genomot alkotó gének szerkezetére adnak információt, de a hozzájuk tartozó funkció többnyire még felderítetlen.

A szterinek mikrobiológiai lebontása a szteránvázon és az oldalláncon párhuzamosan halad.

1. A szterin-oldallánc lebomlása a láncvégi 26-os szénatomon végbemenő hidroxileződéssel kezdődik, majd a 26-os hidroxilcsoport dehidrogénezésével karbonsavvá alakul, ami a zsírsavak metabolizmusára jellemző β -oxidációs mechanizmussal bomlik le. Ahhoz, hogy az oldallánc lebomolhasson, a mikroorganizmus karboxilcsoportot kell beépítsen az oldallánc 24-es szénatomjáról leágazó etilszubsztituenszen lévő 28-as szénatomra. Az oldallánc lebontása során a β -oxidációs folyamat egymás után négyszer megy végbe. Ha a karboxilezés a 28-as szénatomon nem játszódik le, a lánclebomlás már az első β -oxidációs ciklusban elakad és a 24-es szénatomon ketocsoportot tartalmazó 27-nor-kolesztán-oldalláncú termék keletkezik.

2. A szterinek vázának 3 β -hidroxi-5,6-dehidro-szerkezete először 3-keto-4-én-struktúrájává alakul, ezt követően a baktérium hidroxilcsoportot épít be 9 α -helyzetbe, és dehidrogénezéssel 1,2-helyzetű kettőskötést képez. A kialakuló 9 α -hidroxi-3-keto-1,4-dién-struktúra instabil, és spontán átrendeződik a B-gyűrűben felhasadt 3-hidroxi-9,10-szeko-1,3,5(10)-trién-9-on-szerkezetűvé, ami már ugyancsak felderített úton tovább bomlik széndioxiddá és vízzé.

A Tn611 transzpozont hordozó pCG79 plazmid DNS-el megvalósított inszerciós mutagenézis, továbbá a mutánsok miniatürizált tenyészetekben képződő szitoszterin lebontási termékek nagy-áteresztőképességű szűrővizsgálata egy hatékony módszer a szitoszterin lebontásában szerepet játszó gének azonosítására és a genomban való lokalizációjára. A transzpozon által kettészakított gének izolálhatók és felhasználhatók további DNS munkákhoz. Például a szitoszterin-oldallánc lebontás sebességmeghatározó enzimjeinek expresszióját növelve fokozható az ipari törzsek oldallánc lebontó képessége. Úgy véljük, hogy nem a β -oxidációban érintett enzimek, hanem a 26-hidroxiláz, illetve a 28-as szénatomra karboxil-csoportot beépítő enzim lehet a sebességmeghatározó.

A 9α -hidroxiláz aktivitásban blokkolt *M. smegmatis* 10A12 inszerciós mutánst felhasználva klónoztuk és molekulárisan jellemeztük a szteránváz lebontásának egyik kulcsenzimét, a 3-ketoszteroid- 9α -hidroxiláz terminális oxigenázát.

Úgy véljük, hogy az oldallánc lebontásban sebességmeghatározó enzimek génjei is megismerhetők lesznek és géntechnológiai úton javítható lesz a szitoszterin oldallánc mikrobiológiai lebontásának hozama.

1. Preceding, objectives

From the 1980's on, the cheap and widespread plant sterols have been applied as starting materials for the industrial synthesis of steroid drugs. Nowadays, the majority of the steroid drugs are produced from soybean originating sitosterol. The selective, microbial removal of the sitosterol side chain provides key intermediates for these syntheses.

To obtain intermediates suitable for the drug synthesis, the degradation of the steran skeleton proceeding simultaneously with the side chain removal has to be inhibited. The two key enzymes initiate the skeleton degradation are the 9α -hydroxylase and the Δ^1 -dehydrogenase. Blocking the activity of either of these enzymes, the steran skeleton remains unbroken. At first, the activity of ferrum containing 9α -hydroxylase was inhibited by Nagasawa and his co-workers in Japan and Dr. György Wix and his co-workers in Budapest, adding agents forming complex with Fe^{2+} ions to the culture of the microorganisms. The research group of the Institute for Drug Research succeeded in blocking the side chain degradation of sitosterol and cholesterol in such a way also that they protect the hydroxyl moiety of these sterols with short chain alkyl-ether or carbamoyl-ether to inhibit the formation of 3-oxo structure, which is the first step of the steran skeleton degradation.

