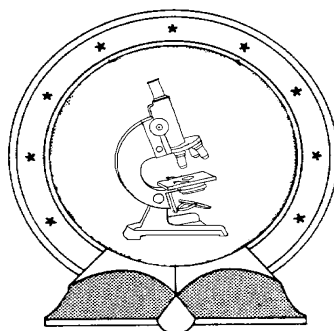


DE-TTK



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

Doktori (Ph.D.) értekezés

Andor Attila

Témavezető

Prof. Dr. Szentirmai Attila

Debreceni Egyetem
Természettudományi Doktori Tanács
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

2011

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Biológia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2011. október 3.

Andor Attila

Tanúsítom, hogy Andor Attila doktorjelölt 2009 - 2011 között a fent megnevezett Doktori Iskola Biológia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2011. október 3.

Prof. Dr. Szentirmai Attila

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

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a Biológia tudományágban

Írta: Andor Attila okleveles vegyészmérnök

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál doktori iskolája
(Biológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Szentirmai Attila

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr.....

tagok: Dr.....

Dr.....

A doktori szigorlat időpontja: 20.....

Az értekezés bírálói:

Dr.....

Dr.....

Dr.....

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.....

tagok: Dr.....

Dr.....

Dr.....

Dr.....

Az értekezés védésének időpontja: 20.....

TARTALOMJEGYZÉK

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	1
1 BEVEZETÉS.....	2
2 IRODALMI ELŐZMÉNYEK.....	5
2.1 Szteroid gyógyszerszintézisek kulcsintermedierjeinek előállítása szterinek oldalláncának mikrobiológiai lebontásával	5
2.2 Plazmidok és mozgékony genetikai elemek a mikobaktériumok genetikai tulajdonságainak felderítésében.....	11
2.2.1 Mikobaktériumokban előforduló plazmidok.....	12
2.2.2 pAL5000 plazmid replikációja.....	13
2.2.3 Mozgékony genetikai elemek jellemző tulajdonságai.....	16
2.2.4 Transzpozíciós elemek mikobaktériumokban.....	18
2.2.4.1 IS3 család tagjai.....	19
2.2.4.2 IS110 család tagjai.....	19
2.2.4.3 IS256 család tagjai.....	19
2.2.4.4 Egyéb IS elemek.....	19
2.2.5 Plazmidok és transzpozonok felhasználásával előállított molekuláris genetikai eszközök mikobaktériumokban.	20
2.2.5.1 Extrakromozómális vektorok	20
2.2.5.2 Transzpozon mutagenézis rendszerek	23
2.3 Szterinek mikrobiológiai lebontásában résztvevő, molekulárisan jellemzett enzimek.....	26
3 EREDMÉNYEK.....	29
3.1 Szterin lebomlási anyagcsereút gátlása transzpozon mutagenézis alkalmazásával.....	29
3.2 A 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz gén klónozása az enzim működésében gátolt Mycobacterium smegmatis 10A12 jelű blokkmutáns felhasználásával.....	33
3.3 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz enzim terminális oxigenáz komponensének expressziója E. coli-ban.....	43
3.4 Új tudományos eredmények	46
3.5 Következtetések és javaslatok	47
4 ANYAG ÉS MÓDSZER	49
4.1 Baktériumtörzsek, plazmidok és kozmid vektorok.....	49
4.2 Kromozómális DNS izolálása Mycobacterium smegmatis-ból	50
4.3 Mycobacterium inszerciós mutáns könyvtárak előállítása.....	51
4.4 Nagy-áteresztőképességű szűrőmódszer	51

4.5	Elektroporáció.....	52
4.6	Southern-blot hibridizáció	53
4.6.1	DNS kapilláris transzfer nejlon membránra.....	54
4.6.2	³² P izotóppal jelzett pCG79 plazmid hibridizációja a nejlon membránhoz rögzített DNS-hez.....	55
4.7	DNS könyvtárkészítés a <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155 törzsből.....	56
4.7.1	DNS molekulák méret szerinti elválasztása szacharóz gradiens centrifugálással	56
4.8	Telehibridizáció	57
4.8.1	Telepek lízise és a DNS membránhoz kötése	57
4.8.2	Hibridizáció a nejlon membránhoz rögzített telepek DNS-éhez.....	58
4.9	DNS jelölése ³² P-izotóppal random primerek alkalmazásával.....	60
4.10	DNS szekvenálás.....	60
4.11	Egyéb molekuláris biológiai módszerek	61
4.12	Vékonyrétegekromatográfiás analízis.....	61
4.13	HPLC analízis	61
4.14	Szitoszterin transzformációs termékek azonosítása	62
5	ÖSSZEFOGLALÁS, SUMMARY.....	65
5.1	Összefoglalás	65
5.2	Summary.....	69
	IRODALOMJEGYZÉK	73

Köszönetnyilvánítás

Értekezésem megírásához szükséges kísérletes munkát az IVAX Gyógyszerkutató Intézet Kft. Mikrobiológiai Osztályán majd a TEVA Gyógyszergyár Zrt. tulajdonába került Intézet Farmakológiai Osztályán végeztem.

Megköszönöm az Intézet akkori igazgatóinak, Dr. Bodor Miklós professzornak és Mihók Miklósné dr.-nak, hogy a kísérleti munkámat lehetővé tették és a laboratóriumi háttérrel biztosították számomra.

Köszönetel tartozom a Mikrobiológiai Osztály vezetőjének, néhai Jekkel Antalné dr.-nak, a biológiai tudományok kandidátusának, hogy tudományos pályámon elindított és kutatásaimat tanácsaival segítette.

Köszönetet mondok Dr. Ambrus Gábornak, a kémiai tudomány doktorának, hogy munkámat figyelemmel kísérte és tanácsaival támogatta. Köszönöm továbbá az értekezésem javító kritikái észrevételeit.

Köszönettel tartozom Sir David A. Hopwood professzornak, hogy a John Innes Institute (Norwich, Anglia) általa vezetett genetikai osztályán ösztöndíjasként megismerkedhettem a mikobaktériumok körében alkalmazott *in vitro* genetikai módszerekkel, továbbá a kísérleti eredményeim értelmezésében nyújtott hasznos tanácsaiért.

Köszönetet mondok témavezetőmnek, Prof. Dr. Szentirmai Attilának, a biológia tudomány doktorának, hogy a Gyógyszerkutató Intézetben az értekezés témakörében végzett kísérleti munkámat alkalmasnak találta a Ph.D. fokozat megszerzésére és szakmai tanácsaival segítette.

Köszönetet mondok Dr. Jeanplong Ferencnek a hibridizációs kísérletekben és a pFJ92 plazmid restrikciós térképének elkészítésében nyújtott segítségéért.

Megköszönöm Dr. Ilkőy Évának a szterinlebontási termékek izolálásában, Dr. Horváth Gyulának, a kémiai tudományok kandidátusának és Pallagi Istvánnak az izolált vegyületek szerkezetmeghatározásában, illetve Müller Józsefnek a HPLC-és mérésekben végzett munkáját.

Köszönöm csoportvezetőmnek, Dr. Kónya Attilának támogatását és közvetlen munkatársaimnak, kiemelten Pallos Györgynének és Csere Imrénének áldozatkész munkáját.

1 BEVEZETÉS

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 szójaból 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 vázbonlást 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 vázbonlást 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 -hidrooxi-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 anyagul 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 gégeiknek szerkezete még nem ismert. Ezen enzimek gégeinek 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 vizsgálatára.

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

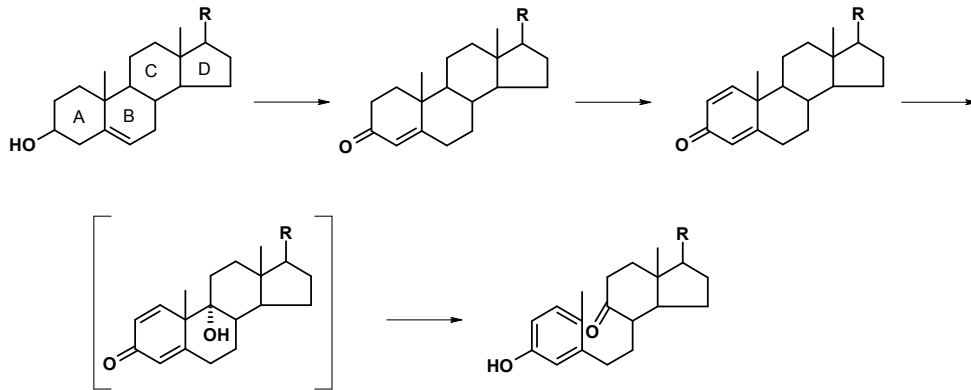
2 IRODALMI ELŐZMÉNYEK

2.1 **Szteroid gyógyszersizintézisek kulcsintermedierjeinek előállítása szterinek oldalláncának mikrobiológiai lebontásával**

Az 1950-es években egy Mexikóban honos dioscorea cserje (*Cabeza negra*) gyökeréből izolált szapogenin aglükonja, a dioszgenin vált a szteroid gyógyszerek ipari előállításának legfontosabb kiindulási anyagává. Magyarországon és más mérsékelt éghajlatú országokban termesztett *Solanum* fajokból (*Solanum laciniatum*, *Solanum aviculare*) izolálható, dioszgeninnel rokon szerkezetű szolaszodinból szintetizálták a szteroid gyógyszereket. Az 1960-as években a szteroid gyógyszerek termelése gyorsan növekedett világszerte, ezért a dioszgenin az 1970-es években egyre magasabb áron és csak korlátozott mennyiségben állt rendelkezésre. A szolaszodint bioszintetizáló *Solanum* fajok nemesítésével sem sikerült a szolaszodin-termelést a kívánatos mértékben fokozni. Ezért a szterinek, először az állati eredetű koleszterin, majd az olcsóbb növényi eredetű forrásokból, előnyösen szójaolajból izolált szitoszterin alapanyagként való hasznosítása került előtérbe.

Ahhoz, hogy a szterinek a szteroid gyógyszersizintézisek kiindulási anyagaként hasznosíthatók legyenek, el kellett távolítani az oldalláncukat a szteránvázról. N. L. Söhngen 1913-ban megfigyelte, hogy mikobaktériumok képesek növekedni az egyedüli szénforrásként koleszterint tartalmazó táptalajon¹. T. C. Stadtman és munkatársai 1953-ban C¹⁴ izotóppal a 4-es illetve a 8-as szénatomon jelzett koleszterint mikobaktériummal fermentálva azt tapasztalták, hogy az teljesen lebomlik szén-dioxiddá és vízzé, az oldallánc négyszer gyorsabban, mint a szteránváz². K. Schubert és munkatársai mikobaktériumoknál³, R. M. Dodson és R. D. Muir pszeudomonasoknál⁴ 1961-ben meghatározták a szteránváz lebomlásának első lépéseit, melyek eredményeként a B-gyűrű felhasad. A baktériumok a szterinek A- és B- gyűrűire jellemző 3 β -hidroxi-5-én-szerkezetet a hidroxil-csoport oxidálásával és kettőskötés izomerizálásával 3-oxo-4-én-szerkezetűvé alakítják, majd kettőskötést képeznek az 1-es és 2-es szénatomok között, és a 9-es szénatomon α -helyzetben hidroxil-csoportot építenek be. Az így létrejövő 9 α -hidroxi-3-oxo-1,4-dién szerkezetű termék nem stabil és spontán átrendeződik a B-gyűrű 9-es és 10-es szénatomok közötti felhasadásával és az A-gyűrű aromatizációjával 3-hidroxi-9,10-szeko-1,3,5(10)-trién-9-on

szerkezetű szteroid származékká. A szteránváz felhasadásához vezető átalakulásokat az 1. ábra szemlélteti.



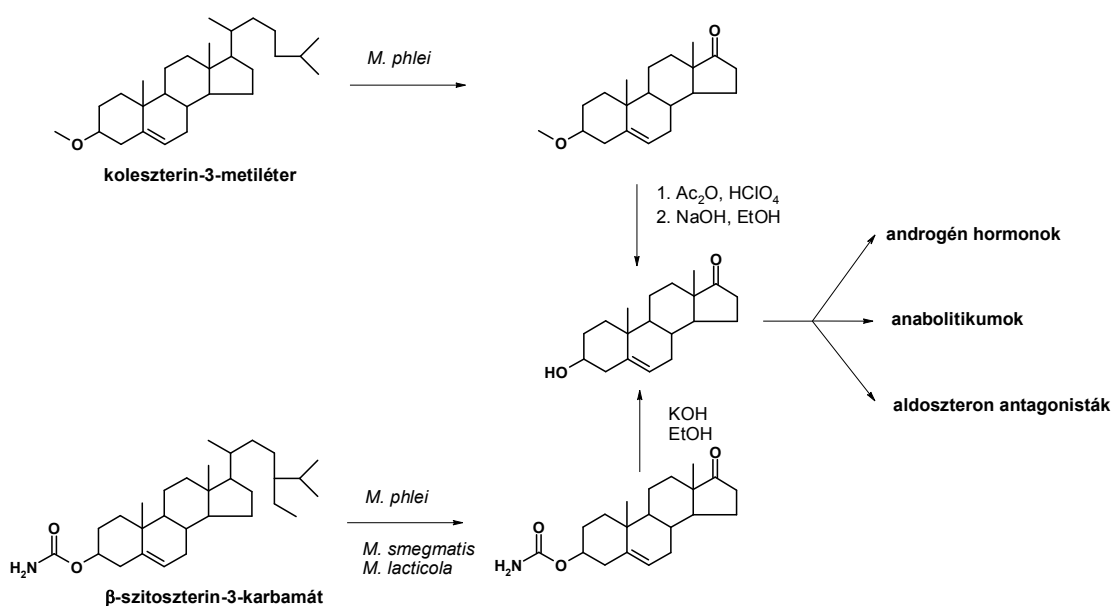
1. ábra. A szteránváz felhasadása mikrobiológiai úton

A B-gyűrű felhasadásához vezető reakciók valamelyikét kellett megakadályozni ahhoz, hogy elejét vegyék a szteránváz lebomlásának. Először a 9α -hidroxiláz enzim működését sikerült meggátolni Nagasawa-nak és munkatársainak a Noda Intézetben, Japánban⁵ és Wix Györgynek és munkatársainak a budapesti Gyógyszerkutató Intézetben^{6,7} Fe^{2+} ionokkal komplexet képző α, α' -dipiridilt, illetve 8-hidroxi-kinolint adagolva a szterinlebontó baktérium tenyészetéhez, és így koleszterinből és szitoszterinből 1,4-androsztadién-3,17-dion képződött, amelyet az ösztron-szintézis kulcsintermedierjeként alkalmaznak a gyógyszeriparban⁸.

E munkákkal egyidőben A. Wettstein és munkatársai dehidroepi-androszteronból kiinduló 19-norszteroid szintézisét⁹ követve C. J. Sih és munkatársai koleszterinből $6\beta, 19$ -oxido-4-kolesztén-3-on-t és 19-hidroxi-4-kolesztén-3-on-t állítottak elő, majd e vegyületek szterin-oldalláncát *Nocardia restrictus*-szal lebontották. A $6\beta, 19$ -oxido-4-kolesztén-3-on-ból $6\beta, 19$ -oxido-4-androsztén-3,17-dion keletkezett, mivel a 6-os és a 19-es szénatomok közötti oxigénhid szterikususan megakadályozta a kettőskötés kialakulását az 1-es és 2-es szénatomok között, és így a szteránváz lebomlását is¹⁰. Ezzel koleszterinből is lehetővé vált a $6\beta, 19$ -oxido-4-androsztén-3,17-dion intermedier felhasználásával a 19-nor-szteroidok, így a noretiszteron és más rokonszerkezetű ösztronváz-as fogamzásgátlók szintézise. A 19-hidroxi-4-kolesztén-3-on-ból pedig ösztront állítottak elő a koleszterin-oldallánc lebontásával és a szteránváz A-gyűrűjének aromatizációjával. A Gyógyszerkutató Intézetben a mikobaktériumokkal végzett szterin-oldallánc lebontási kutatások során *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium smegmatis* és *Mycobacterium lacticola* törzsekkel állítottak elő $6\beta, 19$ -oxido-

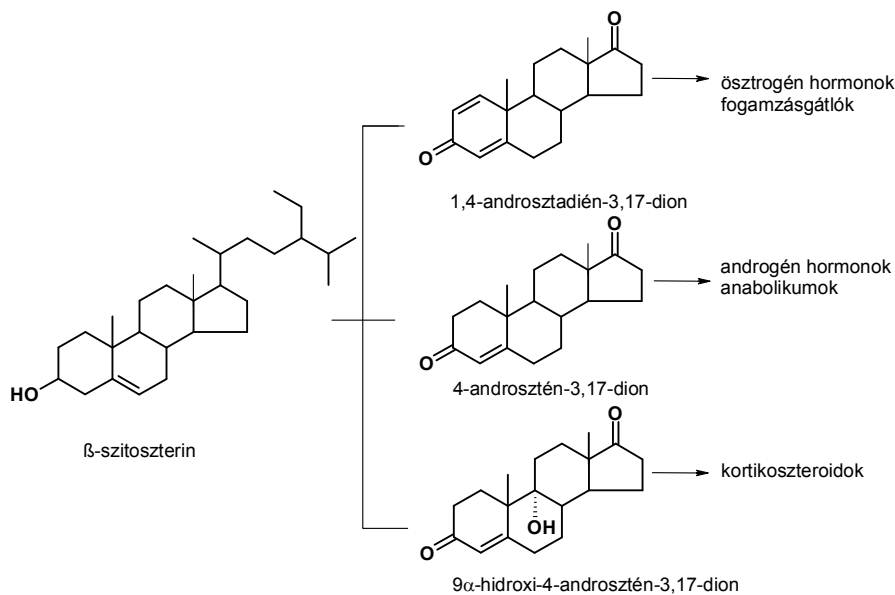
koleszt-4-én-3-on-ból 6 β ,19-oxido-androszt-4-én-3-on-t a 19-nor-szteroidok előállítására irányuló kutatások részeként¹¹.

A koleszterin és a szitoszterin oldalláncának szelektív lebontását a Gyógyszerkutató Intézet kutatócsoportjának azáltal is sikerült elérni, hogy a szteránváz lebomlását már megindulásánál megakadályozták olyan módon, hogy a 3 β -hidroxil-csoportot metil-, illetve rövid szénláncú alkil-éter védőcsoporttal látták el, ezzel blokkolva a ketonná alakulását, ami a szteránváz lebomlásának első lépése. Az oldallánc lebontása után az alkil-éter védőcsoportot eltávolítva dehidroepiandrosteronhoz, az androgén hormonok, anabolitikumok és az aldosteron antagonistá spironolakton szintézisének kiindulási anyagához jutottak.^{12,13} Később egy másik, koleszterinből és szitoszterinből kiinduló dehidroepiandrosteron előállítást is kidolgoztak. Abból a tapasztalatból indultak ki, hogy *Streptomyces tenebrarius* a tobramicint egy származékának, a 6''-*O*-karbamoil-tobramicinnek a formájában bioszintetizálja, és ebből lúgos hidrolízissel állítják elő az antibiotikumot. A karbamoil-csoport kis térkitöltésű, így várható volt, hogy a szterin-oldalláncot lebontó enzimek a szterinek 3 β -karbamoil-oxi-származékát szubsztrátumként elfogadják. A koleszterin és a szitoszterin-3-karbamát származékait a *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium smegmatis* és a *Mycobacterium lacticola* 3 β -karbamoiloxi-5-androsztén-17-on-ná bontotta le, és ebből lúgos hidrolízissel jutottak a dehidroepiandrosteronhoz¹⁴. A dehidroepiandrosteron előállítását szterinekből a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra: Dehidroepiandrosteron előállítása szterin-származékok mikrobiológiai oldallánc lebontásával

Az 1970-es években a Searle és az Upjohn gyógyszergyárak kutatói olyan szterin-oldallánc lebontási eljárásokat fejlesztettek ki genetikailag módosított örökítő anyagú szterinhasználó mikobaktériumokat alkalmazva, amelyekben mutagén kezeléssel, UV besugárzással, illetve *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidines kezeléssel működésképtelenné tették a szteránváz lebontását kiváltó enzimeket. Előállítottak 9α -hidroxilezésre nem képes *Mycobacterium phlei* mutánst¹⁵, amellyel 1,4-androsztadién-3,17-dion és 1-es és 2-es szénatomok közötti dehidrogénezésre nem képes *Mycobacterium fortuitum* mutáns törzset¹⁶, amivel 9α -hidroxi-4-androsztén-3,17-dion és e két enzimfunkció mindegyikét elvesztett *Mycobacterium phlei* kettős mutánst¹⁷, amellyel 4-androsztén-3,17-dion állítható elő szitoszterinből. Az így kapott kulcsintermedierekből a szteroid hormonok és gyógyszerek széles választéka szintetizálható, mint azt a 3. ábra mutatja.



3. ábra Szitoszterinből nyert szteroid gyógyszerszintézis kulcsintermedierek

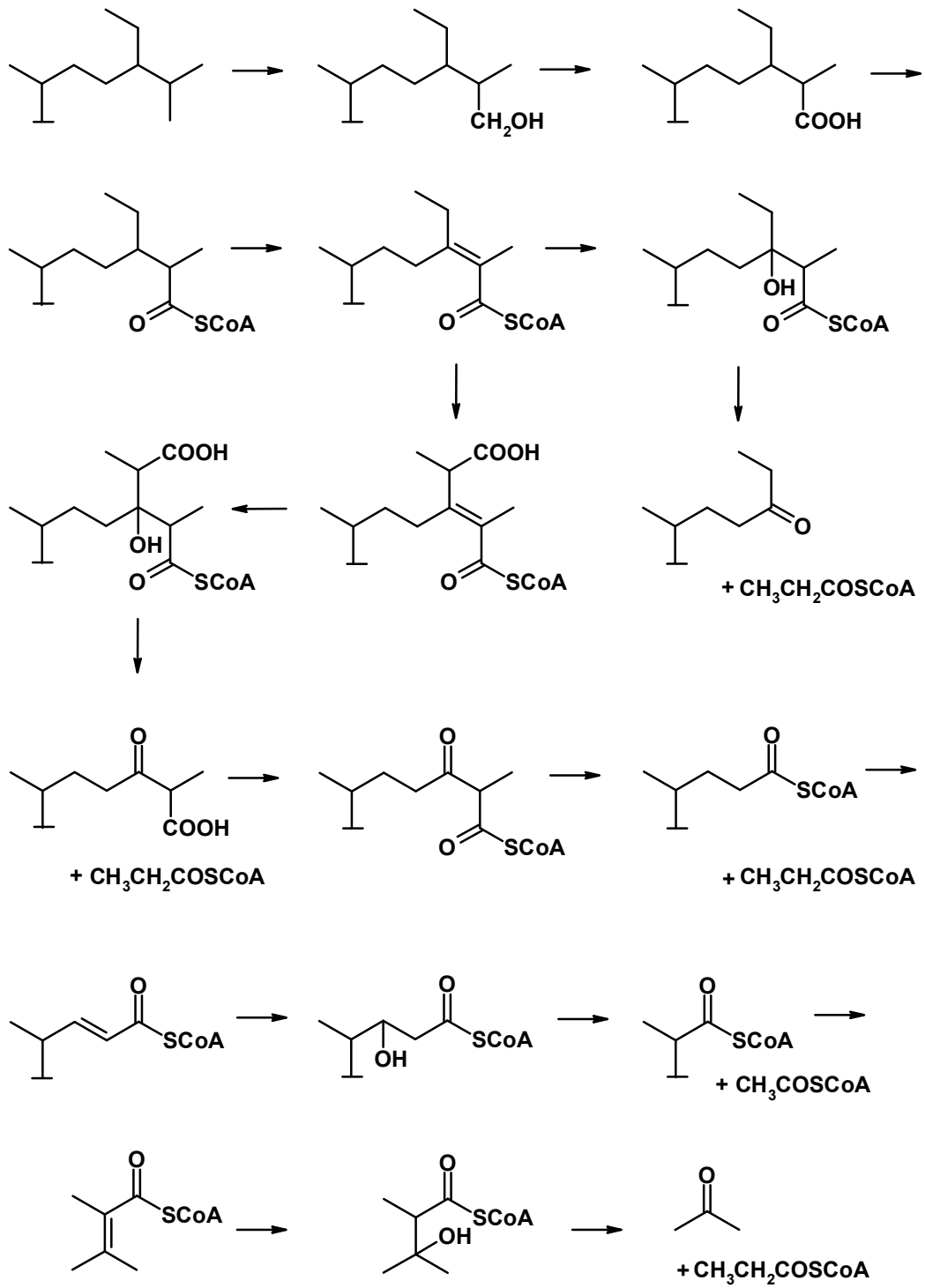
Az 1,4-androsztadién-3,17-diont az ösztránvázas gyógyszerek, a 4-androsztén-3,17-diont az androsztánvázas gyógyszerek szintéziseinek kiindulási anyagául már korábban is alkalmazták. A 9α -hidroxi-4-androsztén-3,17-dion a kortikoszteroidok szintézisének nagyon előnyös kiindulási anyagának bizonyult, mert 9α -hidroxil-csoportjának klórszulfonsavas kihalásával létrejövő 4,9(11)-androsztadién-3,17-dionból lehetővé vált a gyógyászatilag értékes kortikoszteroidokra jellemző 11β -hidroxil-csoport egyszerű, szintetikus kémiai

kialakítása, így a 17-es ketocsoportból kiindulva nagyon jó hozamú kortikoszteroid-oldallánc szintézist fejlesztettek ki az Upjohn gyógyszergyár kutatói¹⁸.

A szitoszterin-oldallánc lebomlási anyagcsereútját a koleszterin-oldallánc lebomlási mechanizmusának vizsgálatában¹⁹ is meghatározó szerepet játszó C. J. Sih és munkatársai derítették fel^{20,21}, de egyes részletek tisztázásában kutatócsoportunk is közreműködött. Egyik kollégánk Szelezky Zoltán Sih professzor laboratóriumában a Wisconsini Egyetemen ösztöndíjasként részt vett e munkában. Az 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 karboxil-csoportot kell beépítsen az oldallánc 24-es szénatomjáról leágazó etilszubsztituensén lévő 28-as szénatomra. Az oldallánc lebontása során a β -oxidációs folyamat egymás után négyszer megy végbe és ennek során az első két ciklusban két propionil-koenzim A, a harmadik ciklusban egy acetyl-koenzim A, végül a negyedik ciklusban ismét egy propionil-koenzim A képződik az oldalláncból. 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-norkolesztán-oldalláncú termék keletkezik²². A szitoszterin oldalláncának mikrobiológiai lebomlási anyagcsereútját a 4. ábra szemlélteti.

Kutatócsoportunk a szitoszterin mikobaktériumokkal végzett oldallánc-lebontása mellett a sztigmaszterin és az ergoszterin oldalláncának lebontását is tanulmányozta. E munkák során röntgendiffrakciós vizsgálatokkal megállapították, hogy az oldallánc lebontás első lépésében az oxigénnek a 26-os szénatomra való beépülésekor a szomszédos 25-ös szénatomon R-konfigurációjú királis centrum alakul ki a szitoszterin és sztigmaszterin esetében, míg az ergoszterin oldalláncának lebontásakor S-konfigurációjú királis centrum jön létre a 25-ös szénatomon^{23,24}.

A Gyógyszerkutató Intézetben a genetikailag módosított mikobaktériumokkal végzett szitoszterin-oldallánc lebontási kísérletek Szentirmai Attila professzor vezetésével indultak meg az 1970-es években, majd az 1980-as évek második felétől Jekkel Antalné dr. kutatócsoportja folytatta ezt a munkát. Az intézeti kutatócsoport éveken át a Richter Gyár biotechnológiai részlegével és üzemével együttműködve végezte a kutató-fejlesztő munkát.



4. ábra A szitoszterin oldalláncának mikrobiológiai lebomlása

Ennek során az 1,4-andosztadién-3,17-dion²⁵, a 9 α -hidrooxi-4-androsztén-3,17-dion^{26,27} és a 4-androsztén-3,17-dion²⁸ szteroid gyógyszerszintézis kulcsintermedierjeinek előállítására egyaránt sikerült eljárást kifejleszteni. A 4-androsztén-3,17-dion és a 9 α -hidroxi-4-androsztén-3,17-dion előállítási eljárását ipari méretben is kidolgozták. A 4-androsztén-3,17-dion gyártása pedig már több mint két évtizede nagy volumenben folyik a Richter Gedeon RT-ben.

E kutatási és fejlesztési munkák során klasszikus mutációs módszerekkel és szferoplaszt-fúzióval kivitelezett *in vivo* genetikai rekombinációs technika alkalmazásával előállított mikobaktérium törzsekkel kutatócsoportunk 23 részlegesen lebontott oldalláncú terméket izolált²⁹. Ezek közül 5 bizonyult új vegyületnek. E termékek részben a szitoszterin-oldallánc lebontás intermedierjei, részben pedig ezekből képződő metabolitok. E termékek közül a 9 α -hidroxi-3-oxo-23,24-dinor-4,17(20)-koladién-22-sav látszott ipari szempontból hasznosíthatónak. Ebből kiindulva kutatócsoportunk két új szintetikus eljárást fejlesztett ki kortikoszteroid hormonok és gyógyszerek szintézise számára kiindulási anyagként szolgáló pregnánvázas szintézis-intermedierek, a 4,9(11),16-pregnatrién-3,20-dion, az 1,4,9(11),16-pregnatetraén-3,20-dion³⁰ és a 17 α -hidroxi-4,9(11),16-pregnadién-3,20-dion^{31,32} előállítására.

Az *in vitro* genetikai rekombináns rendszerek kidolgozása mikobaktériumoknál az 1980-as évek végén kezdődött el³³. A kutatásokat az ösztönözte, hogy a mikobaktériumok okozzák a két legnagyobb halálozással járó bakteriális fertőzést a világon, a tuberkulózist és a leprát, valamint számos állati megbetegedést is.

2.2 Plazmidok és mozgékony genetikai elemek a mikobaktériumok genetikai tulajdonságainak felderítésében

A plazmidok és a transzpozonok értékes eszközei a baktériumok genetika analízisének és módosításának. Tulajdonságaik tanulmányozása információt szolgáltat alapvető biológiai folyamatok, mint például a DNS-replikáció, a génátvitel, a kromoszóma átrendeződés és a mutáció megismeréséhez.

A mikobaktériumok által okozott megbetegedéseknek az 1980-as években tapasztalt növekvő száma indította el a molekuláris genetikai eszközök, elsősorban a plazmid vektorok és a transzpozonok alkalmazását a baktériumok patogén tulajdonságainak felderítésére.

2.2.1 Mikobaktériumokban előforduló plazmidok

A plazmidok természetesen léteznek a baktériumsejtekben és genetikai tulajdonságaik bonyolult kapcsolatokon keresztül függenek a gazdasejtől. Tudni szeretnénk, hogy a plazmidok milyen hatással vannak a gazdaszervezetre, milyen fenotipikus tulajdonságokkal ruházzák fel azokat, illetve mi a jelentőségük a genetikai információ horizontális átadásában. A viszonylag egyszerűen izolálható plazmid DNS működésének tanulmányozásával megismerhetjük a gazdasejt működésének egyes biológiai folyamatait, mint például a génexpresszió szabályozását.

Plazmidok a két nagy mikobakteriális humán patogén, a *Mycobacterium leprae* és a *M. tuberculosis* klinikai izolátumaiban nem fordulnak elő, viszont elterjedtek más mikobaktériumokban, mind a gyorsan, mind pedig a lassan növényő fajok körében. Bár a patogén *M. tuberculosis*-ban nem találtak plazmidot, viszont más fajokból származó plazmidokkal transzformálható, ami azt mutatja, hogy a törzs képes a plazmid replikációját támogatni, bár a természetes izolátumaiban nincs jelen plazmid.

Egy fakultatív patogén faj, a *M. fortuitum* komplex egyes törzseiben akár ötféle, egymás mellett replikálódó plazmid is lehet³⁴. Méretüket illetően e plazmidok nagy változatosságot mutatnak (4,8 kb-320 kb), szerkezetük alapján két nagy csoportra oszthatók, kovalensen zárt cirkuláris, vagy lineáris molekulák.

Plazmidok előfordulását leginkább a *M. avium-intracellulare* komplex (MAI), illetőleg *M. fortuitum* komplex törzsei esetében vizsgálták. Az elsőként izolált plazmidokról készült elektronmikroszkópos felvételekből kitűnt, hogy cirkuláris DNS-molekulákról van szó^{34,35}. MAI komplexben található kisméretű (<30 kb), illetve igen nagy plazmidok (>150 kb) is. A MAI komplexbe tartozó kisméretű plazmidok két csoportja különböztethető meg aszerint, hogy a *M. avium*-ból korábban izolált pLR7, vagy a pVT2 cirkuláris plazmiddal hibridizálnak. Jelentős méretbeli különbség tapasztalható a pLR7 csoportba tartozó plazmidok között (15 kb-30 kb), míg a pVT2 csoport plazmidjai jellemzően konzerváltak és csak 12.9, 13,5, ill. 15.3 kb méretben fordulnak elő³⁶.

Egy másik jelentős plazmid a Labidi és munkatársai által leírt *M. fortuitum*-ból származó pAL5000, ez a legkisebb és legjobban jellemzett mikobakteriális plazmid^{34,37}, melyet kiterjedten használnak klónozó vektorok kifejlesztésére.

Picardeau és Vincent lineáris plazmidokat azonosított 11 törzsben, melyek az egymáshoz közelálló *M. celatum*, *M. xenopi* és *M. branderi* fajokba tartoznak. Mind a 11 törzs 1-2 lineáris plazmidot tartalmazott, melyek mérete 20 kb-tól 320 kb-ig változott. A

plazmidok lineáris szerkezetét exonukleáz degradációval, topoizomeráz relaxációval és elektroforetikus mobilitásuk alapján állapították meg. Az izolált 14 plazmidot öt csoportba lehetett sorolni hibridizációs sajátásaik alapján. A vizsgált törzsek között nem volt egyetlen olyan sem, amely ugyanazon csoportba tartozó két plazmidot hordozott volna, ami inkompatibilitási mechanizmus jelenlétére utal³⁸.

Nagyon kevés fenotípusos tulajdonság kódolt plazmid DNS-en mikobaktériumok körében. Ez részben annak tulajdonítható, hogy ezen plazmidok extrém módon stabilak saját gazdatörzseikben. Ennek következtében a plazmidokon kódolt funkciók nehezen választhatók szét a kromoszómán lévőkötől. Másrészt pedig ez a terület még kevésbé tanulmányozott. Mindemellett néhány tulajdonság összefüggésbe hozható plazmid jelenlétével, bár nem mutatták ki bizonyosan, hogy a vizsgált funkciók plazmid DNS-en kódoltak. Például egy *M. avium*-ban lévő restriktív modifikációs rendszerről leírták, hogy plazmid jelenlétéhez kötött. A termelt restriktív enzim a *XhoI* izoschizomerje³⁵. *M. scrofulaceum* higany és réz rezisztenciájáról (Hg^R , Cu^R) feltételezik, hogy plazmidon kódolt, mivel a Hg^R és Cu^R törzsek azon leszármazottjai, melyek elvesztettek egy 170 kb nagyságú plazmidot, érzékennyé váltak higannyal és rézzel szemben^{39,40}.

2.2.2 pAL5000 plazmid replikációja

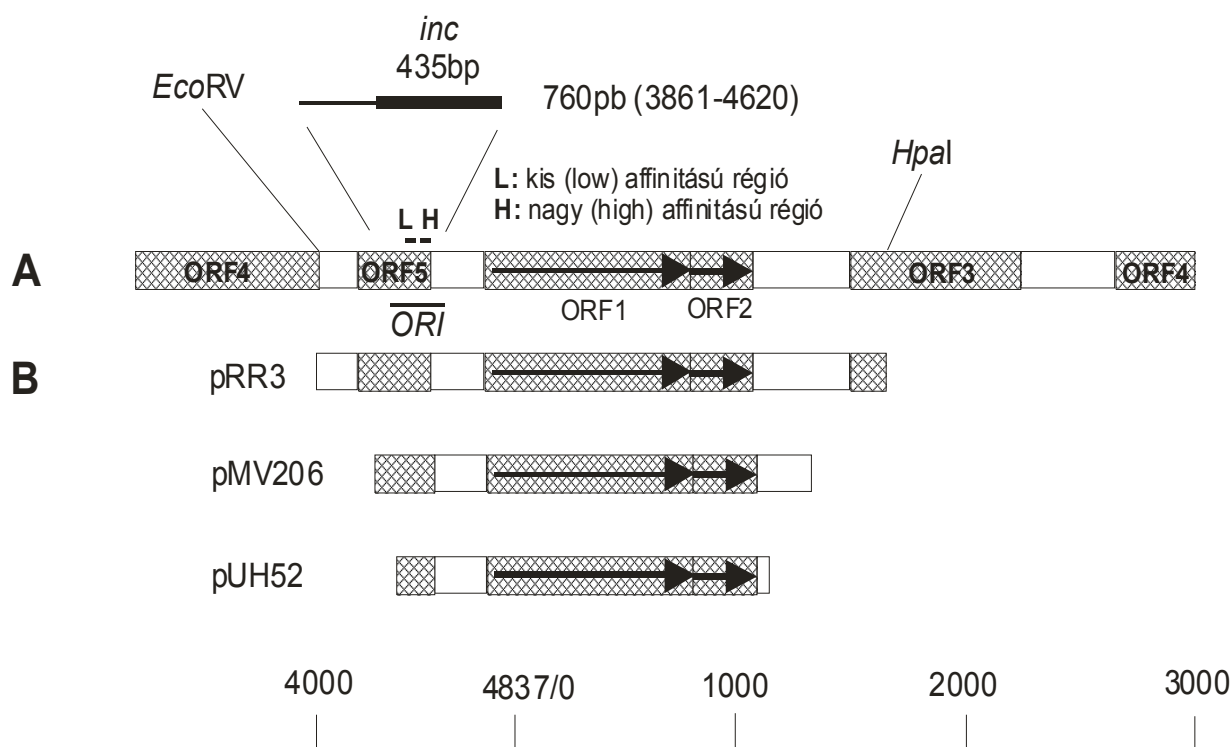
A *Mycobacterium* plazmidok replikációjáról kevés információ áll rendelkezésre. Legismertebb a genetikai manipulációkhoz elterjedten használt a *Mycobacterium fortuitum* pAL5000 plazmid replikációjáért felelős régiója, de tanulmányozták még a pLR7 család három plazmidját: a pLR7-et⁴¹, a pMSC262-t⁴², és a pJAZ38-at⁴³ is ebből a szempontból. A pAL5000 plazmid számos *Mycobacterium* fajban, például *M. smegmatis*-ban, *M. tuberculosis* komplex törzseiben, valamint *M. avium*-ban képes replikálódni^{41,44}, és sejtenkénti kópiaszáma legfeljebb öt⁴⁵. A plazmid 4837 bp hosszúságú szekvenciáját Rauzier és munkatársai publikálták 1988-ban⁴⁶. A megállapított DNS szekvencián öt ORF-et, ORF-1-ORF-5 azonosítottak, illetve valószínűsítették a replikációs origó helyét.

A plazmid replikációs mechanizmusának felderítésével foglalkozó első munkák a replikációhoz szükséges minimális régió megállapítására irányultak. Inszerciós mutagenézis és szubklónozás segítségével fokozatosan csökkentették a replikációhoz szükséges szekvenciát, behatárolva a replikációban érintett géneket és a replikációs origó helyét. Raney és munkatársai a pAL5000 plazmid 2.58 kb hosszúságú, *HpaI-EcoRV* fragmentumját

klónozva állított elő egy „mini” *E. coli-Mycobacterium* ingázó vektort (pRR3)⁴⁵, mely az ORF-1, -2, -5-öt tartalmazta. Stover és munkatársai a pAL5000 plazmid kisebb fragmentumját felhasználva - mely ugyancsak az ORF-1, -2-öt, de az ORF-5-nek csak egy részét tartalmazta - hozta létre a pMV206 jelű plazmidot, mely szintén autonóm módon replikálódott *E. coli*-ban és *Mycobacterium*-ban egyaránt (5. ábra)⁴⁷. E tanulmányok rámutattak az ORF-1 és/vagy az ORF-2 replikációban való szerepére. Ezen gének deléciók mutagenézissel való inaktíválása pedig világossá tette, hogy mindkét ORF szükséges a pAL5000 replikációjához. Az ORF-1 által kódolt feltételezett replikációs fehérjét *repA*-nak, illetve az ORF-2 által meghatározottat *repB*-nek nevezték el.

A pAL5000 plazmid replikációjához szükséges régiót tovább szűkítette Stolt és Stoker⁴⁸ egy 1605 bp hosszúságú DNS szakaszra, amelyet a pUH52 plazmid tartalmazott (pUH52: pAL5000 plazmid 4325-1093 közötti régiója (Rauzier és munkatársai által publikált DNS szekvencián⁴⁶) a pUC18 plazmidban klónozva). Megállapították, hogy a *repA* és *repB* fehérjék *transz*-aktivitásuk (távolra ható aktivitásuk) révén akkor is képesek a replikációs origót aktiválni, ha szintézisük ugyanazon gazdasejtben lévő, másik plazmidon kódolt. A replikációhoz elengedhetetlen, magán a plazmidon kódolt, *cis*-aktivitású (közelre ható aktivitású) elemek pedig egy 760 bp fragmentumon helyezkednek el. (a 3861 és 4620 pozíció közötti szakasz, Rauzier és munkatársai által publikált DNS szekvencián⁴⁶). Ez utóbbi szakaszon a szerzők definiáltak egy 435 bp nagyságú úgynevezett „*inc*” szakaszt, melyen több ismétlődő, azonos és fordított irányultságú szekvencia található, és ami tartalmazza a replikációs origót, illetve felelős a plazmid inkompatibilitási tulajdonságaiért (5. ábra).

A *repA* replikációban betöltött szerepe kevésbé ismert, viszont az *E. coli* ColE2 plazmid család replikációs fehérjéivel mutatott rokonsága megerősíti a replikációban betöltött szerepét. A *repB* fehérje C-terminális végén Rauzier és munkatársai „helix-turn-helix” szerkezetet azonosítottak, ami jellemző a DNS-hez kötődő fehérjékre, továbbá megállapították, hogy az ORF-1 és az ORF-2 átfednek egy nukleotiddal és így valószínűleg egy operont képeznek⁴⁶.



5. ábra A pAL5000 plazmid replikációjához szükséges minimális DNS régió azonosítása. A) A pAL5000 plazmid lineáris ábrázolása az ORF-ek és a replikációs origó feltüntetésével (A plazmid ebben a formában került klónozásra a pYUB12 vektorban). A nyilak a replikációban érintett ORF-ek transzkripciójának az irányát jelölik. B) A pAL5000 plazmidból származó funkcionális replikonok felhasználásával készített ingázó vektorok.

Stolt és Stoker⁴⁹ megállapította, hogy a két replikációs proteint kódoló ORF-1 és ORF-2 átírásakor egyetlen RNS molekula keletkezik, melyet jellemeztek és meghatározták az 5'-végének szerkezetét. Megállapították, hogy a *repB* fehérje a replikációs origó környezetében két helyhez kötődik: egy nagy affinitású (H) helyhez, mely a saját promóter szakaszán belül helyezkedik el, és ezzel önmaga expresszióját szabályozza, illetve egy kis affinitású (L) helyhez, tőle 5' („upstream”) irányban, mely feltételezhetően maga a replikációs origó. A termelődött fehérje először a nagy affinitású helyhez, azaz saját promóteréhez kötődik, majd ezáltal jelentősen lecsökken képződése. Ekkor az alap expresszió révén termelődő új *repB* fehérje a kis affinitású régióhoz, azaz replikációs origóhoz kötődik és a *repA* fehérjével együtt kiváltja a plazmid replikációját. A *repA* szerepe a replikációs mechanizmusban még nem tisztázott. A szintetizálódott plazmidon szabad állapotban lévő nagy affinitású promóter régió ismét erőteljes *repB* fehérjeszintézist indít (5. ábra). Ilyen módon egy egyensúly áll be a transzkripció leállítása és a replikáció beindulása között. A *repB* fehérje kettős funkciója - miszerint autorepresszor és iniciátor szerepet is betölt - jellemzően előfordul más plazmidok replikációjában érintett fehérjék esetében is⁴⁹.