In the 1970's new methods were developed for selective side chain degradation of sterol, wherein the activities of the enzymes triggering the steran skeleton degradation were inactivated by mutagenic treatments of *Mycobacterium* strains used for the bioconversion. At the Institute for Drug Research Professor Attila Szentirmai initiated and supervised the research work aimed to accomplish selective side chain degradation with genetically modified mycobacteria. The research and development work proceeded jointly with the research team of biotechnology in Richter Gedeon RT that resulted in the industrial production of 4-androstene-3,17-dione and 9α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione intermediates. The 4-androstene-3,17-dione has been produced at the Richter Gedeon RT for two decades, and it is used as starting material for the production of steroid medicines.

During this work our research group isolated 23 intermediates with partially degraded side chain using classical mutagenesis and *in vivo* genetic recombination technique. From one of these 23 compounds, from the 9α -hydroxy-23,24-dinor-4,17(20)-choladiene-22-oic acid, a new synthetic methods for the production of key intermediates with pregnane skeleton as starting materials for the production of corticosteroid drugs was elaborated at the Institute for Drug Research.

Classical mutagenesis and *in vivo* genetic recombination techniques have been applied so long to develop industrial strains possessing the desired sterol transforming activity. More selective effect, for example, improving or blocking the activity of a certain enzyme, can be achieved by *in vitro* genetic methods.

Application of gene technology to *Mycobacterium* started at the end of 1980's years. The researches were challenged by the fact that mycobacteria are responsible for two of the most important bacterial diseases leading to the highest mortality worldwide, the tuberculosis and the leprosy. One of the first shuttle vectors, the pYUB12 *Mycobacterium-E. coli* vector was developed by Dr. Antónia Jekkel in 1988 in the John Innes Research Park in Norwich.

The methods developed for the selective degradation of sitosterol have been applied in the pharmaceutical industry for many years, thus substantial changes in the fermentation processes cannot be expected. However, it is supposed that the performance of these processes can be further developed by increasing the activity of the enzymes participating in, mainly those of that catalyze the rate limiting steps in the side chain degradation pathway. With the isolation of the intermediates of sitosterol side chain degradation and the determination of their structures, the mechanism of the side chain degradation could be elucidated, however, the enzymes and the DNA sequences of the genes encoding them are still not known. To map the genes of these enzymes in the genome of the sterol degrading mycobacteria and to determine their structures, we believe that the method of insertional mutagenesis can be applied effectively. I describe my results in this field in the thesis.

Objectives:

1. Application of insertional mutagenesis to produce blocked sterol degradation pathway mutants of fast-growing mycobacteria to investigate the catabolism thereof.
 - a) Generation of insertional mutant libraries in sterol transforming *Mycobacterium* strains having industrial importance.
 - b) Development of a screening method to determine the sterol transforming capabilities of the strains of the mutant libraries.
2. Cloning of the 9 α -hydroxylase, which is an important enzyme from industrial point of view, using an insertional mutant blocked in the 9 α -hydroxylase activity.
 - a) Retrieval of the gene of 9 α -hydroxylase enzyme inactivated by insertional mutagenesis from the chromosomal DNA of its blocked mutant.

- b) Isolation and molecular characterization of the gene of the native 9 α -hydroxylase from the genomic library of the parent *Mycobacterium* strain.
3. Expression of recombinant 9 α -hydroxylase enzyme.
 - a) Homologous protein expression in *Mycobacterium phlei* having no 9 α -hydroxylase activity and producing 4-androstene-3,17-dione.
 - b) Expression of 9 α -hydroxylase enzyme in *E. coli*.

2. New scientific results

1. Applying pCG79 thermo-sensitive plasmid DNA containing Tn611, insertional mutant libraries were constructed in *Mycobacterium smegmatis* mc²155 and *Mycobacterium phlei* M51-Ept, which have industrial relevance in manufacturing steroid drugs. Both strains are able to metabolize sitosterol. *M. smegmatis* mc²155 degrades sitosterol completely without forming any intermediates, while the *M. phlei* M51-Ept forms 4-androstene-3,17-dione as a main product. Our goal was to produce insertional mutants blocked in their sterol transforming ability via introducing the transposon containing vector into sterol converting *Mycobacterium* strains. Having this kind of mutants, it is possible to investigate the genes involved in sterol catabolism.