2.2.3 Mozgékony genetikai elemek jellemző tulajdonságai

A transzpozonok mozgékony genetikai elemek, melyek képesek áthelyeződni egyik genomiális helyről egy másikra. A transzpozon szekvencián kódolt az ugráshoz szükséges funkcionalitás, amihez nem szükséges a transzpozon és target DNS molekula homológiája. Létezésüket Barbara McClintock fedezte fel először 1950-ben a kukoricaszemek színváltozását tanulmányozva⁵⁰. Azonban a színváltozást előidéző DNS szekvencia jelentőségét nem ismerte fel és csak passzív, vagy más néven „junk” DNS-ként azonosította. Napjaink kutatási eredményei viszont rávilágítottak arra, hogy a transzpozonok mobilitásuk révén befolyásolják egyes gének expressziós szintjét, illetve hozzájárulnak a genom változékonyságához és evolúciójához. A mozgékony genetikai elemek egyetemlegesen jelen vannak az élővilágban; éppúgy megtalálhatók a baktériumokban, mint az emlősökben, azonban az eukariótákban gyakrabban fordulnak elő. A humán genom például nagy számban (45%) tartalmaz mozgékony genetikai elemeket, azonban ezeknek csak egy része mutat transzpozíciós aktivitást.

Baktériumok esetében a transzpozonokat széles körben alkalmazzák random inszerció kiváltására teljes genomanalízis, illetve egyedi gének szerveződésének vizsgálata céljából. A transzpozonok térnyerése a baktériumok genetikai tulajdonságainak vizsgálatában a klasszikus mutagén ágensekkel szemben elsősorban annak köszönhető, hogy a genomba történő beépülésük révén nemcsak egyszerű mutációkat okoznak, hanem genetikai markerek - pl. antibiotikum rezisztencia bevitele révén - meg is jelölik az inaktivált géneket, ami megkönnyíti a mutánsok további vizsgálatát. A transzpozon antibiotikum rezisztenciájára szelektálva lehetővé válik a mutagenizált génszakasz izolálása és klónozása további genetikai vizsgálatokhoz. Ezenkívül a transzpozonok genomiális integrációjának pontos helye DNS-DNS hibridizációval felderíthető, ami információt ad a transzpozon által kettészakított gének kromoszómán való elhelyezkedéséről.

Mozgékony genetikai elemekre épül számos modern, genomanalízist segítő módszer. „Signature-tagged mutagenesis” (STM), illetve „genetic footprinting” technikát alkalmazva sikerült patogén mikroorganizmusok fertőzőképességért felelős génjeit azonosítani. A „Scanning linker mutagenesis” (SLM) módszerével pedig fehérjék szerkezet-funkció összefüggéseit vizsgálják. E módszer során rövid peptideket építenek a célfehérjékbe random

módon úgy, hogy a fehérjét kódoló génbe transzpozont inszertálnak és annak pontatlan kivágódását idézik elő.

A baktériumokban előforduló mozgékony genetikai elemek szerkezetüket tekintve lehetnek egyszerű inszerciós szekvenciák (IS), amik a transzpozícióért felelős génből és az azt határoló fordítottan ismétlődő szekvenciákból [„inverted repeat” (IR)] állnak, illetve összetettek, melyeket transzpozonoknak hívunk. A transzpozonok egy pár inszerciós szekvenciát tartalmaznak, melyek közrefognak egy további genetikai információért felelős DNS szakaszt -, például antibiotikum rezisztenciát kódolnak. A legbonyolultabb felépítésűek az úgynevezett konjugatív transzpozonok, melyek a transzpozonok, a plazmidok és a bakteriofágok tulajdonságait ötvözik magukban.

A bakteriális IS elemek és transzpozonok áthelyeződése kétféle mechanizmus szerint történhet. A konzervatív áthelyeződés során a mozgékony elem az eredeti helyéről kivágódik és egy új helyre kerül, miközben a genomban az elemek száma nem változik. A replikatív áthelyeződés során viszont a mozgékony elemnek egy új példánya keletkezik az új inszerció helyén, miközben az elem az eredeti helyén is megmarad, és ezzel az elemek száma növekszik.

A transzpozíció során az IS szekvenciák általában megkétszerezik a cél-DNS egy rövid szakaszát (2-14 bp) és a képződő azonos irányultságú ismétlődő szakaszok [„direct repeat” (DR)] a transzpozon oldalaira kerülnek.

Az eukarióta mozgékony genetikai elemeket transzpozíciójuk mechanizmusa szerint csoportosítva lehetnek DNS-ként áthelyeződő transzpozonok, ahová az eddig tárgyalt mozgó elemek is tartoznak, illetve retrotranszpozonok, melyek RNS intermedieren keresztül kerülnek egyik genomiális helyről a másikra. A retrotranszpozonok a retrovírusokkal mutatnak szerkezeti rokonságot. Eukariótákban ezek a gyakoribbak.

Napjainkban a genomszekvenciák rohamosan növekvő számával egyre bizonyosabbá vált a transzpozonok szerepe a genom evolúciójában és fenotipikus tulajdonságaik megjelenésében. Mint alakítható, hatékony genetikai eszközök, jelentőségük fokozódott a genetikai anyag szerkezet-funkció összefüggéseinek felderítésében.

2.2.4 Transzpozíciós elemek mikobaktériumokban

Az első mikobakteriális inszerciós szekvenciát (IS) az 1980-as évek közepén fedezték fel, amikor elkezdődött a molekuláris biológiai eszközök mikobaktériumokra való alkalmazása⁵¹. A repetitív elemek utáni kutatás kombinálva antibiotikum rezisztenciagénekkel végzett hibridizációs vizsgálatokkal, továbbá teljes genomok szekvenálása nagyszámú IS elem felfedezéséhez vezetett. Többségüket már az izolálásukkal egyidőben sikerült azonosítani más ismert mozgékony elemmel mutatott szekvencia-homológia alapján. Transzpozíciós aktivitást csak az IS6100, IS6110, IS6120, IS900, IS1096, IS1110 esetében mutattak ki. Ezen elemek nagysága 880 bp-től 2260 bp-ig terjed, és kópiaszámuk a genomban 1-20 között változik.

Az izolált IS elemek többsége mind szerkezetében, mind pedig DNS-szekvenciájában hasonlóságot mutat más baktériumokban talált elemekkel. A molekulárisan jellemzett transzpozonok alapvetően három családba sorolhatók: IS3, IS110, IS256. Annak ellenére, hogy e családok tagjait egymástól távoli rokonságban álló *Mycobacterium* fajokból izolálták, az egyes IS elemek gazdaspecifitása igen szűk és gyakran csak egyetlen fajban található. Ez azt mutatja, hogy ezen elemek horizontális transzfer révén ritkán kerülnek át egyik fajról a másikra.

M. tuberculosis H37Rv genomszekvenciáját Cole és munkatársai 1998-ban közzölték⁵². Ez betekintést enged a transzpozonok és „transzpozonszerű” elemek kromoszómán való elhelyezkedésére. Gordon és munkatársai a *M. tuberculosis* genomot tanulmányozva 56 lokuszról számolt be, melyek 30 különböző IS elemet tartalmaznak⁵³. A sikeresen befejeződött genomprojektek révén napjainkra már 12 *Mycobacterium* faj szekvenciája készült el. A szekvenált törzsek többsége a *M. tuberculosis* komplexbe tartozik, de rendelkezésre áll a *M. leprae* és a nem patogén *M. smegmatis* genomszekvenciája is. A szekvencia adatokat tanulmányozva például kiderült, hogy a *M. tuberculosis* komplex törzseiben előforduló IS6110 áthelyeződő genetikai elem kópiaszámában és elhelyezkedésében nagy polimorfizmust mutat, melynek révén markerként használható epidemiológiai vizsgálatokban. Az IS6110 nemcsak passzív, vagyis „junk” DNS, hanem transzpozíciós aktivitása olyan genotipikus variabilitást eredményez, amely törzsre jellemző fenotípusos változásokat is előidéz. Az IS6110 okozta variabilitás pedig hozzájárul a *M. tuberculosis* evolúciójához⁵⁴.

2.2.4.1 IS3 család tagjai

Az IS3 család tagjai közül elsőként 3 elemet izoláltak *Mycobacterium*-ból: az IS6110-et (más néven IS986, vagy IS987), az IS1137-et, az IS1141-et^{55,56,57}. Besorolásuk a szélső, fordítottan ismétlődő [„inverted repeat” (IR)] szekvenciájuk hasonlóságán, két ORF (ORF-A és ORF-B) jelenlétén, és az ORF-B által kódolt fehérjék aminosavsorrendjének hasonlóságán alapul. Az ORF-B homológiát mutat a retrovírus integrázokkal is^{58,59}.

2.2.4.2 IS110 család tagjai

Négy inszerciós szekvenciát azonosítottak mikobaktériumokban, melyek az IS110 családba tartoznak: az IS900-et, az IS901-et, az IS902-et és az IS1110-et^{60,61,62,63}. A *M. avium*-ból izolált IS901 majdnem azonos a *M. paratuberculosis*-ból származó IS902-vel (98%-ot meghaladó a DNS-szekvenciákban talált azonosság⁶²). E családba tartozó IS elemek 1451-1472 bp hosszúságúak és transzpozáz enzimük nagymértékben hasonlít a *Streptomyces clavuligerus*-ból származó IS116-hoz, valamint csekélyebb mértékben a *Streptomyces* spp.-ből származó IS110-hez ill. IS117-hez^{61,63}. Ezek a fehérjéken két, nagymértékben konzervált mintázatú fehérjeszekvencia azonosítható, amelyek szintén megtalálhatók a DNS inverziójáért felelős fehérjéken *Moraxella bovis*-ban⁶³.

Az IS900, az IS901, az IS1110, és az IS116 tulajdonságai a prokarióta inszerciós elemekre jellemzőktől jelentősen eltérnek. Nem tartalmazznak szélső, fordítottan ismétlődő (IR) szekvenciát és nem kettőzik meg a cél-DNS szekvenciáját a transzpozíció alatt.

2.2.4.3 IS256 család tagjai

Ebbe a családba tartozik a mikobakteriális inszerciós elemek több mint 25%-a, melyeket a távoli rokonságban álló *Mycobacterium* fajokból, *M. tuberculosis* komplex, *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. xenopi*, *M. gordonae* fajokból izoláltak. A családon belül található az IS6120 és IS1081 alosztály, melyek szerkezeti felépítésükben („direct repeat” (DR) és „inverted repeat” (IR) szekvenciák száma és elhelyezkedése alapján) és transzpozáz enzimjük szerkezetében különböznek^{64,65}.

2.2.4.4 Egyéb IS elemek

Számos *Mycobacterium*-ból izolált transzpozon, vagy inszerciós elem ismert, melyek nem tartoznak egyik családba sem. Ezek közül két inszerciós elem, az IS6100 és az IS1096 kitüntetett figyelmet kapott, mert ezeket használták fel transzpozon mutagenézis rendszer kifejlesztésére *Mycobacterium*-ban.

Az IS6100-at először *M. fortuitum* FC1 jelű törzséből izolálták, egy összetett transzpozonnak, a Tn610-nek részeként, melyben az IS6100 két kópiája ellentétes irányultsággal kapcsolódik a szulfonamid rezisztenciagénhez⁶⁶. Az IS6100 az IS6 család tagjaival mutat rokonságot és hozzájuk hasonlóan transzpozíciója replikatív mechanizmusú és az inszerciónak nincs helyspecifikációja.

A másik inszerció elem, melyet mutációk kialakítására használtak mikobaktériumokban, a *M. smegmatis* mc²155-ből izolált IS1096. Az IS1096 szekvenciájában talált két ORF, az ORF-A és az ORF-R hasonlóságot mutat a Tn3926 transzpozáz, ill. a Tn1000 és a Tn552 rezolváz enzimjével⁶⁷.

2.2.5 Plazmidok és transzpozonok felhasználásával előállított molekuláris genetikai eszközök mikobaktériumokban.

A természetesen előforduló plazmidoknak, mobilis genetikai elemeknek, ill. bakteriofágoknak számos, genetikailag módosított változatát állították elő abból a célból, hogy hatékony klónozó vektorokat és mutagenézis indukálására alkalmas rendszereket állítsanak elő.

2.2.5.1 Extrakromoszómális vektorok

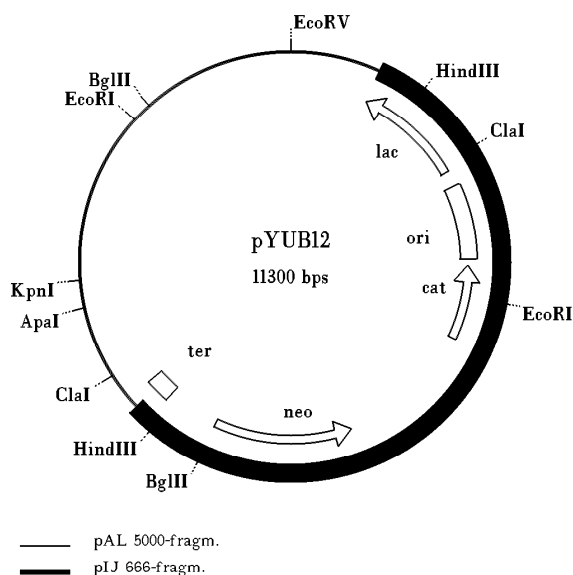
A legtöbb extrakromoszómális klónozó vektor *M. fortuitum*-ból izolált pAL5000 plazmidból származik, amely képes mind a gyorsan, mind pedig a lassan növekvő *Mycobacterium* fajokban replikálódni, és a citoplazmában 3-5 kópiában van jelen. Ingázó vektorokat állítottak elő, melyek hordozzák a pAL5000 replikont, ill. valamely *E. coli* replikont, továbbá szelekciós markereket. Ezek a vektorok kényelmes lehetőséget biztosítanak a DNS-molekulák módosítására *E. coli*-ban és lehetővé teszik a klónozott gének *Mycobacterium*-ban való kifejezését. Az így előállított klónozó vektorokat kiterjedten használják homológ és heterológ gének expressziójára, promóter aktivitás, ill. fehérje lokalizáció vizsgálatára egyaránt.

Az első ingázó vektorok egyikét, a 6. ábrán látható pYUB12 *Mycobacterium-E. coli* vektort kutatócsoportunkból Jekkel Antónia állította elő a John Innes kutatási központban, ösztöndíjas tanulmányútján Norwich-ban, 1988-ban^{68,69}. E munka során a funkcionális *Mycobacterium* replikon biztosítása céljából a pAL5000 plazmidba random módon inszertálták a pIJ666 jelű *E. coli* plazmidot⁷⁰, amely tartalmazta a Tn5 transzpozonból származó *neo* gént⁷¹ és a pACY184 plazmidból nyert P15A replikációs origót valamint a

kloramfenikol-acetiltransferáz gén⁷². Az előállított pIJ666::pAL5000 hibrid plazmidokból álló DNS-könyvtárát elektroporációs módszerrel juttatták *M. smegmatis*-ba. A transzformációs hatékonyság 1-10 kanamicin rezisztens transzformáns/ μg DNS könyvtár volt hat független kísérletben. A szelektált transzformánsok kloramfenikollal szemben is rezisztensek voltak, ami azt mutatja, hogy a kloramfenikol-acetiltransferáz gén is expresszáldott.

Snapper és munkatársai olyan plazmiddal hatékonyan transzformálható fenotípusú mutánsokat állítottak elő *M. smegmatis*-ból, amelyek transzformációs hatékonysága 4-5 nagyságrenddel megnőtt a vad típusú törzshöz képest. A mutánsokat *M. smegmatis* pYUB12-vel kis hatékonysággal transzformált törzseiből állították elő a bejuttatott plazmid „kikúrálásával” (spontán plazmidvesztés előidézése antibiotikum nélküli táptalajon való növesztéssel)⁷³.

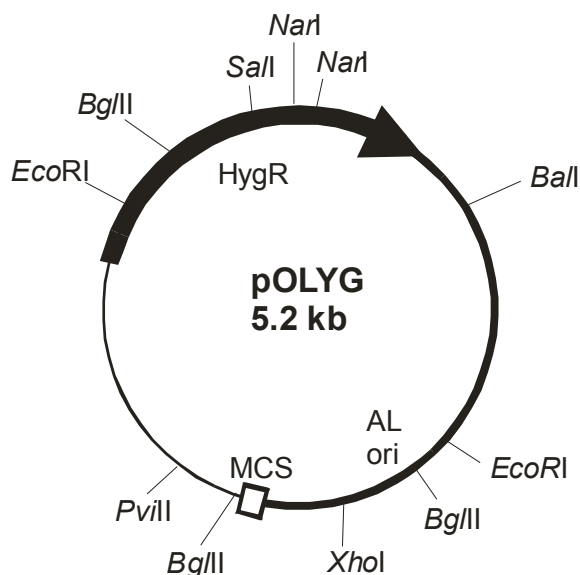
A λ bakteriofág *cos* szekvenciájának a pYUB12 plazmid vektorba való inszertálásával Jacobs és munkatársai (1991) előállították a pYUB18 jelű *E. coli*-*Mycobacterium* „shuttle” kozmid vektort⁷⁴. A nagy, mintegy 35-40 kb hosszúságú DNS fragmentumok klónozását lehetővé tevő kozmid vektor előnyösen használható *Mycobacterium* génbankok készítésénél, mert már 500 független klón 99%-ban reprezentálja a *Mycobacterium* genomot.



6. ábra pYUB12 *Mycobacterium*-*E. coli* ingázó vektor restriktációs térképe

Philipp és munkatársai (1996) a pYUB18 kozmidban elkészítette a *M. tuberculosis* H37Rv génkönyvtárát, melyet a *M. tuberculosis* genom fizikai térképezésére használtak⁷⁵. Az értekezés témakörében végzett kísérletes munkánkhoz mi is a pYUB18 kozmid vektort használtuk a *M. smegmatis* mc²155 törzs genomiális génkönyvtárának elkészítéséhez a 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz enzim génjének izolálása céljából.

E. coli-*Mycobacterium* ingázó vektorokban jellemzően kanamicin rezisztencia gént alkalmaznak *Mycobacterium*-ban történő szelekcióhoz. Emellett elterjedt a higromicin rezisztencia marker is, mely lehetővé teszi a kanamicinre nem érzékeny *Mycobacterium w* és *Mycobacterium vaccae* törzsek transzformációját, illetve előnyös a kanamicin rezisztenciára már szelektált törzsek további transzformálásánál. Garbe és munkatársai létrehozták a higromicin rezisztencia markert hordozó p16R1 ingázó vektort, mely hatékonyabbnak bizonyult *Mycobacterium smegmatis* és *Mycobacterium bovis* transzformációjában, mint a kanamicin rezisztencia gén⁷⁶. A plazmidot felhasználva sikerrel expresszálták a *Mycobacterium tuberculosis*-ból származó szuperoxid dizmutáz gént *Mycobacterium vaccae* törzsben. Gaora és munkatársai a p16R1 vektor *KpnI* helyére inszertálva a pBluescript SK II(+) multi-klónozó helyét (MCS) létrehozták a pOLYG vektort⁷⁷, melyet mi is használtunk a kanamicinre rezisztens inszerciós mutánsok transzformálásánál a komplementációs kísérletekben (7. ábra).



7. ábra Higromicin rezisztencia markert hordozó pOLYG jelű, *E. coli*-*Mycobacterium* ingázó vektor restriktációs térképe

Heterológ gének expressziójára alkalmas gazda-vektor rendszerek kialakítása lehetőséget teremtett a mikobakteriumok patogenitásának, illetve alapvető biokémiai sajátosságainak molekuláris biológiai megismerése felé.

A pAL5000 eredetű replikonra épülő vektorokat felhasználva számos vírus⁷⁸, parazita⁷⁹, illetve bakteriális⁸⁰ patogénből izolált antigént klónoztak. A fehérjék citoplazmában kiválasztódó, szekretálódó, vagy membránhoz kötött formában fejeződtek ki a tuberkulózis elleni védőoltásra használt *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) törzsben, amely a marhákban tuberkulózist okozó *M. bovis*-nak gyengített változata.

Guilhot és munkatársai a pAL5000 replikon hőérzékeny származékait állították elő⁸¹. A hőérzékeny replikont hordozó vektorok feltételesen replikálódnak: alkalmas körülmények között (30°C) replikációra képesek, de gyorsan eliminálódnak *M. smegmatis*-ból, amikor a hőmérséklet 39°C-ra emelkedik. Ezek a vektorok hasznos eszközöknek bizonyultak transzpozon mutagenézis megvalósításában *M. smegmatis*-ban⁸², ellenben csak részleges hőérzékenységet mutatnak *M. tuberculosis* komplex törzseiben⁸³.

Ismeretesek az irodalomban egyéb klónozó vektorok, mint a *M. scrofulaceum*-ból izolált pSMC262⁸⁴, a *M. avium* pLR7 plazmid⁴¹, illetve az *M. fortuitum* pJAZ38 plazmid⁴³ különböző származékai.

2.2.5.2 Transzpozon mutagenézis rendszerek

Transzpozon mutagenézis megvalósítására alkalmas molekuláris rendszer alapvetően két fő komponensből áll, melynek egyik eleme az inszerciós szekvencia, a másik része pedig az ezt szállító vektor. Az inszerciós elemnek detektálható (előnyösen nagy) transzpozíziós gyakorisággal kell rendelkeznie, hiányoznia kell a recipiens *Mycobacterium* törzsből és random módon, a kromoszóma tetszőleges helyére kell integrálódnia. A mutagenizálandó baktérium törzstől függően több inszerciós elem is alkalmas lehet transzpozon mutagenézis rendszer kifejlesztésére. Elsősorban három inszerciós szekvencia, az IS6100, az IS1096, és az IS6120 alkalmas a *M. tuberculosis* komplexbe tartozó törzsek mutagenézisére. A *M. smegmatis* inszerciós mutánsainak előállítására az IS6100 és az IS6110 használható. Az említett elemek mindegyike alkalmas mutáció előidézésére *M. avium*-ban és *M. paratuberculosis*-ban is.

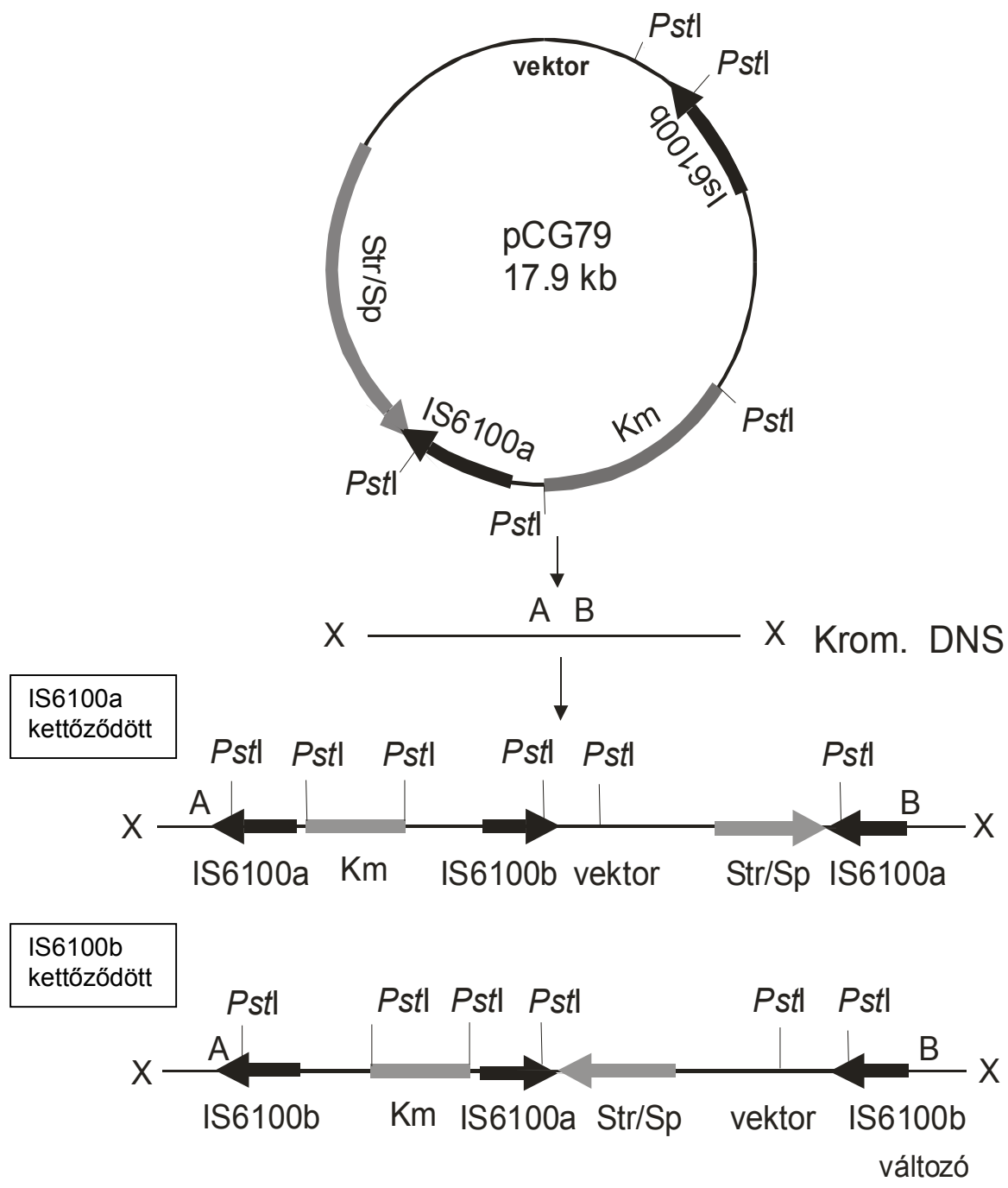
McAdam és munkatársai Az IS1096 transzpozon *M. bovis*-ba⁸⁵, illetve Martin és munkatársai az IS6100⁶⁶, England és munkatársai az IS900⁸⁶, és Fomokung és munkatársai az IS6110⁸⁷ *M. smegmatis*-ba juttatásához „öngyilkos” plazmidokat használtak, melyek a

célorganizmust csak transzformálni képesek, de abban replikálódni nem tudnak. Azonban az alacsony elektroporációs hatékonyság és a ritka transzpozíciós esemény miatt egy kísérletben 100-nál több mutáns hoz nem lehetett jutni sem a *M. bovis*-ban, sem pedig a *M. smegmatis*-ban.

Az alacsony transzformációs frekvenciából adódó hátrányok kiküszöbölhetőek kondicionálisan replikálódó plazmidok alkalmazásával. Ezeket a vektorokat először a replikációjukra alkalmas körülmények között szaporítják a mutagenizálandó törzsben, majd a szaporítási körülmények megváltoztatásával megakadályozzák a vektor további replikációját a gazdasejtben, ami különféle integrációs eseményekhez vezet a populáció egyedeinél. Így függetlenül a transzformációs frekvenciától az inszerciós mutánsok széles választéka állítható elő egyetlen transzformánsból is.

Ezt a stratégiát követték Guilhot és munkatársai transzpozon mutagenézis alkalmazására *M. smegmatis*-ban⁸². Reprezentatív inszerciós mutáns könyvtár készítéséhez a Tn611 transzpozont használták, melyet Martin és munkatársai állítottak elő a Tn610 transzpozonon lévő szulfonamid rezisztencia génnek a Tn903-ból izolált kanamicin expressziós kazettára való kicserélésével⁶⁶. A Tn611 transzpozont hordozó pCG79 vektor a pAL5000 replikációs origó hőérzékeny származékát⁸¹ tartalmazta, amely 30°C-on képes volt replikálódni *Mycobacterium*-ban, viszont a szaporítási hőmérséklet 39°C-ra való emelése gyors plazmidvesztést eredményezett.

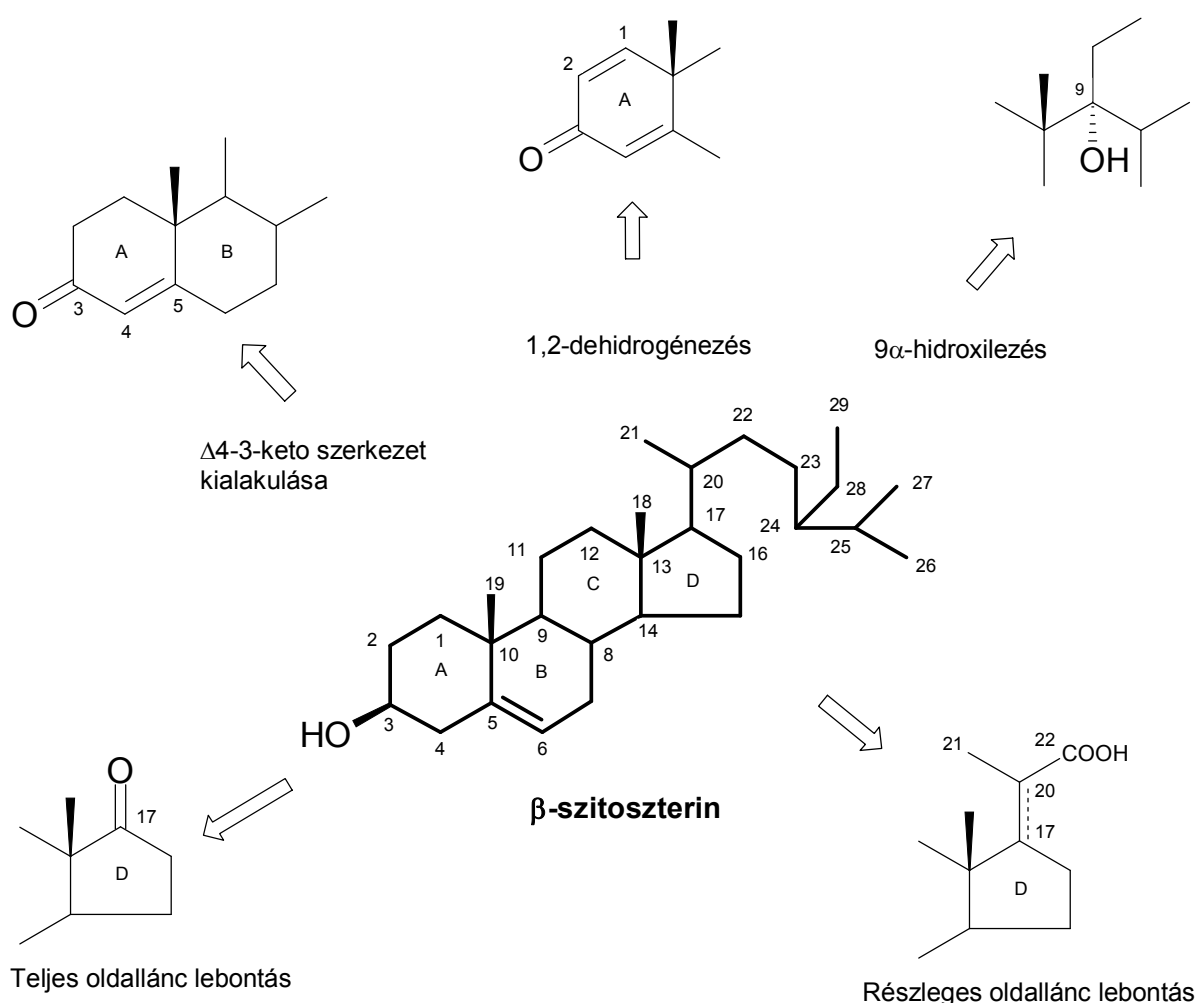
Az IS6100 szekvencia hasonlóságot mutat az IS6 család elemeivel⁶⁶ és hozzájuk hasonlóan a Tn611 transzpozon replikatív mechanizmussal integrálódik a *Mycobacterium* kromoszóma különböző helyeire emelt hőfokon amikor egy olyan kointegrátum jön létre, amely tartalmazza teljes pCG79 vektort és a transzpozonon lévő IS6100 elemek valamelyikének egy további kópiáját is (8. ábra). A transzpozíció során a transzpozonon lévő két inszerciós elem valamelyike, az „a”, vagy a „b” megkettőződik és a kointegrátumban az IS6100 három kópiában jelenik meg. Valamelyik elem duplikációjával létrejövő két inszerciós szekvencia azonos irányultságú, míg a másik ezekkel ellentétes. Ezt a két lehetséges változatot mutatja a 8. ábra alsó részén látható két vonalábra⁸².



8. ábra Tn611 transzpozon replikatív integrációja pCG79 plazmidról

2.3 Szterinek mikrobiológiai lebontásában résztvevő, molekulárisan jellemzett enzimek

A gyorsan növő mikobaktériumok szterin lebontó képessége jól ismert és hosszú idő óta alkalmazott a szteroid gyógyszerek szintézis-intermedierjeinek ipari előállításában, viszont a szterin katabolizmusban szerepet játszó enzimek, illetve az őket kódoló gének kevésbé ismertek. A természetes szterinek mikrobiológiai lebontása a szterin oldalláncon és a szteránvázon egyidejűleg folyik (9. ábra).



9. ábra A β -szitoszterin transzformációja gyorsan növő mikobaktériumokban

Két enzim, a 3-ketoszteroid Δ^1 -dehidrogenáz (*Ksdd*) és a 3-ketoszteroid 9 α -hidroxiláz működése szükséges a szteránváz lebomlásának elindításához.

A 3-ketoszteroid Δ^1 -dehidrogenáz enzim a 3-keto-4-én-szerkezetű szteroidok C₁-C₂ helyzetű dehidrogénezését katalizálja. A 3-ketoszteroid Δ^1 -dehidrogenáz enzim génjét több mikroorganizmusból, úgymint *Arthrobacter simplex*⁸⁸ *Nocardia corallina*⁸⁹, *Rhodococcus rhodochrous*⁹⁰ is izolálták és molekulárisan jellemezték. Geize és munkatársai *Rhodococcus erythropolis*-ban két különálló, 3-ketoszteroid Δ^1 -dehidrogenáz aktivitást mutató enzimet izoláltak, ahol mindegyik enzim inaktiválása szükséges volt a 4-androsztén-3,17-dion lebomlási folyamatának blokkolásához⁹¹. Knol és munkatársai tovább vizsgálták a C₁-C₂ dehidrogénezés mechanizmusát *Rhodococcus erythropolis* SQ1-ben és izolálták és molekulárisan jellemezték a 3-keto-5 α -szteroid Δ^1 -dehidrogenáz enzimet, amely az A-gyűrűben telített szteroidokon, pl. 5 α -androsztán-3,17-dion szubsztrátumon a legaktívabb⁹².

Mycobacterium smegmatis-ban Brzostek és munkatársai azonosították a 3-ketoszteroid Δ^1 -dehidrogenáz (*KsdD-1*) enzimet, amelynek inaktiválása koleszterin szubsztrátumon 4-androsztén-3,17-dion, illetve 9 α -hidroxi-4-androsztén-3,17-dion lebomlási intermedierek felhalmozódását eredményezte⁹³. A *Mycobacterium smegmatis* genom a *KsdD-1* enzimen kívül öt másik, feltételezett *KsdD* enzimet tartalmaz. Ezek közül a *KsdD-2* inaktiválása okozott gyenge perturbációt a koleszterin katabolizmusban, illetve a többi feltételezett *KsdD* homológ egyedüli szénforrásként koleszterint tartalmazó minimál táptalajon folytatott növesztéssel volt csak indukálható. A szerzők valószínűsítették, hogy a *KsdD* homológok eltérő szubsztrátum specifitása az oka gyenge aktivitásuknak.

A szteránváz lebontásában szerepet játszó enzimek szerkezetéről a legtöbb információ *Comamonas testosteroni* szterin katabolizmusának tanulmányozásából ered. Horinouchi és munkatársai új bakteriális szteroid lebontó génklasztert azonosított *Comamonas testosteroni* TA441 jelű törzsében, amelyben a 3-ketoszteroid Δ^1 -dehidrogenáz enzim mellett az aromás szeko-szteroidok lebontásáért felelős gének, valamint a vázlebomlás utolsó lépéseit katalizáló enzimek génjei találhatók⁹⁴.

Geize és munkatársai 2002-ben jellemezték a szteránváz mikrobiológiai lebomlásához szükséges másik kulcsenzimet, a 3-ketoszteroid 9 α -hidroxilázt *Rhodococcus erythropolis* SQ1-ben. Megállapították, hogy az enzim kétkomponensű vas-kén tartalmú monooxigenáz, amely terminális oxigenáz komponensből (KshA1) és oxigenáz-reduktáz komponensből (KshB) áll⁹⁵. A KshA1 gén kihasításával kapott RG2 mutáns törzs elvesztette a 4-androsztén-3,17-dion szubsztrátumon való növekedő képességét. Ugyanezen szerzők 2008-ban közölték a KshA1 egy homológjának, a KshA2-nek az izolálását a *Rhodococcus erythropolis* SQ1 jelű törzsből⁹⁶. A homológok aminosav összetétele 60%-ban azonos volt. A KshA2 gén magas

expresszióját kiváltva a RG2 törzsben, helyreállt a mutáns 4-androsztén-3,17-dion, illetve 1,4-androsztadién-3,17-dion szubsztrátumon való növekedő képessége, ami azt mutatja, hogy a KshA2 enzim szintén rendelkezik 9α -hidroxiláz aktivitással. Viszont az RG2 mutáns törzsben a KshA2 nem képes átvenni a KshA1 funkcióját, mert a KshA2 expresszióját nem indukálja kellő mértékben a 4-androsztén-3,17-dion, vagy az 1,4-androsztadién-3,17-dion. A szerzők promóter indukciós vizsgálatai rámutattak, hogy a 9α -hidroxi-4-androsztén-3,17-dion, vagy annak metabolitjai a KshA2 enzim tulajdonképpeni induktorai.

A szitoszterin-oldallánc lebontás 16 egymást követő lépésben, 9 enzim katalízisével történik. Az e folyamatban résztvevő enzimek szerkezete még felderítetlen.

3 EREDMÉNYEK

3.1 *Szterin lebomlási anyagcsereút gátlása transzpozon mutagenézis alkalmazásával*

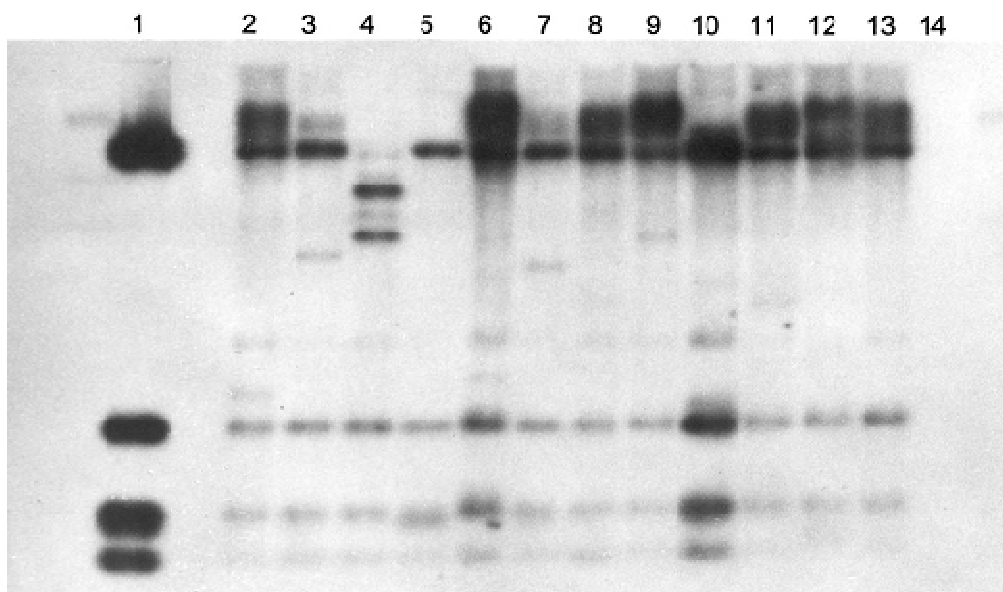
Kutatócsoportunk megkísérelt transzpozon mutagenézist kiváltani szterinátalakító *Mycobacterium* törzsekben a Pasteur Intézetből kapott pCG79 jelű plazmiddal.

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 módszer alkalmazásával szterinátalakító *Mycobacterium* törzsekbe transzformáltuk, majd a tenyésztési hőmérsékletet 30°C-ról 39°C-ra emelve kiváltottuk a transzpozont hordozó plazmid kromoszómába való integrációját.

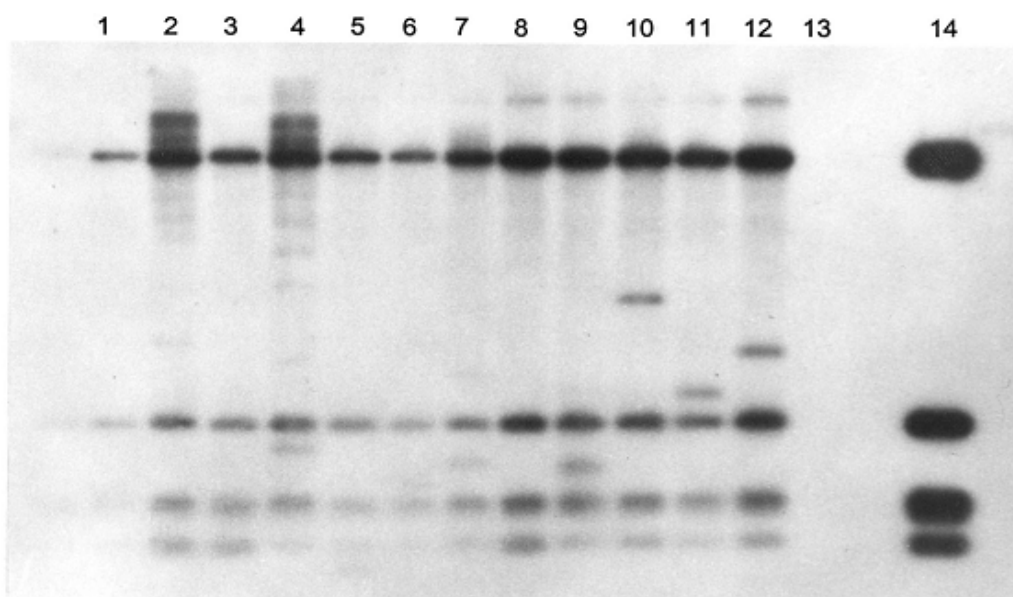
Ilyen módon inszerciós mutáns könyvtárakat hoztunk létre *Mycobacterium smegmatis* mc²155 és *Mycobacterium phlei* M51-Ept törzsekben. Mindkét törzs képes a szitoszterint metabolizálni; a *M. smegmatis* mc²155 intermedier képződés nélkül teljesen lebontja a szitoszterint, míg a *M. phlei* M51-Ept 4-androsztén-3,17-diont képez főtermékként. A kromoszómális integráció tényének, illetve Guilhot és munkatársai által leírt random jellegének⁸² bizonyítására mindkét könyvtárból 12 független mutánst analizáltunk Southern-blot hibridizációval (10. ábra).

Az autoradiogramról készült fényképfelvételen jól látható, hogy mindegyik analizált inszerciós mutáns kromoszómális DNS-ében radioaktív pCG79 próba DNS-sel kimutatható a vektorra jellemző mintázat és ezen felül egy változó méretű további DNS-sáv is, ami egyértelműen jelzi, hogy a vektor véletlenszerűen integrálódott a kromoszómába. Mindez előfeltétele annak, hogy kellően nagyszámú mutáns levizsgálása után szterinátalakító képességben blokkolt mutánsokat izoláljunk.

A szterinátalakító képességért felelős gének valamelyikében mutáns törzsek kiválasztásához nagy-áteresztőképességű szűrővizsgálati módszert fejlesztettünk ki 96-lyukú mikrotiter lemezekben. Ennek során nagyszámú inszerciós mutánst szaporítottunk szitoszterin jelenlétében a mikrotiter lemezek lyukaiban és szterinátalakító képességüket a fermentlé vékonyrétegekromatográfiás analízisével vizsgáltuk.



- A 12 független transzpozon inszerció *M. smegmatis* mc²155-ben** 1. sáv, Tn611 transzpozont hordozó pCG79 plazmid DNS *Pst*I-el emésztve; 2-13. sávok, 12 független, 39°C-on növekvő, km^r inszerció mutánsból izolált kromoszómális DNS *Pst*I-gyel emésztve; 14. sáv, *M. smegmatis* mc²155-ből izolált kromoszómális DNS *Pst*I-gyel emésztve (negatív kontrol).