Insertional mutant libraries of sterol-degrading *Mycobacterium* strains were constructed by introducing pCG79 containing Tn611 into the bacteria applying electroporation technique and chromosomal integration of the plasmid was achieved by raising the temperature from 30°C to 39°C. Southern blot hybridization was used to prove the fact of chromosomal integration and its random characteristic described by Guilhot and his coworkers, which is the prerequisite to find mutants blocked in sterol degradation pathway after screening a large number of strains.

2. A high throughput screening method was developed to allow the selection of strains that have altered sterol transforming ability. 10-10 thousand strains were grown in the wells of microtiter plates in the presence of sitosterol, and their sterol transforming abilities were examined with thin layer chromatography of the intermediates accumulated in these “mini” fermentors. The conversion medium was M-ADC-TW (Difco) broth complemented with 200 μ g/ml β -sitosterol, which contained the β -sitosterol in the form of a fine suspension that sedimented hardly.

3. Of approximately 10,000 insertional mutants in each library, 4 had altered sterol degrading ability compared to the parental strain (Table 1.).

<i>Mycobacterium</i> strains		Sitosterol degradation
Parent strains	Insertional mutants	Products
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	Control	No degradation product
	10A12	4-androstene-3,17-dione (II) 1,4-androstadiene-3,17-dione (III)
<i>M. phlei</i> . M51-Ept	Control	4-androstene-3,17-dione (II)
	3B7	22-hydroxy-23,24-dinor-4-cholene-3-one (VI) 3-oxo-23,24-dinor-4,17(20)-choladiene-22-oic acid methyl ester (VII) 3-oxo-23,24-dinor-4-cholene-22-oic acid methyl ester (VIII)
	5G4, 10G9	17 β -hydroxy-4-androstene-3-one (V) 4-androstene-3,17-dione (II)

Table 1. Side chain degradation products of insertional mutants of sitosterol-transforming *Mycobacterium* strains

The insertional mutant, 10A12, blocked in 9 α -hydroxylase activity and therefore producing 1,4-androstadiene-3,17-dione was isolated from the insertional mutant library of *Mycobacterium smegmatis* mc²155, which degrades sitosterol completely without forming any intermediates (Figure 1.).

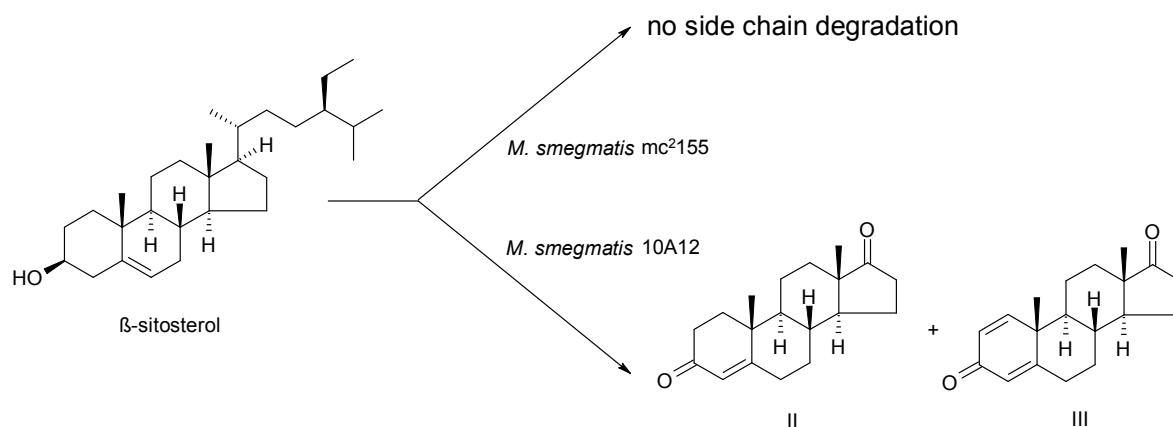


Figure 1. Inhibition of the steran skeleton degradation in 10A12 mutant of *Mycobacterium smegmatis* mc²155 strain by inactivating the DNA region encoding 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase enzyme.

The mutant *Mycobacterium phlei* 3B7 obtained from *Mycobacterium phlei* M51-Ept parent strain, which produces 4-androstene-3,17-dione, forms dinorcholane derivatives because of the lack of the late enzymatic steps of the side chain degradation (Figure 2.). The formed 3-oxo-23,24-dinor-4,17(20)-choladiene-22-oic acid methyl ester intermediate is a suitable starting material for the production of 17 α -hydroxy-4-pregnene-3,20-dione according to a new synthetic method developed at our institute. From 17 α -hydroxy-4-pregnene-3,20-dione, corticosteroids can be produced by the methods known in the art.