- B 12 független transzpozon inszerció *M. phlei* M51-Ept-ben.** 1-12. sávok, 12 független, 39°C-on növekvő, km^r inszerció mutánsból izolált kromoszómális DNS *Pst*I-gyel emésztve; 13. sáv, *M. phlei* M51-Ept-ből izolált kromoszómális DNS *Pst*I-el emésztve (negatív kontrol); 14. sáv, Tn611 transzpozont hordozó pCG79 plazmid DNS *Pst*I-gyel emésztve.

10. ábra. Southern-blot hibridizációs analízise a *M. smegmatis* mc²155 (A) és *M. phlei* M51-Ept (B) inszerció mutánsoknak. 39°C-on növekvő, km^r törzsekből kromoszómális DNS-t izoláltunk, majd *Pst*I-gyel végzett emésztés után a fragmentumokat agaróz gélelektroforézissel választottuk el. Hibridizációs próbaként ³²P izotóppal jelzett plazmid DNS-t használtunk.

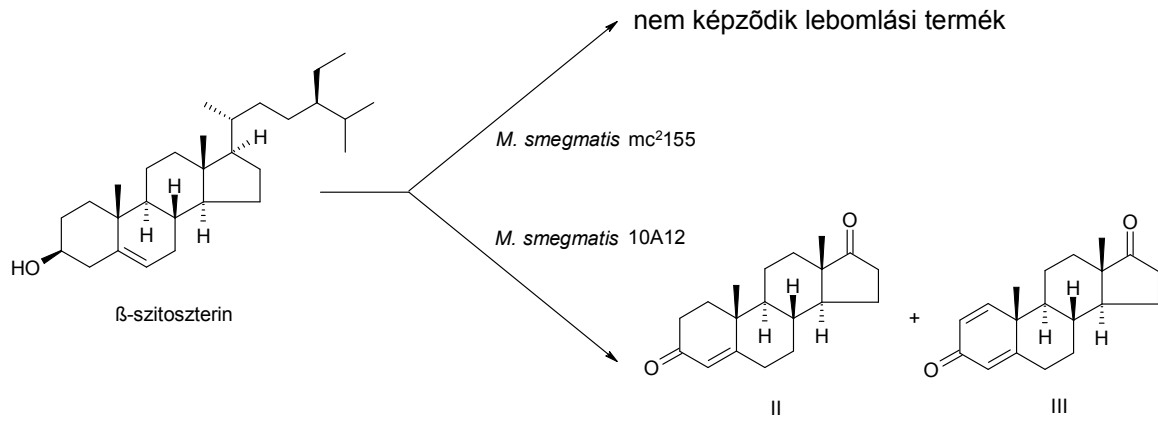
* km^r: kanamicin rezisztens

<i>Mycobacterium</i> törzsek		Sztioszterin lebontási termékek
Szülői törzsek	Inszerációs mutánsok	
<i>M. smegmatis mc</i> 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	17 β -hidroxi-4-androsztén-3-on (V) 4-androsztén-3,17-dion (II)

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

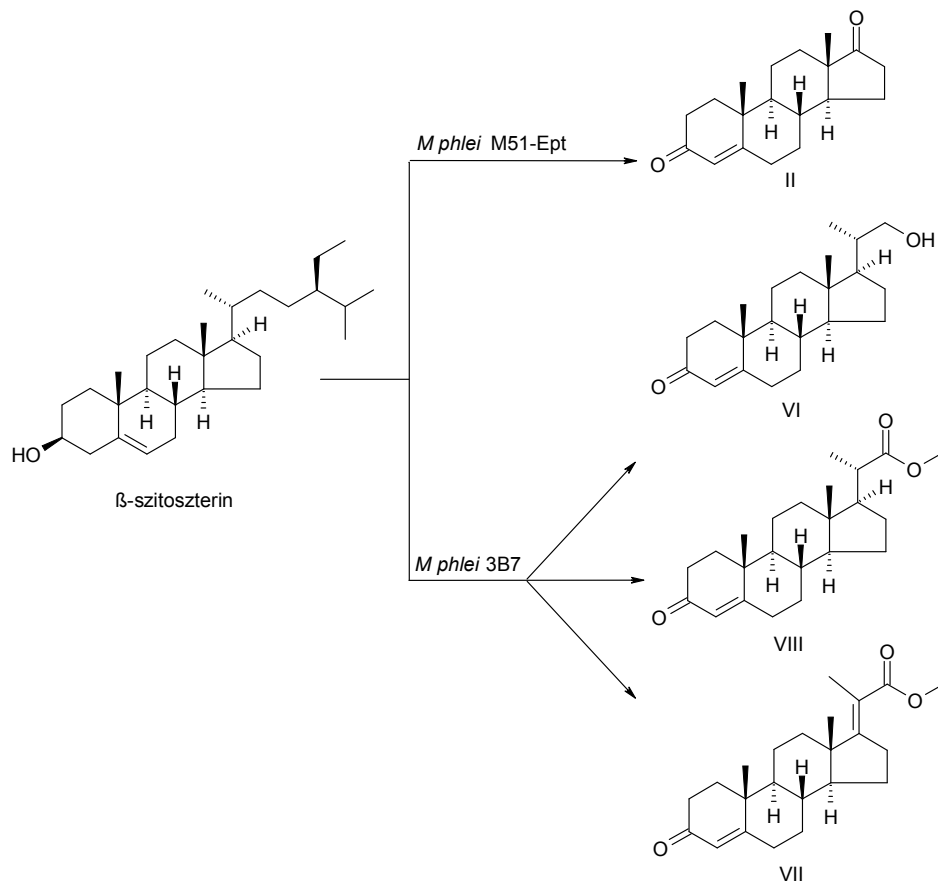
A miniatürizált méretű fermentációval 10-10 ezer törzset vizsgáltunk le mindegyik inszerációs mutáns könyvtárból. Összesen 4 törzset találtunk, amelyek szterinlebontó enzimaktivitásai különböztek a szülői törzsekétől. A képződött termékek szerkezetét - izolálást és tisztítást követően - spektroszkópai módszerekkel határoztuk meg (1. táblázat)⁹⁷. A megváltozott szterin-átalakító képességű mutáns törzsekkel nyert transzformációs termékek szerkezetét az 1. táblázatban és a 11. valamint a 12. ábrán mutatjuk be.

A *Mycobacterium smegmatis mc*²155-ben minden szterinlebontó enzim aktív, és így a sztioszterint intermedier-képzés nélkül, teljesen lebontja. A 10A12 jelű inszerációs mutánusa viszont gátolt a 9 α -hidroxiláz működésében és ennek következtében a szteránváz épen marad.



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

A 4-androsztén-3,17-diont termelő *Mycobacterium phlei* M51-Ept szülői törzsből képzett mutánsoknál az inszerció az oldallánc lebontóképességet befolyásolta. A *Mycobacterium phlei* 3B7 jelű törzs a szitoszterin-oldalláncot csak részlegesen bontja le és 23,24-dinorkolánvázis vegyületeket képez, mert a láncbontás utolsó enzimatis lépésére a pCG79 plazmid inszerciója miatt már nem kerül sor. A *Mycobacterium phlei* 5G4 és 10G9 azonos intermediereket, főtermékként tesztoszteront képez.



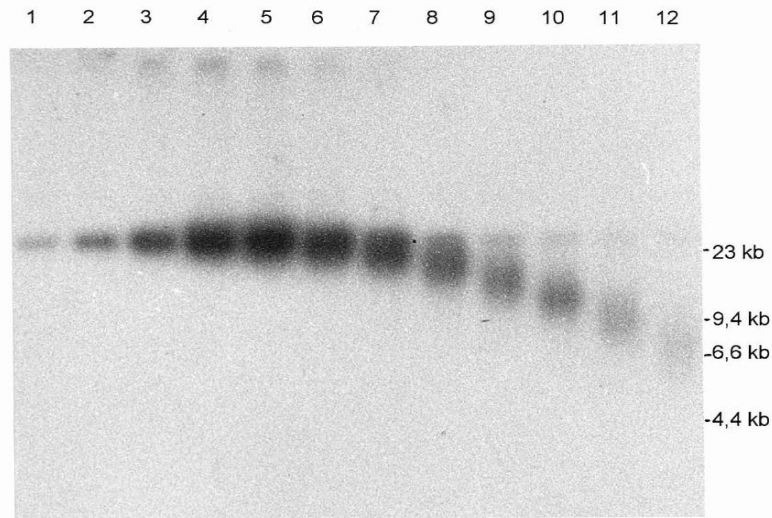
12. ábra A szitoszterin-oldallánc lebontó képesség megváltoztatása *Mycobacterium phlei*-ben transzpozon mutagenézis alkalmazásával

3.2 A 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz gén klónozása az enzim működésében gátolt *Mycobacterium smegmatis* 10A12 jelű blokkmutáns felhasználásával.

Kromoszómális DNS-t izoláltunk és tisztítottunk a *Mycobacterium smegmatis* 10A12 jelű mutánsból, majd *NotI* restriktív endonukleázzal emésztettük (15. ábra). Célunk az volt, hogy a *Mycobacterium* DNS-ből olyan nagyméretű fragmentumokat (30-40 kilobázis) állítsunk elő, amelyek tartalmazzák a kromoszómába inszertálódott pCG79 vektort. A *NotI* restriktív endonukleáz enzim a vektort nem hasítja, ezért a képződött fragmentumok között található olyan DNS szakasz, amely a teljes vektort és annak két oldalán a kromoszómális DNS két régióját hordozza. Mivel a pCG79 vektor kromoszómális integrációja tette működésképtelenné a 9 α -hidroxiláz gént, ezért a vektor két oldalán, annak integrációs környezetében található a keresett *Mycobacterium* gén (15. ábra). Ha az így, *NotI*-gyel előállított DNS fragmentumot gyűrűvé zárjuk, akkor olyan rekombináns plazmidhoz jutunk, amely magában foglalja a pCG79 vektort valamint a keresett 9 α -hidroxilezésért felelős *Mycobacterium* kromoszóma szakaszt, és *Mycobacterium*-ban és *E. coli*-ban egyaránt replikálódik.

A *NotI* restriktív endonukleázzal emésztett kromoszómális DNS-t cukorgradiens centrifugálással frakcionáltuk, mellyel feldúsítottuk a nagy molekulaméretű (30-40 kilobázis) DNS fragmentumokat. Ezután Southern-blot analízist végeztünk annak meghatározására, hogy melyik DNS frakció tartalmazza legnagyobb mennyiségben a kromoszómába integrálódott pCG79 vektort. ³²P izotóppal jelzett pCG79 plazmid DNS-sel végzett hibridizáció alapján az intenzíven jelölődő, legnagyobb méretű első négy frakciót választottuk ki a későbbi kísérletek céljára (13. ábra). A négy DNS frakciót egyesítettük, a lineáris molekulákat T4 ligáz enzimmel cirkularizáltuk, majd *E. coli* XL1 Blue elektrokompetens tenyészetbe transzformáltuk elektroporációs módszerrel. 20 μ g/ml sztreptomycin jelenlétében transzformánsokat szelektáltunk, melyekből plazmid DNS-t izoláltunk. A rekombináns plazmidokat és a pCG79 vektort *PstI* restriktív enzimmel hasítottuk és a keletkezett DNS fragmentumokat agaróz gélelektroforézissel elválasztottuk. A transzformánsokból izolált rekombináns plazmidok *PstI* restriktív mintázata megegyezett, illetve jól kivehetőek voltak a pCG79 plazmidból származó DNS fragmentumok. A rekombináns plazmidot pFJ92-nek neveztük el, melynek az emésztési fragmentumokból számított mérete kb. 26-27 kilobázisnak

(kb) adódott. Feltételezésünk szerint a pFJ92 plazmidban a fenti módszerrel sikerült klónoznunk a 9α -hidroxilázt kódoló kromoszómális DNS szakaszt⁹⁸.



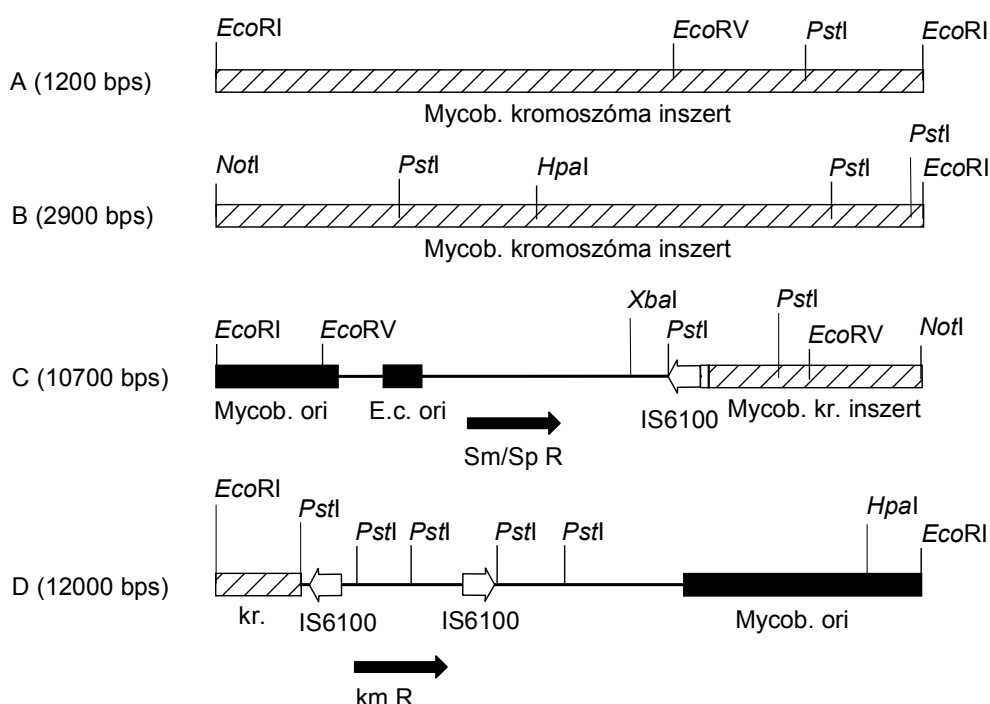
13. ábra *NotI* restrikciós enzimmel emésztett *Mycobacterium* kromoszómális DNS-ének Southern-blot analízise cukorgradiensén történő elválasztás után. A DNS hibridizáció során a ³²P izotóppal jelzett pCG79 plazmid DNS próbát használtuk. A sorszámok a cukorgradiensről letermelt frakciókat mutatják. Molekulaméret standard *HindIII* restrikciós enzimmel emésztett lambda fág DNS volt.

A következő feladat a pFJ92 plazmid restrikciós térképének elkészítése volt, mely komoly nehézséget jelentett egyrészt nagy mérete miatt, továbbá azért, mert a pCG79 plazmid restrikciós térképe hiányosan, nukleotidszekvenciája pedig egyáltalán nem állt rendelkezésünkre. Először a pCG79 plazmidot kellett térképeznünk, ezután foghattunk hozzá a pFJ92 rekombináns plazmid vizsgálatához. A restrikciós térképezés céljára nagy mennyiségű (kb. 1000 µg) plazmid DNS-t izoláltunk és cézium-klorid ethidium-bromid egyensúlyi gradiens ultracentrifugálással tisztítottuk.

A DNS térképezésben hagyományosan alkalmazott eljárás az egyszeres, egy-egy restrikciós enzimmel (pl. *EcoRI*, *PstI*, *EcoRV*, *NotI*, *XbaI* stb.) végzett emésztés, melyet kettő vagy három enzimmel végzett együttes hasítások követnek,⁹⁹ nem vezettek egyértelmű eredményre. Ezért Southern-blot analízist végeztünk, amelyben a pFJ92 plazmidból többféle restrikciós enzimmel előállított, agaróz gélelektroforézissel elválasztott restrikciós mintázatot ³²P izotóppal jelzett pCG79 plazmid DNS-sel hibridizáltuk. Ez a technika a rekombináns vektor restrikciós térképét alapvetően világossá tette (15. ábra), azonban a finomszerkezet tisztázásához és a későbbi gén-komplementációs kísérletekhez elkerülhetetlen volt a pFJ92 szubklónozása.

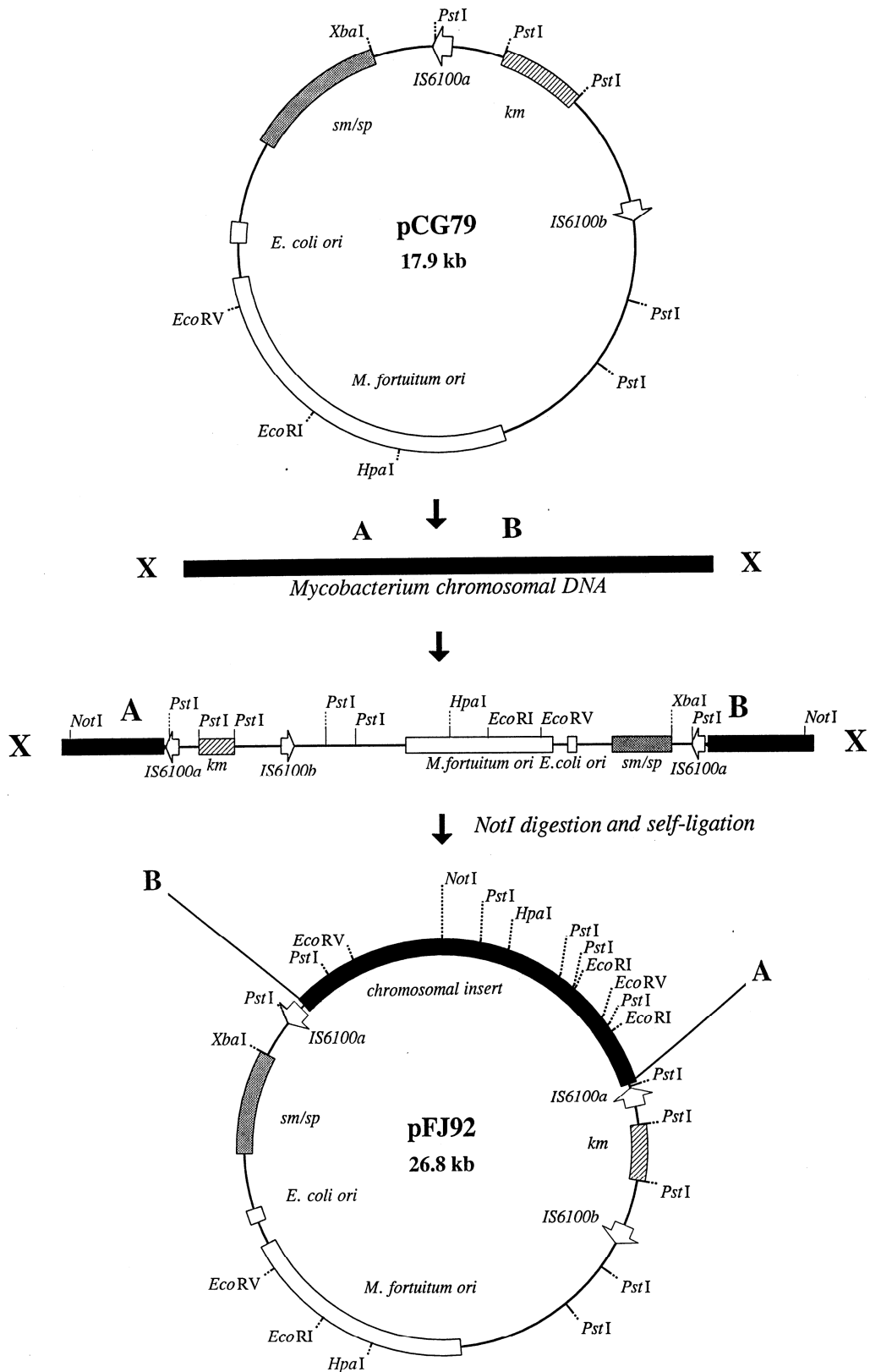
A rekombináns plazmidot *EcoRI* és *NotI* restriktív enzimekkel egyidejűleg hasítottuk, melynek eredményeként négy DNS fragmentum jött létre, melyek mérete: 1,2; 2,9; 10,7; 12 kb (14. ábra). A fragmentumokat pBluescript SK II(+) klónozó vektorban külön-külön megklónoztuk. A pFJ92 plazmid szubklónjait az alábbiak szerint jelöltük:

- (1) pFJ92A (az inszert mérete: 1,2 kb) és A* (a pFJ92A orientációs izomere),
- (2) pFJ92B (az inszert mérete: 2,9 kb),
- (3) pFJ92C (az inszert mérete: 10,7 kb),
- (4) pFJ92D (az inszert mérete: 12 kb) és D* (a pFJ92D orientációs izomere).



14. ábra A pFJ92 rekombináns plazmidból *EcoRI* és *NotI* restriktív enzimekkel előállított négy DNS fragmentum restriktív és funkcionális térképe. A bemutatott kvalitatív ábrán feltüntettük a DNS fragmentumok jelzését és méretét. A vonalkázott boxok a *Mycobacterium* kromozómából megklónozott DNS szakaszt reprezentálják.

A fenti szubklónokat restriktív enzimekkel tovább térképeztük, amely tisztázta a pCG79 vektor kromozómális integrációjának helyzetét (15. ábra) és a *Mycobacterium* kromozómájából származó inszert pontos restriktív térképét. Rendelkeznünk tehát a szterin lebontásban szerepet játszó 9α -hidroxiláz enzimet kódoló DNS szakasszal, amely nagy valószínűséggel a kromozómális inszert és a pCG79 vektorhoz tartozó DNS régiók találkozásánál kétfelől helyezkedik el. Egyértelmű volt ugyanis, hogy a pCG79 vektorban megklónozott *Tn611* transzpozon replikatív integrációja okozta a 9α -hidroxiláz gén inaktivációját a *Mycobacterium smegmatis* 10A12 jelű mutánsban. A 9α -hidroxiláz gén pontos lokalizációjára komplementációs és nukleotidszekvenálási kísérleteket terveztünk.



15. ábra. Tn611 transzozon replikatív integrációja és a 9 α -hidroxilázt hordozó pFJ92 plazmid visszanyerése *M. smegmatis* 10A12 kromoszómális DNS-éből

A következő lépésben a vektor inszerciót nem tartalmazó, és így a 9 α -hidroxiláz gént épen hordozó intakt *NotI* kromoszómális fragmentum izolálása céljából a szülői *Mycobacterium smegmatis*-ból genomiális génkönyvtárat készítettünk pYUB18 kozmid vektorban. A génbankból a szóban forgó *NotI* fragmentumot hordozó klónt telephibridizációs módszerrel választottuk ki. Hibridizációs próbaként a pFJ92 vektor kromoszómális régiójának végeinél levő *PstI-PstI* és *EcoRI-EcoRI* hasítóhelyekkel határolt DNS-t használtuk. A 960 megvizsgált telep közül két rekombináns kozmid adott pozitív hibridizációs szignált. Az izolált *NotI*-fragmentumot higromicin rezisztenciát hordozó pOLYG⁷⁷ jelű *Mycobacterium-E. coli* ingázó vektorba inszertáltuk és az így nyert rekombináns plazmidot pAA23-nak neveztük el (17. ábra).

A 9 α -hidroxiláz gén lokalizálása céljából komplementációs kísérleteket végeztünk és meghatároztuk a *NotI* kromoszómális szegmens DNS szekvenciáját. A komplementációs kísérletek során először a pAA23 jelű plazmiddal transzformáltuk a 9 α -hidroxiláz enzim működésében gátolt 10A12-es jelű inszerciós mutánst, amelyben komplementálódott a génben lévő mutáció és a szitoszterin ismét intermedier képződés nélkül teljesen lebontotta (16. ábra).

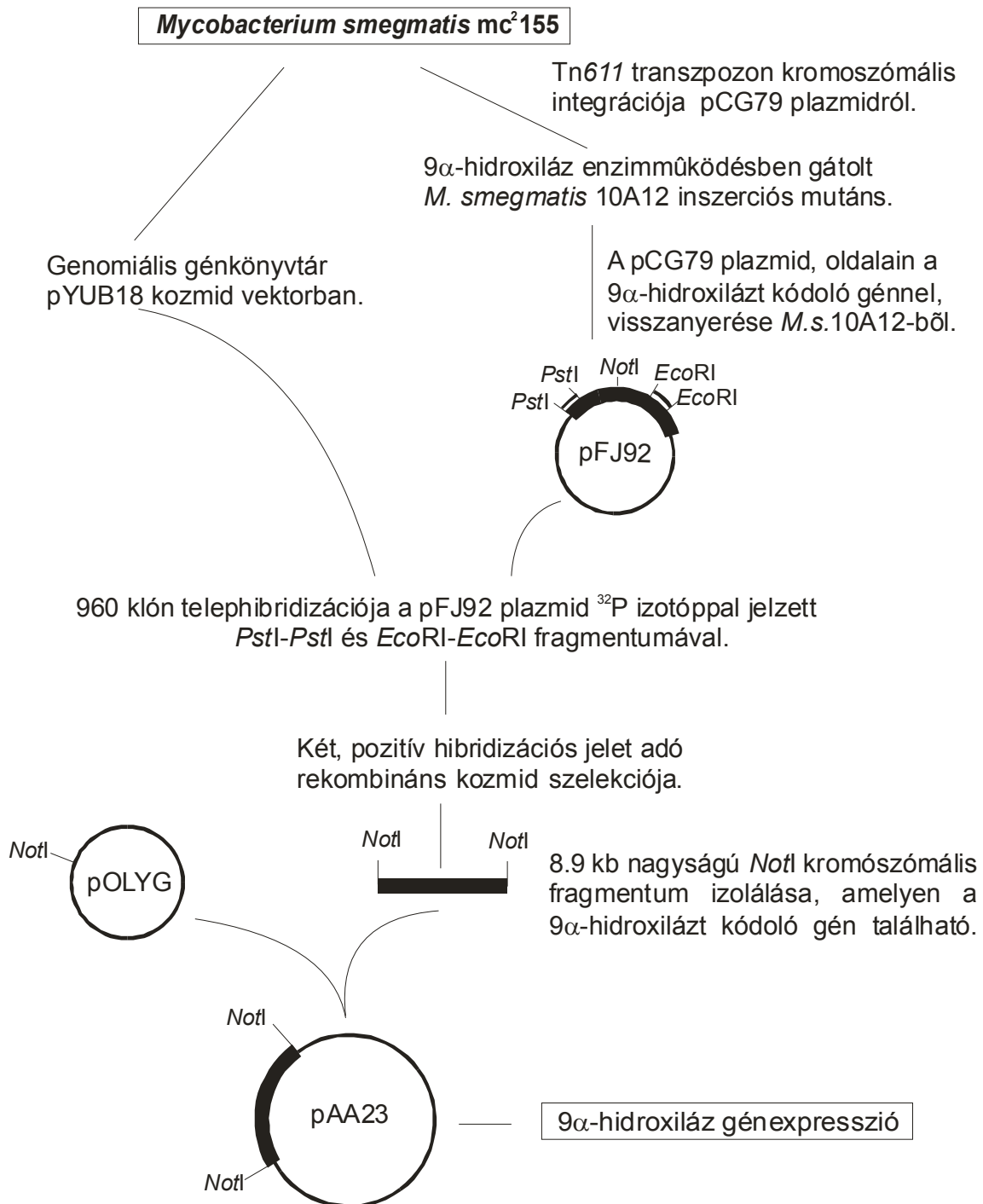
Gazdatörzs	Plazmid DNS	Szubsztrátum	Átalakítási termékek
<i>M. smegmatis</i> 10A12	-	szitoszterin	AD, ADD
	pOLYG/ <i>NotI</i> (pAA23) pOLYG/ <i>EcoRI-EcoRV</i>		nincs termék
	pOLYG/ <i>EcoRI-BamHI</i>		AD, ADD
<i>M. phlei</i> M51-Ept	pOLYG/ <i>NotI</i> (pAA23) pOLYG/ <i>EcoRI-EcoRV</i>	AD	9 α -OH-AD
	pOLYG/ <i>EcoRI-BamHI</i>		AD

AD: 4-androsztén-3,17-dion; **ADD:** 1,4-androsztadién-3,17-dion; **9 α -OH-AD:** 9 α -hidroxi-4-androsztén-3,17-dion

16. ábra 9 α -hidroxiláz enzim lokalizációja gén komplementációval

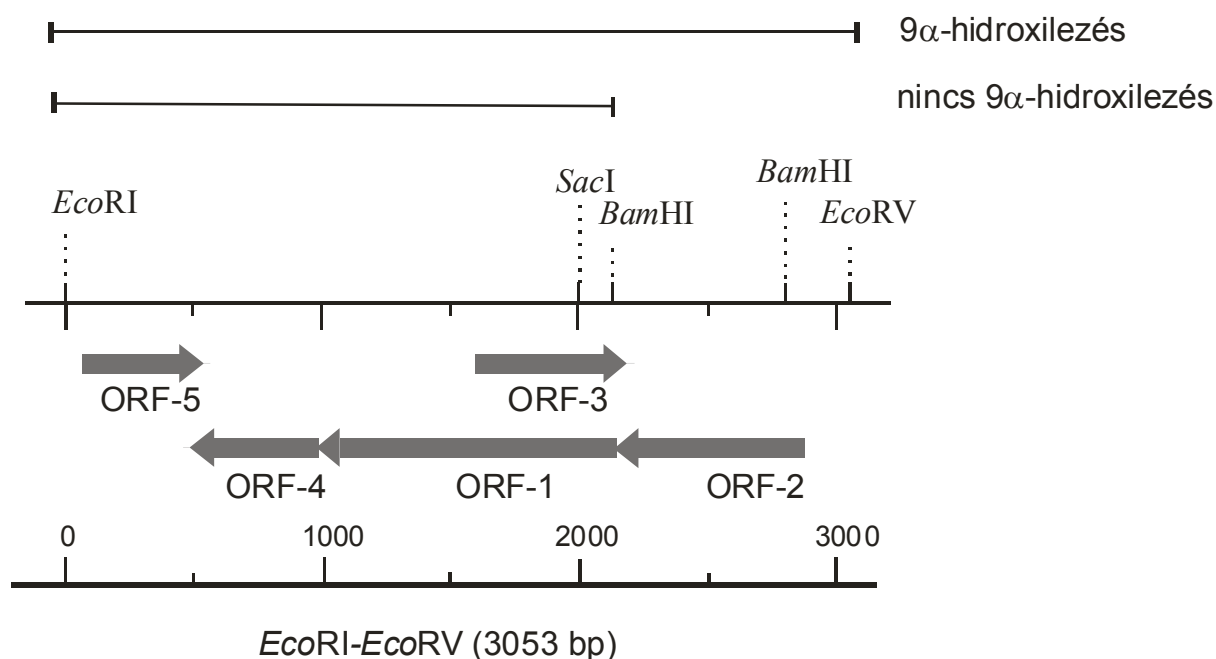
Egy másik kísérletben a pAA23-vektort 9 α -hidroxiláz aktivitással eredetileg nem rendelkező *Mycobacterium phlei* M51-Ept törzsbe juttattuk és higromicin rezisztens transzformánsokat izoláltunk, amelyek a 4-androsztén-3,17-diont 9 α -hidroxi-4-androsztén-

3,17-dionná alakították, azaz képessé váltak a szteránváz 9α -helyzetű hidroxilezésére (17. ábra). Amikor 1,4-androsztadién-3,17-diont adtunk szubsztrátumként, 3-hidroxi-9,10-szeko-1,3,5(10)-androsztatrién-9,17-dion keletkezett az instabil 9α -hidroxi-1,4-androsztadién-3,17-dion átmeneti termék spontán átrendeződése miatt¹⁰⁰.



17. ábra Szteroid- 9α -hidroxiláz gént kódoló *Not*I kromoszómális DNS szakasz izolálása *Mycobacterium smegmatis* mc²155-ből

A további komplementációs kísérleteknél fokozatosan csökkentettük a vektorban lévő kromoszómális inszert méretét restrikciós enzimekkel mindaddig, amíg az adott vektort hordozó transzformánsok funkcionális 9α -hidroxiláz aktivitást mutattak. Ilyen módon az *EcoRI-EcoRV* restrikciós enzimekkel határolt DNS régióra tudtuk szűkíteni a 9α -hidroxiláz enzim génjét, további kihalás az enzimaktivitás elvesztését eredményezte. A 18. ábra az *EcoRI-EcoRV* fragmentum szekvenálásával nyert fontosabb restrikciós helyeket és a lehetséges fehérjéket kódoló „open reading frame”-ket tünteti fel. Amikor a *BamHI-EcoRI* fragmentum felhasználásával kíséreltünk meg komplementációt elérni, a transzformánsok már nem mutattak 9α -hidroxiláz aktivitást (16. ábra). Az említett *BamHI* restrikciós hely az ORF-1 5' végéhez közel esik.



18. ábra. A *M. smegmatis mc²155* 3-ketoszteroid- 9α -hidroxiláz terminális oxigenáz komponensét hordozó *EcoRI-EcoRV* fragmentum ORF analízise

Komplementációs kísérleteink alapján azt feltételeztük, hogy az ORF-1 kódolja a 9 α -hidroxiláz enzimet. A feltételezés bizonyítására meghatároztuk a pCG79-vektor genomiális integrációjának pontos helyét, a pFJ92-vektort felhasználva a 9 α -hidroxiláz gént érintő egyik oldalon. A pFJ92-vektorból szubklónokat készítettünk pBluscript SK II(+) vektorba, majd a feltételezett integrációs helyet magába foglaló *SacI-HindIII* fragmentumot hordozó klónt a *SacI* vég felől szekvenálva a 19. ábrán látható szekvenciához jutottunk. Homológia vizsgálatokból egyértelműen kiderült, hogy a vizsgált szekvencia tartalmazza az integrációs helyet és a transzpozon szekvenciáját is, ez a vastagon szedett kromoszómális régiótól dőlt betűvel elkülönítve látható az ábrán. A szekvenanciaanalízissel tehát pontosan meghatároztuk az integrációs helyet, ami a feltételezett 9 α -hidroxiláz gén 5' végén található a transzlációs starthelytől 62 bázispányira 5'-3' (downstream) irányban.

**GAGCTCGCCCTTGGAGTCCGCGAACACCACGAGCTTGGTGCCGAAGATGTT
GACGCTGTGCGGCTTGCCGTCCGAGAAGTTCTTCACCGGTCCAAGGCAGTG
CCAGCCTCGCGGGCTCTGTTGCAAAGATTGGCGGCAGTCAGAGGTAGGCTGTCGCT
CTGCGCCGATCAGGCGGCTGCTGCGAAATGGTGGTTGAGCATGCCCATGGCCTCCGT
CAGCGCCGAGGGCCCAATGCCAAAAGCTCTCTCCACAAGGCGCACCTCGCCCCTGAT
GCCGGGCTGCAGGCACCAGGGGCGAGCCTGTCCTTTGCGCAGGGCTCGCATGACTTC
GAATCCCTTGATCGTGGCATAGGCCGTGGGGATCGATTTGAAACCGCGCACCGGCTTG
ATCAGTATCTTGAGCTTCCGTGATCGGCCTCGATCACGTTATTGAGATACTTCACCTGC
CGGTGGGCCGTCTCCCGGTCCAGC**

19. ábra. A *HindIII/SacI* fragmentum DNS szekvenciájának a *SacI* hely felőli része (a vastagon szedett betűk a genomiális régiót, a dőlt betűk a *Mycobacterium fortuitum* Tn610 transzpozon IS6100 elemének egy régióját mutatják)

A 383 aminosavat kódoló ORF-1 teljes szekvenciáját a 20. ábrán mutatjuk be. A meghatározott DNS szekvenciát letétbe helyeztük a DDBJ/EMBL/GeneBank adatbázisában (hozzáférési szám: DQ357196)¹⁰¹.

```

1  atggctaccgagactgtcgggatccgcgaaatcgacaccggcgcg
M A T E T V G I R E I D T G A
46  ctgccggatcggtagcgcgcgaggctggcactgccttggaccgggtg
L P D R Y A R G W H C L G P V
91  aagaacttctcggacggcaagccgcacagcgtcaacatcttcggc
K N F S D G K P H S V N I F G
136  accaagctcgtggtggttcgcggactccaagggcgagctcaacgtc
T K L V V F A D S K G E L N V
181  ctcgacgcgtactgccgccacatggggcggtgacctgtcgaagggc
L D A Y C R H M G G D L S K G
226  accgtaaacggcgacaaggtcgcgtgcccggtccacgactggcgc
T V K G D K V A C P F H D W R
271  tggggcggtgacggcaagtgcagctcgtgccgtacgccaaagcgc
W G G D G K C K L V P Y A K R
316  accccccgcctggcccgcacccggtcctggcacaccgacgtgcgc
T P R L A R T R S W H T D V R
361  ggccggcctgctggttcgtggtggcacgaccagagggaaccccgcg
G G L L F V W H D H E G N P P
406  gccccgagggtgcgatccccgagatccccggagtggcacagcgggt
Q P E V R I P E I P E W H S G
451  gagtggaccgactggaagtggaactcgatggtgatcgagggcagc
E W T D W K W N S M L I E G S
496  aactgccgcgagatcatcgacaacgtcacccgacatggcccacttc
N C R E I I D N V T D M A H F
541  ttctacatccacttcgggctgcccgcgtacttcaagaacgtcttc
F Y I H F G L P T Y F K N V F
586  gagggccacatcgccagccagtacctgcacaacgtgggcccggccc
E G H I A S Q Y L H N V G R P
631  gatgtcaacgacctcggcacggcctacggcgaggccaagctggac
D V N D L G T A Y G E A K L D
676  tccgaggcgtcgtacttcggcccgtcgttcatgatcaactggctg
S E A S Y F G P S F M I N W L
721  cacaacacctacggcgagttcaaggccgagtcgatcctgatcaac
H N T Y G E F K A E S I L I N
766  tgccactaccccgtgacgcaggattcgttcgtgctgcagtggggt
C H Y P V T Q D S F V L Q W G
811  gtgatcgtcggagaagcccaaggggctggacgacgcgaccaccgag
V I V E K P K G L D D A T T E
856  aagtcgccgccttcaccgaggggtctcagcaagggcttctcgtg
K L A D A F T E G L S K G F L
901  caggacgtcggagatctggaagcacaacccgcacatcgacaatccg
Q D V E I W K H K T R I D N P
946  ctgctggtcggaggagacggcgcgggtgtaccagatgcggcgctgg
L L V E E D G A V Y Q M R R W
991  taccagcagttctacgtcgcagctcggccgacatcagccggacatg
Y Q Q F Y V D V A D I T P D M
1036  accgaccgggttcgagatggaggtcgacaccacggccgctcgag
T D R F E M E V D T T A A V E
1081  aagtggaacatcgagggttcaggagaacctgaaggcccaggccgaa
K W N I E V Q E N L K A Q A E
1126  gccgagaaggcggagcagtcgagctga 1152
A E K A E Q S S *

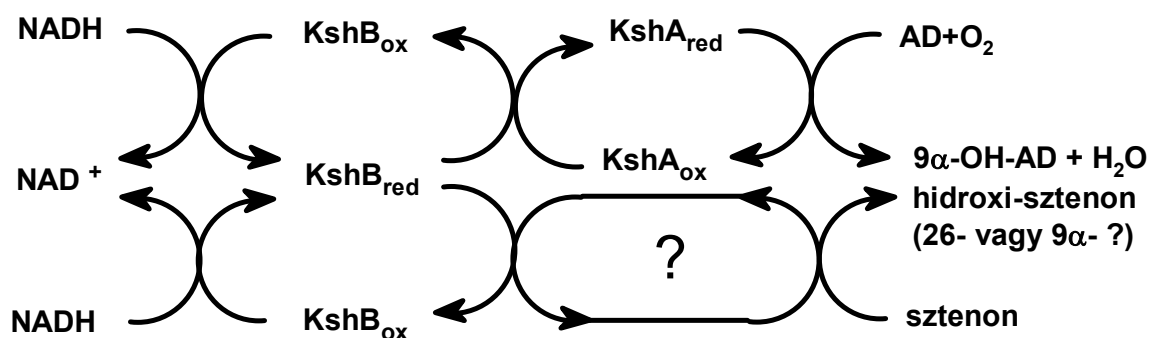
```

20. ábra. A 9 α -hidroxiláz enzimet kódoló ORF-1 szekvenciája

(DDBJ/EMBL/GeneBank hozzáférési szám: DQ357196)

A kutatás e fázisában a munkában egy kis kényszerszünet következett be. Ez idő alatt holland kutatók, R. van der Geize és munkatársai *Rhodococcus erythropolis*-ban vizsgálták a 9 α -hidroxilezés mechanizmusát⁹⁵, melynek molekuláris alapjait mi raktuk le a

Mycobacterium genus esetében. A szerzők UV-besugárzással két, egymástól különböző enzimből mutáns törzset állítottak elő, melyek mindegyike a 9α -hidroxiláz enzim működését érintette. Ezen mutánsokat felhasználva mindkét enzim génjét klónozták, és szekvenálták. A DNS-szekvenciából lefordított fehérjeszekvenciák homológiavizsgálatai alapján megállapították, hogy a *Rhodococcus* hidroxiláza IA osztályba sorolható monooxygenázok közé tartozik, melyek definíció szerint két komponensből állnak. A *Rhodococcus erythropolis* hidroxilázát terminális oxigenáznak (KshA) és oxigenáz ferredoxin-reduktáznak (KshB) nevezték el. A 21. ábrán ezen két enzimből és NADH-ból álló elektrontranszportlánc látható.



21. ábra. 3-ketosteroid- 9α -hidroxiláz enzim elektrontranszport-lánca *Rhodococcus erythropolis* SQ1-ben.

Most nézzük meg, hogy ezen enzimműködések révén milyen szteroid metabolitok képződnek. A 3-ketosteroid- 9α -hidroxiláznak szubsztrátumja mind az 4-androsztén-3,17-dion (AD), mind pedig az 1,4-androsztadién-3,17-dion (ADD). Az AD esetében a kortikoszteroidok szintézis alapanyagául szolgáló 9α -hidroxi-4-androsztén-3,17-dionhoz (9α -OH-AD) jutnak. Viszont az 1,4-androsztadién-3,17-dion hidroxilezése a szteránváz felbomlását eredményezi. A KshA, vagy KshB enzim génjében mutáns törzseknél a metabolizmus blokkolt, hidroxilezés nincs. A KshB enzim génjében mutáns törzsszel végezve a szterinátalakításokat, azt tapasztalták, hogy szitoszterint adva szubsztrátumul, a lebontás megáll a szitosztenonnál, azaz a koleszterin-oxidáz révén csak a 3-oxo-4-én-szerkezet alakul ki és az oldallánc érintetlen marad. Mindebből pedig az következik, hogy a KshB enzim érintett a 26-os helyzetű, láncvégi hidroxilezésben is, ami a lebontás bevezető és valószínűleg sebességmeghatározó lépése.

Ezek után térjünk vissza a *Mycobacterium* Ksh rendszeréhez. Rendelkezünk egy funkcionálisan aktív 9α -hidroxilázzal, mely képes blokkmutációt komplementálni *M. smegmatis* 10A12-ben.

A 9α -hidroxilázunk a DNS szekvenciájából lefordított fehérjehomológia vizsgálata alapján közeli rokonságot mutat *M. tuberculosis* Rv 3526-os gén által kódolt hipotetikus proteinnel, ill. a fentebb tárgyalt *Rhodococcus erythropolis*ből izolált kétkomponensű 3-ketoszteroid- 9α -hidroxilázzal. A fehérjeszekvencián azonosítható az IA osztályba tartozó terminális oxigenázokban jellemzően konzervált Rieske $[2Fe-2S]_R$ domén és egy nem hem Fe(II) domén (22. ábra)¹⁰².