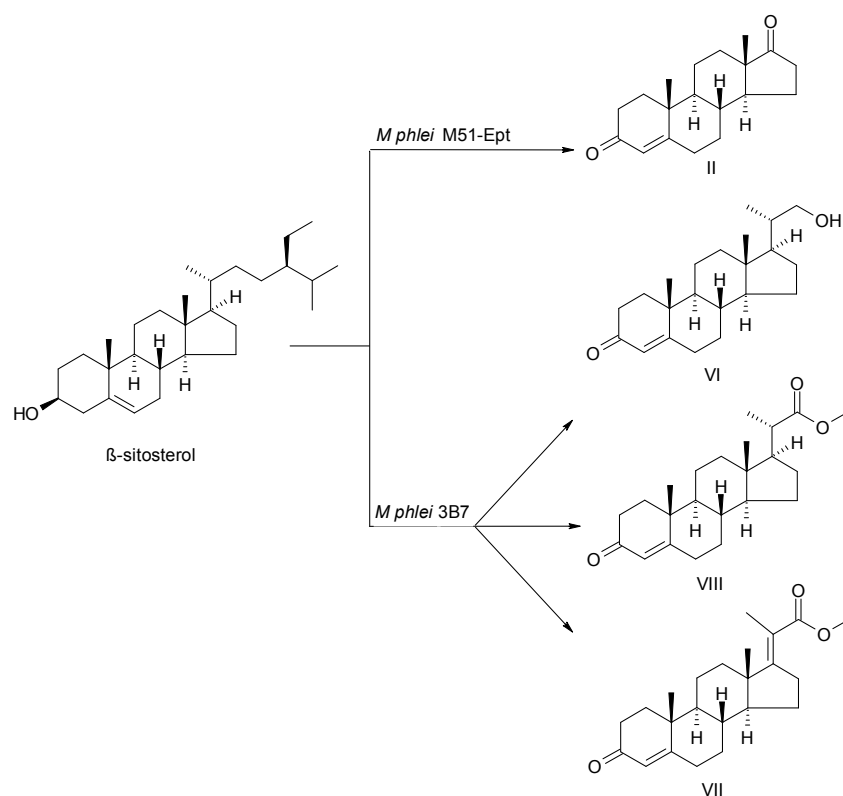


Figure 2. Alteration of the sitosterol transforming ability in *Mycobacterium phlei* due to transposon mutagenesis.

4. We were the first to isolate and characterise the terminal oxygenase component of *Mycobacterium smegmatis* 3-ketosteroid 9α -hydroxylase enzyme using *Mycobacterium smegmatis* 10A12 insertional mutant.

From the chromosomal DNA of 10A12 mutant, we isolated the pCG79 plasmid inserted into the 9α -hydroxylase gene with flanking chromosomal DNA sequences containing the parts of the 9α -hydroxylase gene on the two arms of the vector. The recombinant plasmid was designated pFJ92 and was mapped with restriction endonucleases (Figure 3.).