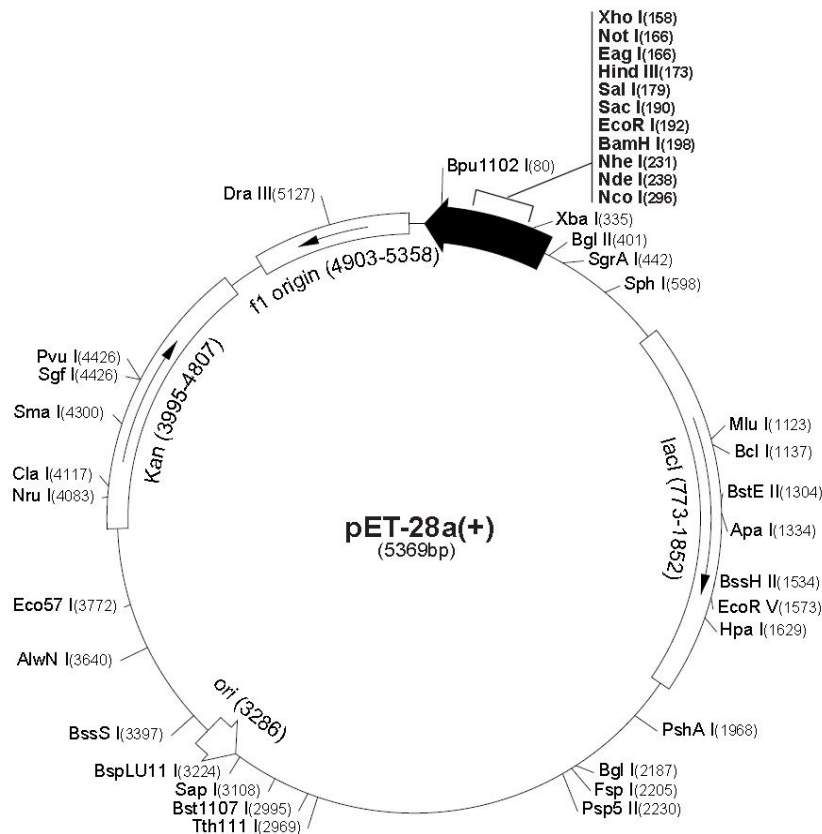
Az elmondottak alapján a 9α -hidroxilázunkat is az IA osztályú terminális oxigenázok közé sorolhatjuk.

	Rieske $[2Fe-2S]$ domén		Nem-hem Fe (II) domén			
	C	H	D/E	D	H	
M.s. 9α -hidroxilázA	63	AYCRHMGGDLSKGTVKGDKVACPFHDWRWGGDG	95	171	I D NVTDMAHFFYIH	184
Rv 3526	65	GYCRHMGGDLSEGTVKGDEVACPFHDWRWGGDG	97	173	I D NVTDMAHFFYIH	186
KshA	78	AYCRHMGGNLAHGTVKGD SIACPFHDWRWGGNG	110	186	V D NVVDMAHFFYVH	199

22. 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.

3.3 3-ketoszteroid- 9α -hidroxiláz enzim terminális oxigenáz komponensének expressziója *E. coli*-ban

A pET-rendszer az eddigi leghatékonyabb klónozó és expressziós rendszer, amelyet rekombináns fehérjék *E. coli*-ban történő előállítására kifejlesztettek. A pET-plazmidokban klónozott gének a T7 bakteriofág erős transzkripció és (adott esetben transláció) szignáljának ellenőrzése alá kerülnek. A kívánt gén transzkripciójához szükséges T7 RNS-polimeráz csak indukció útján termeltethető. A T7 RNS-polimeráz annyira szelektív és aktív, hogy indukált állapotában a sejt csaknem valamennyi forrását a célgén expressziójára fordítja, s a képződött termék néhány órával az indukciót követően az összes sejtféherje több, mint 50%-a.



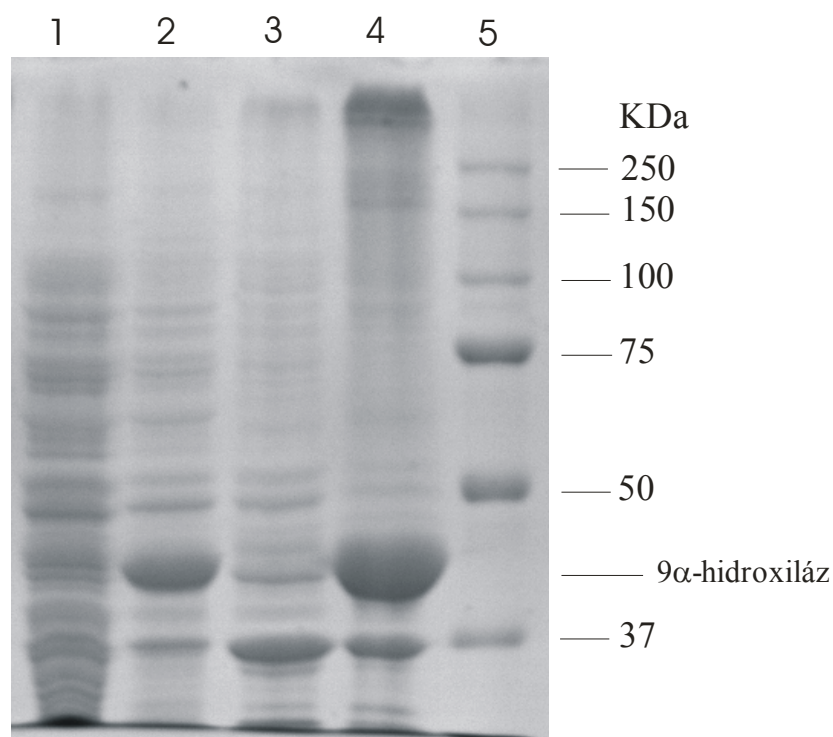
23. ábra A pET-28a(+) expressziós vektor restriktációs és funkcionális térképe

A 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz terminális oxigenáz génjét PCR reakcióval sokszoroztuk a pAA23 vektort használva templát DNS-ként. A primereket úgy terveztük, hogy az ORF-1-t a pET-28a(+) expressziós vektor *NcoI/HindIII* helyére tudjuk klónozni (23. ábra). Az előremenő láncindító szekvenviája 5'-CCATGGCTACCGAGACTGTCG-3' a hátramenő láncindítóé pedig 5'-AAGCTTCAGCTCGACTGCTCC-3' volt. A DNS fragmentumot PCR reakcióval sokszoroztuk, majd klónoztuk pBluescript SK II(+) vektorba és szekvenálással ellenőriztük. Egy rekombináns plazmidot, amely a korrekt inszertet hordozta, *NcoI* és *HindIII* restriktációs endonukleázokkal emésztettük és az ugyanezen enzimekkel linearizált pET-28a(+) vektorba ligáltuk. A DNS ligátummal *E. coli* BL21- λ DE3 törzset transzformáltuk. 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 1,4-androsztén-3,17-dion szubsztrátumot adagoltunk és a lac promótert 0,4 mM izopropil- β -D-tiogalaktózid (IPTG) hozzáadásával indukáltuk. Az indukció után egy nappal a szubsztrátumként adott 4-androsztén-3,17-dion 9 α -hidroxilezését tudtuk kimutatni a fermentlében kromatográfiás módszerekkel.

A fehérjeexpressziót SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (PAGE) vizsgáltuk (24. 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, 9α -hidroxilezésre képes *E. coli* BL21/pOX17 tenyészetéből nyert fehérje-extraktumok SDS-PAGE analízise nagy mennyiségű rekombináns terminális oxigenáz termelést mutatott. A rekombináns fehérje főként oldhatatlan test formájában képződött és csak kisebb hányadban volt jelen oldható állapotban (24. 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^{103,104}.

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



24. ábra. *E. coli* BL21/pOX17-ben expresszált *M. smegmatis* mc²155-ből származó 3-ketoszteroid- 9α -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

3.4 Új tudományos eredmények

1. A Tn611 transzpozont hordozó pCG79 jelű hőérzékeny shuttle plazmid DNS alkalmazásával inszerciós mutáns könyvtárakat hoztunk létre ipari szempontból is jelentős szterinátalakító *Mycobacterium* törzsekből.
2. Nagy-áteresztőképességű módszert fejlesztettünk ki mikrotiter lemezre a szterinátalakító képességben megváltozott mutáns törzsek kiválasztásához.
3. Négy törzset találtunk, melyek szterinlebontó enzimaktivitásai különböztek a szülői törzsekétől:

A szitoszterint intermedier képződés nélkül teljesen lebontó *Mycobacterium smegmatis* mc²155 inszerciós mutáns könyvtárából izoláltuk az 1,4-androsztadién-3,17-diont termelő 10A12 jelű inszerciós mutánst, mely a 9 α -hidroxiláz működésében gátolt.

A 4-androsztén-3,17-dion termelő *Mycobacterium phlei* M51-Ept szülői törzsből nyert *Mycobacterium phlei* 3B7 jelű mutáns dinorkolánvázis vegyületeket képez. 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.

A *Mycobacterium phlei* 5G4 és a 10G9 főtermékként tesztoszteront képez.

4. A *Mycobacterium smegmatis* 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz enzimjének terminális oxigenáz komponensét elsőként izoláltuk és molekulárisan jellemeztük.
5. A 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz enzim terminális oxigenáz komponensét homológ és heterológ rendszerben, *E. coli*-ban funkcionálisan aktív formában expresszáltuk.

3.5 Következtetések és javaslatok

A szteroid gyógyszerszintézisek kulcsintermedierjeit növényi szterinek, elsősorban a szójaolajból kivont szitoszterin szelektív, mikrobiológiai oldallánc lebontásával állítják elő. Az ipari fermentációs eljárásokban a biokonverzióra többnyire a szterineket szénforrásként hasznosító mikobaktériumokat használják.

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

1. A szterin-oldallánc lehasadása láncvégi oxidációval kezdődik és a kialakuló szteroid-karbonsav a zsírsavakra jellemző β -oxidációs mechanizmussal bomlik le. A szitoszterin oldalláncának lebomlása 9 enzim részvételével 16 lépésben történik.
2. A szterinek vázának 3β -hidroxi-5,6-dehidro-szerkezete először 3-keto-4-én-struktúrájává alakul, ezt követően a baktérium hidroxil-csoportot épít be 9α -helyzetbe, és dehidrogénezéssel 1,2-helyzetű kettőskötést képez. A kialakuló 9α -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.

Bár a szitoszterin-oldallánc lebomlás biokémiai folyamata ismert, azonban az egyes lépéseket katalizáló enzimek szerkezete és az őket kódoló gének kromoszómán való elhelyezkedése még felderítetlen. Az iparban hosszú ideje alkalmazásban lévő szitoszterin-oldallánc lebontási eljárások jelentős fermentációs technológiai továbbfejlesztése már nem várható. Az eljárások gazdaságosságának fokozása az átalakítás során alkalmazott szitoszterin szubsztrátum-koncentráció további növelésével és a konverzió fokozásával, elsősorban az oldallánc lebontás sebességmeghatározó lépéseiben érintett enzimek működésének fokozásával érhető el.

A DNS szekvenálási technika fejlődésével egyre több genomszekvenálási 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* genomialis 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 Tn611 transzpozont hordozó pCG79 plazmid DNS-el megvalósított inszerciós mutagenézis, továbbá a mutánsok miniatürizált tenyészeiben 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.

4 ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 Baktériumtörzsek, plazmidok és kozmid vektorok

Transzpozon mutagenézisre használt szterinátalakító törzs a *Mycobacterium smegmatis* mc²155⁷³, illetve a *Mycobacterium phlei* M51-Ept, mely a *Mycobacterium phlei* M51 plazmiddal hatékonyan transzformálható fenotípusú törzse volt (GYKI Tözsgyűjtemény). A szterinlebomlási metabolizmus blokkmutánsai, a *Mycobacterium smegmatis* 10A12 és a *Mycobacterium phlei* 3B7, 5G4 és 10G9 mindegyike a GYKI Tözsgyűjteményében lett letétbe helyezve. Az *Escherichia coli* XL1-Blue, LE 392 és BL21(DE) gazdatörzseket a Stratagene (La Jolla, Kalifornia) és Novagene Inc. (Egyesült Államok) vállalatoktól vásároltuk. A *Mycobacterium* törzseket Middlebrook 7H9 folyadék táptalajon kiegészítve azt albumin-dextróz-katalázzal és 0.05% Tween-80-nal (M-ADC-TW) 37 °C-on rázatással szaporítottuk, illetve 7H11 agar táptalajon oleinsav-albumin-dextróz-kataláz és 0.05% glicerin (M-OADC-G) kiegészítéssel szaporítottuk a gyártó ajánlásaiban foglaltak szerint (Difco). A pYUB18 jelű kozmid vektort W. R. Jacobs Jr. (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York)⁷⁴ biztosította számunkra. A Tn611 transzpozont hordozó pCG79 vektor B. Gicquel (Unité de Génétique Mycobacterienne, Institute Pasteur, Párizs, Franciaország)⁸² küldte el munkánkhoz. A higromicin rezisztencia markert hordozó pOLYG jelű *E. coli-Mycobacterium* ingázó vektor P. O’Gaora (Imperial College School of Medicine at. St.Mary’s, London, Anglia)⁷⁷ ajándéka volt. Rekombináns fehérjék *E. coli*-ban való klónozására és expressziójára kifejlesztett pET-28a(+) vektort a Novagen Incorporation-tól (Egyesült Államok) vásároltuk. A fehérjeexpressziót a gyártó cég által javasolt módszer szerint végeztük. A fent leírt baktérium törzsek és plazmidok jellemző tulajdonságait a 2. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat Baktérium törzsek és plazmidok

Baktérium törzsek / Plazmidok	Eredet	Táptalajok / Jellemzők
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc2155	W. R. Jacobs Jr. ajándéka	
<i>Mycobacterium phlei</i> M51 <i>Mycobacterium smegmatis</i> 10A12 <i>Mycobacterium phlei</i> 3B7 <i>Mycobacterium phlei</i> 5G4 <i>Mycobacterium phlei</i> 10G9	GYKI Törzsgyűjtemény	M-ADC-TW M-OADC-G
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue <i>Escherichia coli</i> LE 392 <i>Escherichia coli</i> BL21(DE)	Novagen Incorporation	LB
pYUB18	W. R. Jacobs Jr. ajándéka	<i>E. coli</i> - <i>Mycobacterium</i> kozmid vektor (km ^r)
pCG79	B. Gicquel ajándéka	Tn611-et hordozó <i>E. coli</i> - <i>Mycobacterium</i> plazmid vektor (km ^r)
pOLYG	P. O'Gaora ajándéka	<i>E. coli</i> - <i>Mycobacterium</i> plazmid vektor (hig ^r)
pET-28a(+)	Novagen Incorporation	<i>E. coli</i> expressziós vektor (km ^r)

M-ADC-TW: Middlebrook 7H9 folyadék táptalaj kiegészítve 10% albumin-dextróz-katalázzal és 0.05% Tween-80-nal (Difco); **M-OADC-G:** Middlebrook 7H11 agar táptalaj kiegészítve 10% oleinsav-albumin-dextróz-katalázzal és 0.05% glicerin (Difco); **Km^r:** kanamicin szelekciós marker; **hig^r:** higromicin rezisztencia marker.

4.2 Kromoszómális DNS izolálása *Mycobacterium smegmatis*-ből

Kromoszómális DNS-t *Mycobacterium smegmatis* mc²155-ből és 10A12 jelű mutánsából izoláltunk az alábbiak szerint:

A baktériumsejteket 10 ml, 24 órán át szaporított tenyészetből centrifugálással kiülepítettük és 550 µl, 10 mg/ml lizozim tartalmú Tris-EDTA pufferben szuszpendáltuk. 37°C-on 1 órán keresztül végzett inkubálást követően 70 µl, 10%-os nátrium-dodecil-szulfát és 6 µl, 10 mg/ml töménységű proteináz K oldatot adtunk hozzá, a sejteket forgatással homogenizáltuk, majd 65°C-on 10 percig inkubáltuk. Ezt követően 100 µl, 5 M NaCl-t kevertünk a reakcióelegyhez, majd 80 µl hexadecil-trimetil-ammónium-bromidot (CTAB-NaCl) adagoltunk, alaposan összekevertük, majd 65°C-on 10 percig inkubáltuk. (A CTAB-NaCl-t a következők szerint készítettük: 4,1 g NaCl-t oldottunk 80 ml desztillált vízben keveréssel, majd 10 g CTAB-t adagoltunk hozzá, az oldatot 65°C-ra melegítettük, majd a

térfogatot 100 ml-re egészítettük ki desztillált vízzel.) Kloroform-izoamil-alkohol 24:1 eleggyel végzett extrakció után a DNS-t 0,6 térfogatrész izopropanollal csaptuk ki, majd centrifugálással összegyűjtöttük, 70%-os alkohollal mostuk, végül 12 µl Tris-EDTA pufferben szuszpendáltuk.

4.3 *Mycobacterium inszerciós mutáns könyvtárak előállítása*

A szterinlebontó *Mycobacterium* törzsek inszerciós mutáns könyvtárainak előállítása céljából a Tn611 transzpozont hordozó pCG79 jelű plazmidot juttattuk a baktériumtörzsekbe elektroporációs módszerrel a 3.4 pontban leírtak szerint. A transzpozon mutagenézis kiváltásához a transzformánsokat Middlebrook M-ADC-TW (Difco) folyadék táptalajon 10 µg/ml kanamicin jelenlétében 30°C-on, 48 óráig szaporítottuk, majd a kapott tenyészet egy aliquotját 100-szorosára hígítottuk antibiotikum nélküli táptalajjal és a szaporítást 39°C-on, 24 óráig folytattuk tovább. Emelt hőfokon, antibiotikum szelekció nélkül a *Mycobacterium* sejtekben jelenlevő pCG79 jelű plazmid DNS a kromoszómába integrálódik. Ezután a tenyészeteket 20 µg/ml kanamicinnel kiegészített, illetve antibiotikum nélküli M-OADC-G (Difco) agar táptalajra szélesztettük hígítási sorban, majd 39°C-on, 5-7 napig inkubáltuk. Szelektív táptalajon 10^2 - 10^3 /ml, kanamicin nélküli táptalajon 10^7 - 10^8 /ml telep növekedett.

4.4 *Nagy-áteresztőképességű szűrő módszer*

Nagy-áteresztőképességű szűrő módszert fejlesztettünk ki a mutáns könyvtárak levizsgálására mikrotiter lemezekon, hogy a szterin lebontási útban gátolt mutánsokat izoláljunk. Ez β-szitoszterin jelenlétében végzett fermentáción alapult, amelynek legfontosabb lépése a vízben nem oldódó szterin szubsztrátum táptalajban történő diszpergálása volt. A biokonverzióhoz a 0.05% Tween-80 tartalmú M-ADC-TW táptalaj használtuk, amelyhez 200 µg/ml végkoncentrációban adagoltunk β-szitoszterint az alábbiak szerint.

20 miligramm β-szitoszterint oldottunk 1 ml etanolban forralással, amit 100 ml, 70-75°C-ra melegített M-ADC-TW táptalajhoz adagoltuk intenzív keverés közben, majd szobahőmérsékletre hűtöttük. Az így nyert táptalaj a β-szitoszterint nagyon finom szemcséjű szuszpenzió formájában tartalmazta, amely alig ülepedett. A szuszpenzió 200 µl térfogatú aliquotjait 96-lyukú mikrotiter lemezekbe (Greiner gyártmányú, sík aljú, 250 µl térfogatú)

osztottuk szét többcsatornás pipetta segítségével. A könyvtárakból származó egyedi inszerciós mutánsok telepeit, amelyek M-OADC-G agar lemezeken nőttek 20 µg/ml kanamicin jelenlétében, steril fogvájóval átvittük a lyukakba. Ezután a beoltott mikrotiter lemezeket lefedtük, majd műanyag fóliába csomagoltuk a bepárlódásuk megakadályozása végett. A szitoszterin transzformációja a mutánsok növekedése közben, 250 rpm rázatás mellett, 5 nap alatt ment végbe a „minifermentorok”-ban 32°C-on, amely a szitoszterin átalakítás optimális hőmérséklete. A törzsek szitoszterin átalakító képességét a fermentlevekben felhalmozódott átalakítási termékek vékonyrétegekromatográfiás analízisével határoztuk meg.

4.5 Elektroporáció

A *Mycobacterium smegmatis* és *Mycobacterium phlei* törzsek hatékony transzformálására elektroporációs módszert alkalmaztunk, amelyet a következők szerint végeztünk el.

- 1) A transzformálni kívánt törzs ferde agar tenyészetéről desztillált vízzel lemosott sejtuszpenziójával 1 liter M-ADC-TW (Difco) folyékony táptalajt oltottunk. A beoltott táptalajt 37°C-on, 48 órán keresztül, rázatás mellett szaporítottuk, amíg a tenyészet optikai denzitása 600 nm-en (A_{600}) elérte a 0,5-1,0 értéket.
- 2) A tenyészetet 250 ml-es centrifugacsövekben 10 percen keresztül 15000g rcf centrifugális erőterben üleptítettük 4°C-on. A felülúszót elöntöttük.
- 3) Az üledéket 10 ml 10%-os hideg glicerinben szuszpendáltuk, egyesítettük a szuszpenziókat, majd újabb 10 percen keresztül 1500g rcf alkalmazásával centrifugáltuk 4°C-on. A glicerinnel történő mosást még egyszer megismételtük.
- 4) Az üledéket végül 1 ml 10%-os glicerinben szuszpendáltuk. Ezután a sejteket Eppendorf csőben 200 µl-es adagokra osztottuk, és -20°C-on fagyasztva tároltuk, illetve a frissen készült sejtekkel végeztük az elektroporációt.
- 5) A sejtuszpenzió 200 µl-éhez maximálisan 5 µl térfogatban 5 pg - 5 µg koncentrációban adtuk a transzformáláshoz alkalmazni kívánt DNS-t, pipettázással összekevertük, majd 1 percre jeges vízbe helyeztük a csöveket.
- 6) Az elektroporációs készüléket (Bio-Rad, Richmond, Kalifornia) a következő paraméterekkel állítottuk be: 2500 V, 25 µF, 1000 ohm. A DNS-t és a sejteket tartalmazó szuszpenziót 0,2 cm elektróda távolságú elektroporációs küvettákba (Bio-

Rad) vittük át, a küvettákból a buborékokat eltávolítottuk, és a sejteket a küvetta aljába gyűjtöttük a küvettát óvatosan az asztallaphoz ütögetve.

- 7) A küvettát az elektroporációs készülékbe helyeztük, és egy impulzust alkalmaztunk. Az időállandó 15-25 msec volt.
- 8) Az elektroporációt követően 1 ml, jégen tartott M-ADC-TW folyékony táptalajt adtunk a sejtekhez, és felszuszpendálás után 37°C-on, 3 órán keresztül inkubáltuk az antibiotikum rezisztencia gén expressziója érdekében. Ezután a sejteket szelektív, az alkalmazott rezisztencia markertől függően 20 µg/ml kanamicin, vagy 50 µg/ml higromicin tartalmú M-OADC-G agar táptalajra terítettük.