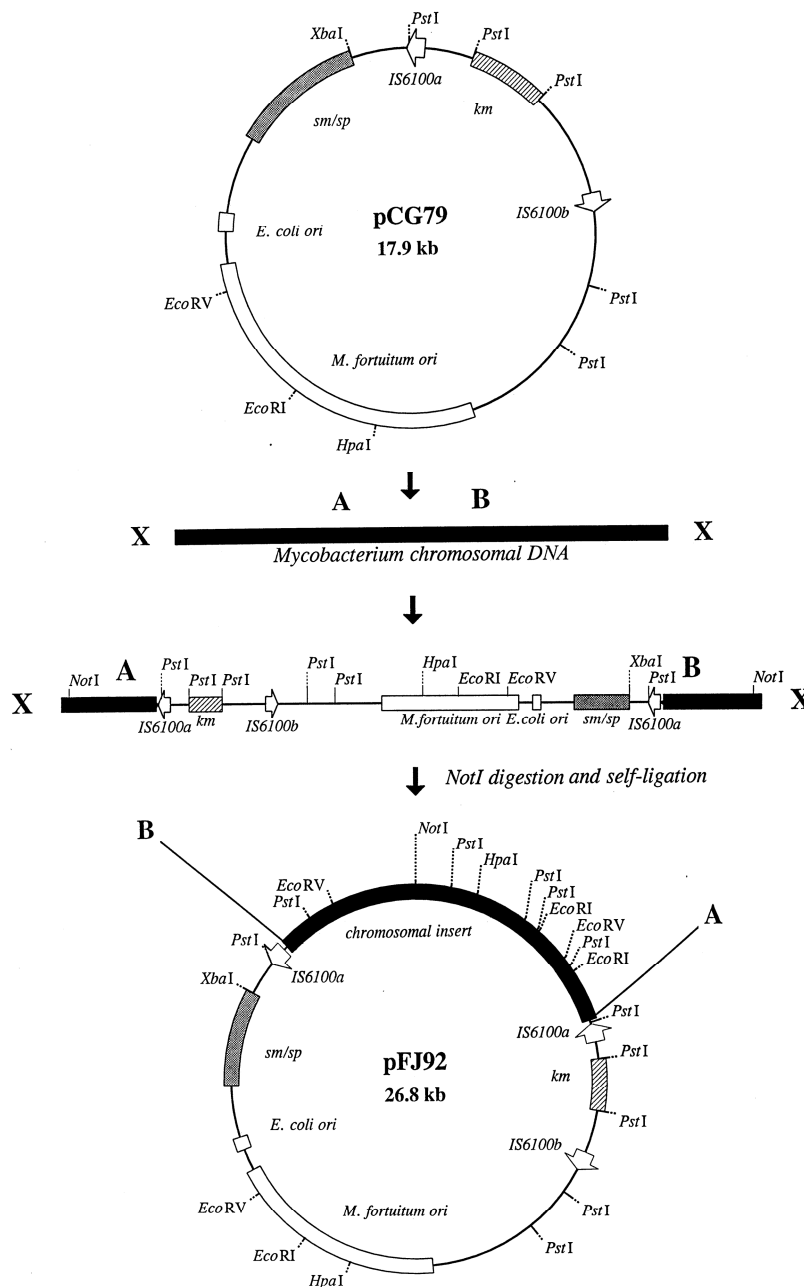


Figure 3. Replicative transposition of Tn611 from pCG79 (top) and recovery of pFJ92 from chromosome of *M. smegmatis* 10A12 (bottom) carrying the 9α -hydroxylase gene.

We isolated the intact *NotI* chromosomal fragment carrying the native 9 α -hydroxylase gene from the parent *M. smegmatis* mc²155 strain using two radiolabelled internal fragments of the *Mycobacterium* chromosomal region of pFJ92 as probes.

The *NotI* chromosomal fragment containing the 9 α -hydroxylase gene was inserted into pOLYG *Mycobacterium-E. coli* shuttle vector carrying hygromycin resistance gene. The resulting recombinant plasmid, pAA23, was introduced into the 10A12 insertional mutant, whereupon the metabolic block in 9 α -hydroxylation was complemented. In a further experiment, pAA23 was transformed into *Mycobacterium phlei*, which had no 9 α -hydroxylase activity before, with selection for hygromycin-resistant transformants. These were found to convert 4-androstene-3,17-dione into 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione. When 1,4-androstene-3,17-dione was added as substrate, 3-hydroxy-9,10-seco-1,3,5(10)-androstatriene-9,17-dione was produced via a 9 α -hydroxy-1,4-androstadiene-3,17-dione intermediate. These observations demonstrated the ability of the transformants to introduce a hydroxyl group at the 9 α -position of the steran skeleton.

With complementation experiments, the 9 α -hydroxylase activity could be localized within a 3 kb DNA region bounded by *EcoRI-EcoRV* restriction enzyme sites, thereafter the exact position of the integration site and the DNA sequence of ORF-1 were determined.

The identified 9 α -hydroxylase can be classified in the terminal oxygenases of the class IA of monooxygenases. In the protein sequence, the conserved Rieske [2Fe-2S]_R domain and a non-haem Fe(II) domain of the terminal oxygenases belonging to the class IA could be identified (Figure 4.).

	Rieske [2Fe-2S] domain		Non-haem Fe (II) domain								
	C	H	C	H	D/E	D	H	H			
M. s. 9 α -hydroxylaseA	63	AYCRHMGGDL	SKGTVKGD	KVACPFHD	WRWGGDG	95	171	I	D	NVTDMAHFFYIH	184
Rv 3526	65	GYCRHMGGDL	SEGTVKGDE	VACPFHD	WRWGGDG	97	173	I	D	NVTDMAHFFYIH	186
KshA	78	AYCRHMGGNLA	HGTVKGDSI	ACPFHD	WRWGGNG	110	186	V	D	NVVDMAHFFYVH	199

Figure 4. Identification of Rieske [2Fe-2S] domain and a non-haem Fe(II) domain in terminal oxygenase of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylases (DDBJ/EMBL/GeneBank accession number in bracket): M.s.9 α -hydroxylase A (DQ357196), terminal oxygenase component of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase in *M. smegmatis* mc²155; Rv 3526 (CAB05051), hypothetical terminal oxygenase component of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase in *M. tuberculosis* H37Rv; KshA (AY083508) terminal oxygenase component of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase in *Rhodococcus erythropolis* SQ1.

5. The terminal oxygenase component of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase was expressed in functionally active form in *E. coli* using the commercially available pET system. The target genes cloned in pET plasmids are under control of strong T7 bacteriophage transcription signal; expression is induced by providing source of T7 RNA polymerase in the host cell.

The terminal oxygenase component of the 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase enzyme was cloned in pET-28a(+) expression vector, then it was transformed into *E. coli* BL21- λ DE3 strain. A clone was selected from the strains expressing 9 α -hydroxylase enzyme, and was named pOX17. The *E. coli* BL21/pOX17 was cultured in LB medium complemented with 25 μ g/ml kanamycin at 37°C. When the optical density at 600 nm reached 0.5-1.0, 100 μ g/ml 4-androstene-3,17-dione as the substrate and 0.4 mM isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) for the induction of the *lac* promoter were added. After 24h of propagation, 9 α -hydroxylation of 4-androstene-3,17-dione could be detected in the fermentation broth by chromatographic analysis.

The protein expression was investigated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (Figure 5.). The cells from an aliquot of the culture were sonicated, and the inclusion bodies were separated by centrifugation. The supernatant contained the soluble forms of the proteins. The SDS-PAGE analysis of the protein extracts from the control and IPTG-induced, 9 α -hydroxylating *E. coli* BL21/pOX17 revealed a large quantity of the recombinant terminal oxygenase.

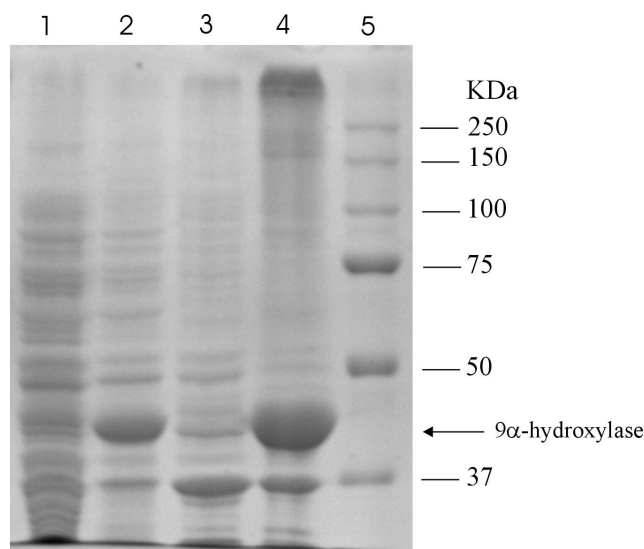


Figure 5. SDS-PAGE analysis of terminal oxygenase component of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase obtained from *M. smegmatis* mc²155 and expressed in *E. coli* BL21/pOX17.

Line 1: soluble fraction of lysate of non induced cells; line 2: soluble fraction of lysate of cells induced with 0,4 mM IPTG; line 3: insoluble fraction of lysate of non induced cells; line 4: insoluble fraction of lysate of cells induced with 0,4 mM IPTG; line 5: Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad), 250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa.

The recombinant protein appeared mostly as inclusion bodies; a minority was in soluble form (Figure 5.). Since *E. coli* BL21/pOX17 could carry out steroid transformation *in vivo* despite the lack of the cognate reductase component of the hydroxylase enzyme, it must have relied on one of the reductases of *E. coli*.

The heterologous expression of the terminal oxygenases of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase in the active form provided further evidence for the correct DNA sequence.

3. Industrial perspectives

Even more and more genome sequencing projects of either eukaryote or prokaryote organisms have been accomplished with the development of DNA sequencing technologies. From the genus of *Mycobacterium* the genome sequence of *M. tuberculosis* was published at first by Cole and his co-workers in 1998. The “four-letter code” of *Mycobacterium smegmatis* genome is already available. The sequence data however do provide information about the structures of the genes in the genome, but their functions remain unknown.

Microbiological degradation of sterols proceeds parallel on the steroid skeleton and on the side chain.

1. The sitosterol side chain degradation begins with terminal hydroxylation at the C-26 position and then the formed 26-hydroxyl group is converted into carboxylic acid that degrades further via the mechanism of β -oxidation that is characteristic of fatty acids. The side chain can be degraded only if the microorganism builds a carboxyl moiety at C-28 position on the ethyl substituent branching at C-24 of the side chain. The complete side chain degradation requires four repetitions of β -oxidation cycle after each other. If carboxylation on the C-28 carbon atom does not occur, the side chain degradation stops in the first β -oxidation cycle and a 24-oxo product having 27-norcholestane side chain is formed.
2. The 3 β -hydroxy-5,6-dehydro skeleton structure of sterols is converted to 3-oxo-4-ene at first and then the bacterium builds a hydroxyl moiety into 9 α -position and forms a double bond at C1-C2 by dehydrogenization. The 9 α -hydroxy-3-oxo-1,4-diene structure formed in this way is unstable and rearranges to 3-hydroxy-9,10-seco-1,3,5(10)-triene-9-one structure spontaneously that degrades further to carbon dioxide and water according to the known metabolic pathway.

Insertional mutagenesis with pCG79 carrying Tn611 combined with high-throughput screening for the bioconversion products of sitosterol accumulate in miniaturized cultures of the mutants is an efficient method to detect genes involved in sitosterol degradation and to

determine their exact positions in the genomes of fast-growing mycobacteria. The transposon-disrupted genes can be isolated easily and used for DNA manipulation. For example expression of the rate-limiting enzymes of sitosterol side chain cleavage can be enhanced in order to improve the side chain degradation power of industrially used *Mycobacterium* strains. We expect these to be important tools for strain improvement in these commercially important microorganisms.

4. A témához kapcsolódó publikációk

Folyóiratok

1. Andor, A., A. Jekkel, D. A. Hopwood, F. Jeanplong, É. Ilkőy, A. Kónya, I. Kurucz, G. Ambrus: Generation of useful insertionally blocked sterol degradation pathway mutants of fast-growing mycobacteria and cloning, characterization, and expression of the terminal oxygenase of the 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase in *Mycobacterium smegmatis* mc²155. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 6554-6559 (2006) IF: 3,686
2. Kónya, A., A. Andor, P. Sátorhelyi, K. Németh, I. Kurucz: Inhibition of the MDR1 transporter by new phenothiazine derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346**, 45-50 (2006) IF: 2,720

Szabadalom

3. Jekkel A., Hantos G., Duran, D. V., Tallos G., Lengyel L.-né, Láng T., Ambrus G., Albrecht K., Simonovits E., Szabó I. M., Féder M., Bartho I., Tömörkény E., Ilkőy É., Kováts S., Szabó A., Andor A., Moravcsik I., Szabó I., Szilágyi E., Vargáné B. I.: Eljárás szterin oldallánc lebontó új rekombináns *Mycobacterium* törzsek előállítására. 210486 sz. magyar szabadalom (1991)

Előadások nemzetközi kongresszusokon

4. Andor, A., A. Jekkel, D. A. Hopwood, F. Jeanplong, É. Ilkőy, A. Kónya, I. Kurucz, G. Ambrus: Molecular characterization of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase in *Mycobacterium smegmatis* mc²155. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **54**, 3 (2007) [15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, Lecture on the Congress.) (July 18-20, 2007)]
5. Andor, A., F. Jeanplong, É. Ilkőy, J. Müller, I. Láng, A. Jekkel: Transposon mutagenesis for cloning sterol modifying genes in fast growing mycobacteria. 8th European Congress on Biotechnology, Budapest, Lecture on the 8th Symposium of the Congress, Book of Abstracts p. 151. (August 17-21, 1997)

Előadások és poszterek

6. Andor Attila, Jekkel Antónia, David A. Hopwood, Ambrus Gábor: Új módszerek alkalmazása a szitoszterin mikobakteriumok által végzett lebontásában résztvevő enzimeket kódoló gének szerkezetének és genomban lévő helyének megismerésében. MTA Szteroidkémiai Munkabizottság Ülése (2008. november 27.)
7. Andor A., Jekkel A., Hopwood, D. A., Jeanplong F., Ilkőy É., Kónya A., Kurucz I., Ambrus G.: 3-ketoszteroid 9 α -hidroxiláz enzim klónozása, molekuláris jellemzése és expressziója *Mycobacterium smegmatis* mc²155-ben. MTA Biomérnöki Munkabizottság Ülése (2007. szeptember 26.)
8. Boros, S., G. Tóth, A. Andor, A. Kónya, É. Ilkőy, A. Tegdes: Structure elucidation of transformed steroids: 18th Valtice Meeting of the Central European NMR Discussion Groups, Valtice, Czech Republic (Apryl 28-30, 2003)
9. Andor A., Jekkel A., Kieser, T., Hopwood, D. A., Ambrus G.: A természetes szterinek biokonverziója mutáns és rekombináns *Mycobacterium* törzsekkel. MTA Általános Mikrobiológiai Bizottság Ülése (2000)
10. Andor A., Jekkel A., Jeanplong F., Ambrus G., Hopwood, D. A.: Transzpozon mutagenézis alkalmazása szterinek átalakításában szerepet játszó gének klónozására gyorsan növő mikobaktériumokban. IX. Fermentációs Kollokvium, Debrecen (2000. október 5-8)
11. Andor, A., F. Jeanplong, É. Ilkőy, J. Müller, I. Láng, A. Jekkel: Biotransformation of sterols: insertional mutagenesis for cloning sterol modifying genes in fast growing mycobacteria. 3rd International Symposium on Biocatalysis and Biotransformation, La Grande Motte, Book of Abstracts p. 3. (September 22-26, 1997)
12. Andor, A., F. Jeanplong, É. Ilkőy, J. Müller, I. Láng, A. Jekkel: Transposon mutagenesis for cloning sterol modifying genes in fast growing mycobacteria. 8th European Congress on Biotechnology, Budapest, Book of Abstracts p. 151. (August 17-21, 1997)
13. Andor A., Jekkel A., Ambrus G.: Molekuláris biológiai módszerek alkalmazása mikobaktériumok szterin-oldallánc lebontóképességének megváltoztatására. MTA Szteroidkémiai Munkabizottság Ülése, Szeged (1997. június 9.)
14. A. Andor, A. Jekkel, É. Ilkőy, J. Müller: Application of genetic and analytical tools for cloning of sterol modifying genes in fast growing mycobacteria. 6th Symposium on the Analysis of Steroids, Szeged, Abstracts p. 38. (October 7-9, 1996)
15. Láng, I., A. Andor, N. Makk, É. Ilkőy, A. Jekkel: Microbial Transformation of Sitosterol by Mutant *Mycobacterium* sp. strain. 12th Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, University of Horticulture and Food Industry (August 23-25, 1995)

16. Jekkel, A., G. Ambrus, É. Ilkőy, A. Andor, G. Horváth, Z. Böcskei: Microbial degradation of plant sterol side chains by a recombinant *Mycobacterium sp.* strain. 7th European Congress on Biotechnology, Nizza, (February 19-23, 1995)
17. Jekkel A., Láng I., Takács J., Andor A.: Új módszerek alkalmazása a szterinlebontó mikobaktériumok kutatásában. MTA Szteroidkémiai Munkabizottság Ülése, Szeged (1993. augusztus 16-18)
18. Andor, A., A. Jekkel, É. Ilkőy, G. Ambrus, G. Horváth: Microbial transformation of sitosterol by a mutant *Mycobacterium sp.* strain. XV Conference on Isoprenoids, Zakopane, Abstracts of Papers p. 74. (20-25 September, 1993)
19. Andor A., Tobias K., Jekkel A.: Kozmid génkönyvtárak előállítása gyorsan növő *Mycobacterium* törzsekből szterinátalakításban résztvevő enzimek expresszálása céljából. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Győr (1993. augusztus 16-18)
20. Jekkel A., Andor A., Ilkőy É., Horváth Gy., Ambrus G.: Növényi eredetű szterinek mikrobiológiai lebontása mutáns és rekombináns *Mycobacterium* törzsekkel. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Győr (1993. augusztus 16-18)