4.6 Southern-blot hibridizáció

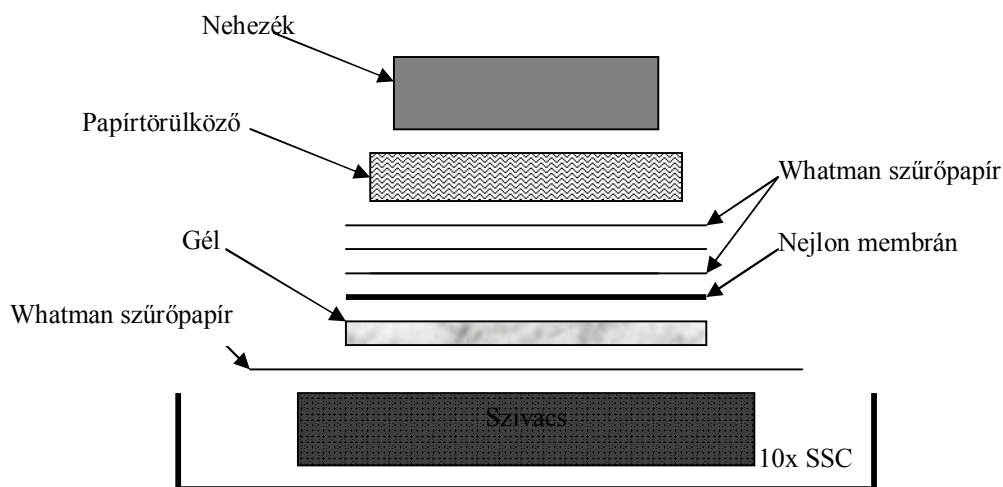
Egy bizonyos szekvenciának a genomiális DNS-ben való azonosítására Southern-blot hibridizációt alkalmaznak. Ezen eljárás során a genomiális DNS-t egy vagy több restrikciós enzimmal elhasítják, a képződő fragmentumokat molekulaméret alapján gélelektroforézissel elválasztják, majd a DNS fragmentumokat a gélen elfoglalt helyzetük megtartásával nitrocellulóz vagy nejlon membránra viszik át. A membránt ezt követően radioaktívan jelölt DNS vagy RNS próbával hibridizálják, és a radioaktív próbával hibridizáló DNS-sáv azonosítja a keresett DNS szekvenciát a membránról készített autoradiogramon.

Kísérleti munkánkban Southern-blot hibridizáció alkalmazásával bizonyítottuk a *Tn611* transzpozon inszerció random jellegét a *M. smegmatis mc²155* és *M. phlei* M51-Ept szülői törzsekben. E munka során a *M. smegmatis mc²155* és a *M. phlei* M51-Ept inszerció mutáns törzsekből kromoszómális DNS-t izoláltunk, majd *Pst*I restrikciós enzimmal végzett hasítás után a fragmentumokat agaróz gélelektroforézissel választottuk el. A DNS nejlon membránhoz történő rögzítését követően ³²P izotóppal jelzett pCG79 próba DNS-el végeztük a hibridizációt.

Southern-blot hibridizációt alkalmaztunk továbbá a pFJ92 plazmid izolálásánál és térképezésénél.

4.6.1 DNS kapilláris transzfer nejlon membránra

- 1) Elektroforézist követően az agaróz gél egyik sarkát levágtuk, hogy a későbbi műveletek során a gél orientációja azonosítható legyen, majd 25 percen keresztül denaturációs oldatban (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl) áztattuk a gél a benne lévő DNS denaturálása érdekében. Az oldat lecserélése után további 25 percig áztattuk a gél ugyanilyen oldatban.
- 2) A gél lassú rázatas mellett 30 percig semlegesítő oldatba (1 M Tris-HCl pH 7,4, 1,5 M NaCl) helyeztük, hogy a lugot közömbösítsük és a pH-t neutrális tartományba állítsuk. Friss semlegesítő oldatban további 15 percig áztattuk a gél.
- 3) Közben a nejlon membránt (HybondN+, Amersham) legalább 30 percre transzfer oldatba [10x SSC (1,5 M NaCl, 0,15 M Na-citrát. pH 7,0)] merítettük. A membrán sarkát a gélhez hasonlóan levágtuk.
- 4) A gélből az így denaturált DNS-t kapilláris hatás segítségével a membránra vittük át a következő elrendezésben.



- 5) A blotolást egy éjszakán keresztül végeztük 10x SSC oldatban.
- 6) A gél a membránról leválasztottuk, majd eldobtuk. A membránt nedvesen UV transzilluminátorra helyeztük és egy perces UV besugárzással az egyszálú DNS-t kovalens kötéssel a membránhoz rögzítettük. A membránt 6x SSC oldatban leöblítettük és papírtörülközőn szobahőmérsékleten legalább 30 percen keresztül szárítottuk.

4.6.2 ³²P izotóppal jelzett pCG79 plazmid hibridizációja a nejlon membránhoz rögzített DNS-hez

- 1) A kiszárított nejlon membránt 6x SSC oldatban történő úsztatással átnedvesítettük, majd 2 percre a folyadék felszíne alá nyomtuk.
- 2) A nedves membránt hővel leforrasztható műanyag zacskóba csúsztattuk és a membrán felületének minden egyes négyzetcentimétere után 0,2 ml prehibridizációs oldatot mértünk a hozzá, majd levegő kiszorítása után a zacskót fóliahegesztővel lezártuk. Ezt követően zacskókat 68°C-os vízfürdőbe helyeztük és két órán keresztül inkubáltuk.

Prehibridizációs oldat:

6x SSPE (20x SSPE: 3 M NaCl, 200 mM NaH₂PO₄, 20 mM EDTA, pH 7,4)
 5x Denhardt-féle reagens (50x Denhardt-féle reagens: 1% Ficoll 400,
 1% polivinil-pirrolidon, 1% marha szérumalbumin (V. frakció, Sigma)
 0,5% SDS
 100 µg/ml denaturált, fragmentált lazac spermium DNS

- 3) A radioaktívan jelölt pCG79 póba-DNS-t 100°C-on, 5 percig végzett hőkezeléssel denaturáltuk, majd azonnal jeges vízfürdőbe helyeztük. A prehibridizáció befejeztével a nejlon zacskó egyik sarkát ollóval levágtuk és prehibridizációs oldatot maradéktalanul eltávolítottuk, majd azonos térfogatú hibridizációs oldatot töltöttünk rá.

Hibridizációs oldat:

6x SSPE
 0,5% SDS
 100 µg/ml denaturált, fragmentált lazac spermium DNS

A hibridizációs oldathoz pCG79 póba-DNS-t adtunk 10 ng/ml végkoncentrációban. A légbuborékok eltávolítása után a zacskót hegesztőgépen ismét lezártuk, majd egy második biztonsági zacskóba is bezártuk, és a hibridizációt 68°C-on 12 órán keresztül végeztük lassú rázatás mellett.

- 4) A hibridizációt követően a filterek mosását, szárítását és a radioaktív hibridizáló DNS Röntgen filmen való megjelenítését a 4.8.2 fejezetben leírtak szerint végeztük.

4.7 DNS könyvtárkészítés a *Mycobacterium smegmatis* mc²155 törzsből

Genomiális DNS-t izoláltunk *M. smegmatis* mc²155 törzsből, majd *Sau3A1* restrikciós endonukleázzal részlegesen emésztettük, és a kapott 35-40 kb mérettartományba eső fragmentumokat szacharóz gradiens centrifugálással (4.7.1 fejezet) izoláltuk, majd a *BamHI*-gyel linearizált és alkalikus foszfatáz kezelt pYUB18 kozmid vektor ötvenszeres feleslegével ligáltuk. A ligációs keveréket a λ bakteriofág fejbe pakoltuk Gigapack pakoló extrakt (Stratagene La Jolla, Kalifornia) segítségével, majd 25 μ g/ml kloramfenikol tartalmú LB táptalajra szélesztettük. A kloramfenikol rezisztens transzformánsok a *M. smegmatis* mc²155 kromoszómális DNS-nek egy-egy nagyméretű szegmensét tartalmazták a pYUB18 kozmid vektorban klónozva.

4.7.1 DNS molekulák méret szerinti elválasztása szacharóz gradiens centrifugálással

Szacharóz gradiens centrifugálást a *M. smegmatis* 10A12 inszerciós mutánsban kromoszómálisan integrálódott pCG79 plazmid kinyerésénél, illetve a *M. smegmatis* mc²155 törzs genomiális génkönyvtárának készítésénél alkalmaztunk.

Szacharóz gradiens centrifugálással a pCG79 plazmid kromoszómából történő visszaizolálásánál a *M. smegmatis* 10A12 inszerciós mutáns *NotI* enzimmel emésztett kromoszómális DNS-ét, illetve a génkönyvtár készítésénél *Sau3A1* restrikciós enzimmel részlegesen emésztett *M. smegmatis* mc²155 törzs kromoszómális DNS-ét tisztítottuk.

Mindkét esetben 100 μ g DNS-t (100 μ l) adtunk 12 ml 10-40%-os TEN pufferben (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) készített szacharóz gradiensre.

Szacharóz gradiens készítéséhez 6 ml 40%-os, TEN pufferben készített szacharóz oldatot centrifugacsőbe pipettáztunk, majd óvatosan a tetejére rétegeztük 6 ml 10%-os TEN-szacharóz oldatot. A csövet dugóval szorosán lezártuk, és vízszintes helyzetben fektettük szobahőmérsékleten 3-4 órán keresztül, majd az inkubálást követően óvatosan függőlegesre állítottuk.

Az így elkészített szacharóz gradiensen a DNS-t 35000 rpm fordulatszámmal 16 órán keresztül centrifugáltuk 17°C-on Beckman SW41, kilendülő rotorban. A centrifugálást követően kapillárisal 400 μ l-es frakciókat vettünk a centrifugacső aljáról. A DNS méretét a

frakciók 5 µl-ének agaróz gélelektroforézissével ellenőriztük, molekulatömeg standardként *HindIII* enzimmal emésztett λ- DNS-t használtunk.

A megfelelő frakcióhoz 200 µl TE puffert adtunk. A DNS-t azonos térfogatú izopropanollal kicsaptuk, mostuk, szárítottuk, és 50 µl TE pufferben feloldottuk.

4.8 Telephibridizáció

A natív 9α-hidroziláz gént hordozó DNS régió izolálása céljából a *Mycobacterium smegmatis* mc²155 génkönyvtárát telep-hibridizációs módszerrel szűrtük. Az eljárás egyedi telepek „*in situ*” lízisen, a sejtekből kiszabaduló DNS membrán filterhez történő rögzítésén és a DNS-minták alkalmas próba-DNS-el végzett hibridizációs szűrővizsgálatán alapul. Esetünkben hibridizációs próbaként a pFJ92 vektor kromoszómális régiójának két szakaszát használtuk.

4.8.1 Telepek lízise és a DNS membránhoz kötése

- 1) 20 cm átmérőjű Petri csészében lévő 80ml, 25 µg/ml kloramfenikol tartalmú LB agar táptalajra nejlon membránt (HybondTM-N, Amersham) helyeztünk, majd steril fogvájóval a *Mycobacterium smegmatis* mc²155 jelű törzset reprezentáló génkönyvtárból 320 egyedi telepet oltottunk rövid csíkokban a membrán felületére szabályos elrendezésben. Összesen 960 klónt izoláltunk 3 Petri csészére. Minden klónt két párhuzamosan készült, membránnal fedett agar lemezre, és egy membrán nélküli mester lemezre oltottunk. Az így elkészített, összesen 9 Petri csészét 37°C-on egy éjszakán keresztül inkubáltuk.
- 2) 4 db, 22 cm átmérőjű kristályosító tálba 4-4 db Whatman 3MM szűrőpapírt helyeztünk egymásra, majd szűrőpapírokat az alábbi oldatokkal nedvesítettük:
 - i. 10% SDS
 - ii. Denaturáló oldat (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl)
 - iii. Semlegesítő oldat (1,5 M NaCl, 0,5 M TRIS, pH 7,4)
 - iv. 2x SSC

Az agar lemezekről a nejlón membránokat tompa végű csipesszel leválasztottuk, majd a kinőtt telepekkel felfelé először az SDS tartalmú oldatba helyeztük 3 percre, majd a denaturáló, semlegesítő és 2x SSC oldatokba helyeztük 5-5 percre.

- 3) A feltáró kezeléseket követően a membránokat még nedvesen UV transzilluminátorra helyeztük és egy perces UV besugárzással az egyszálú DNS-t kovalens kötéssel a nejlón membránhoz rögzítettük. Majd a membránokat szobahőmérsékleten 30 percig szárítottuk.
- 4) Az így nyert immobilizált DNS-mintákat a 4.8.2 pontban leírtak szerint hibridizáltuk a pFJ92 vektor kromoszómális régiójának végeinél levő, ^{32}P izotóppal jelölt *PstI-PstI* és *EcoRI-EcoRI* hasítóhelyekkel határolt DNS-el (lásd 15. ábra az 36. oldalon).

4.8.2 Hibridizáció a nejlón membránhoz rögzített telepek DNS-éhez

- 1) A hibridizációs membránokat 2x SSC-t tartalmazó edényben úszatva nedvesítettük, majd a folyadékba merítettük és 5 percig inkubáltuk.

A hibridizációs eljárás további lépései során mindvégig ügyeltünk arra, hogy a filterek ne száradjanak ki.

- 2) A nedvesített filtereket 300 ml előmosó oldatot tartalmazó kristályosító tálba tettük, és a tálat műanyag fóliával (Folpack) lefedtük a bepárlódás megakadályozása végett, majd kibillenő rázógépen, 50°C-os termosztátban, enyhe mozgatóással 30 percig inkubáltuk.

Előmosó oldat:

5x SSC

0,5% SDS

1 mM EDTA (pH 8,0)

- 3) A membrán felületére esetlegesen feltapadó sejtörmelékelt előmosó oldattal átnedvesített szintetikus törlőkendővel eltávolítottuk.
- 4) Inkubálást követően a membránokat egyenként 50 ml prehibridizációs oldatot tartalmazó műanyag (PE) zacskóba helyeztük, majd a levegőt kiszorítva a zacskóból fóliahegesztővel lezártuk. A zacskókat 68°C-os vízfürdőbe helyeztük és 2 órán keresztül inkubáltuk.

Prehibridizációs oldat:

6x SSPE

0,05x BLOTTO

1x BLOTTO: 5% zsírmentes szárított tehéntej (non-fat dried milk bovine, Sigma)
0.02% nátrium-azidot tartalmazó vízben oldva.

- 5) A prehibridizáció befejezése előtt 10-15 perccel a radioaktívan jelölt *PstI-PstI*, illetve *EcoRI-EcoRI* enzimekkel nyert duplaszálú kromoszómális DNS molekulákat (lásd 4.9 fejezet) 100°C-on 5 percig végzett inkubálással egyszálúvá alakítottuk (denaturáltuk). A hőkezelést követően azonnal jeges vízfürdőbe helyeztük a mintákat a bázispárosodás (renaturáció) megakadályozása végett.
A prehibridizációt követően a membránokat tartalmazó zacskók sarkait ollóval levágtuk, majd a mintegy 1,0 µg/ml koncentrációjú, $>1 \times 10^8$ cpm specifikus aktivitású próba-DNS oldatokból 20-20 µl-t adtunk a prehibridizációs oldatokhoz úgy, hogy a párhuzamosan készített membránok egyikébe a *PstI-PstI*, a másika pedig az *EcoRI-EcoRI* próba kerüljön. Ezt követően a zacskókat fóliahegesztőgépen ismét lezártuk, majd egy második biztonsági zacskóba is bezártuk és a hibridizációt 68°C-on, 18 órán keresztül végeztük.
- 6) A hibridizációt követően a filtereket nagy térfogatú (500 ml) 2x SSC és 0,1% SDS tartalmú oldatba merítettük, és gyenge rázatás mellett szobahőmérsékleten 15 percig inkubáltuk, majd a mosási lépést friss oldatokkal kétszer megismételtük.
- 7) A szobahőn végzett mosást követően a filtereket még kétszer mostuk 1x SSC és 0,1% SDS tartalmú oldatokkal 68°C-on.
- 8) A membránfiltereket szűrőpapíron, szobahőmérsékleten megszáritottuk, majd műanyag fóliára (Folpack) helyeztük ügyelve a mesterlemezekkel egyértelműen azonosítható elrendezésre.
- 9) A filtereket egy második réteg műanyag fóliával (Folpack) lefedtük és röntgen filmre (Kodak XAR-2) helyezve -70°C-on 16 órán keresztül exponáltuk.
- 10) Exponálás után előhívtuk a filmeket és beazonosítottuk a mindkét próba-DNS-el pozitív hibridizációs jelet adó *E. coli* klónokat.
- 11) A kettős pozitív hibridizációs jelet adó, 9α-hidroziláz gént hordozó *E. coli* klónokat a mesterlemezekről 100 µg/ml kloramfenikol tartalmú LB folyadék táptalajra oltottuk és 37°C-on felszaporítottuk, majd 20%-os végkoncentrációban glicerint adagoltunk a tenyészethez és aliquotokban -20°C-on tároltuk.

4.9 DNS jelölése ³²P-izotóppal random primerek alkalmazásával

A pCG79 jelű plazmid DNS, illetve a pFJ92 vektor kromozómális régiójának végeinél levő, *Pst*I-*Pst*I és *Eco*RI-*Eco*RI hasítóhelyekkel határolt DNS-szakasz radioaktív jelöléséhez a DNS-t forró vízfürdőben denaturáltuk, a szétválasztott DNS két szálához random szekvenciájú hexanukleotidokatanneláltunk, majd Klenow-fragmentum DNS polimeráz I enzimmal az oligonukleotidokból kiindulva DNS-t szintetizáltunk egy radioaktívan jelölt nukleotiddal és három jelöletlen nukleotiddal.

- 1) A jelölendő DNS-ből 50 ng mennyiséget 45 µl TE pufferben egy Eppendorf csőben felhígítottuk.
- 2) A DNS-t 3 percig forraltuk, majd rögtön jeges vízbe helyeztük, hogy egyszálú DNS-t állítsunk elő.
- 3) A denaturált DNS-t a Rediprime labeling kit (Amersham), egy Eppendorf csőben előkészített, liofilizált reakcióelegyéhez adtuk, hogy annak tartalmát feloldjuk. A reakcióelegyet, amely nem tartalmazta a radioaktívan jelzett nukleotidot jégre helyeztük.
- 5) 5 µl, α-helyzetben ³²P-vel radioaktívan jelölt, 3000 Ci/mM aktivitású dCTP (³²P-dCTP, Amersham) adtunk hozzá.
- 4) A komponenseket pipettázással kevertük össze, és 37°C-on 10 percig inkubáltuk.
- 5) A jelölt DNS-t három percre forrásban lévő vízbe helyeztük, hogy a DNS-t denaturáljuk, majd jeges vízfürdőben 5 percig inkubáltuk.
- 6) A radioaktívan jelzett DNS-t egy Sephadex G-50 (Amersham) mini oszlopon a beépületlen ³²P-dCTP-től elválasztottuk.

4.10 DNS szekvenálás

A 9α-hidroxilezésért felelős *M. smegmatis* genomiális DNS szakaszt szubklónoztuk a pBluescript II SK(+) (Stratagene, La Jolla, Kalifornia) vektorba, majd az inszertált kromozómális DNS-t PCR technikával sokszoroztuk. A PCR termékeket agaróz gélből tisztítottuk és ezt használtuk templátként a fluoreszcens DyeDeoxy módszerrel történő szekvenáláshoz (ABI PRISM dye terminator cycle sequencing core kit; Applied Biosystems, USA), amelyet a Crosslink kft. végzett el számunkra.

4.11 **Egyéb molekuláris biológiai módszerek**

Az *in vitro* DNS módosításhoz Hopwood és munkatársai¹⁰⁵, illetve Sambrook és munkatársai¹⁰⁶ által kidolgozott módszereket használtuk, ott ezt külön nem jeleztük. A National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD internetes honlapján található Blast és „ORF finder” programját használtuk a nukleotid-, vagy fehérjeszekvenciák adatbázisokban található szekvenciákkal való összehasonlítására, illetve a lehetséges ORF-ek meghatározására az izolált DNS szekvencián.

4.12 **Vékonyrétegekromatográfiás analízis**

A mikrotiter lemezek egyes lyukaiból, ill. a rázott lombikokból származó fermentlevekből 10 μ l-t csöppentettünk vékonyrétegekromatográfiás lemezekre (Kieselgel HF₂₅₄₋₃₆₆; Merck) egy, vagy többcsatornás automata pipetta segítségével és a lemezeket etilacetát-n-hexán (7:3, térf/térf) eluenssel fejlesztettük ki. A detektálást UV fényben végeztük, ill. a β -szitoszterin (I) jelenlétét 30%-os, metanollal hígított kénsavval mutattuk ki enyhe melegítést követően. Így β -szitoszterinből a következő mikrobiológiai lebontási termékeket mutattuk ki: 4-androsztén-3,17-dion (II), 1,4-androsztadién-3,17-dion (III), 9 α -hidroxi-4-androsztén-3,17-dion (IV), 17 β -hidroxi-4-androsztén-3-on (V), 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), és 3-hidroxi-9,10-szeko-1,3,5(10)-androsztatrién-9,17-dion (IX). Az R_f értékek közelítőleg az alábbiak: I, 0,77; II, 0,70; III, 0,61; IV, 0,41; V, 0,56; VI, 0,66; VII, 0,85; VIII, 0,82; IX, 0,78.

4.13 **HPLC analízis**

Az inszerciós mutánsokkal szitoszterinből nyert átalakítási termékeket, továbbá a 4-androsztén-3,17-dion, illetve az 1,4-androsztadién-3,17-dion 9 α -hidroxilezését a rekombináns törzsekkel, melyek a 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz enzim terminális oxigenáz komponensét expresszálják, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel analizáltuk. A transzformáns tenyészet egy aliquotját metanollal háromszorosára hígítottuk, majd vortex-szel homogenizáltuk és centrifugáltuk. A felülúszót, mely az oldott állapotba került szteroid

vegyületeket tartalmazta, fordított fázisú oszlopra, amelynek töltete Symmetry RP-18e (3,5 μm ; 4,6 x 100 mm; Waters), ill. egy biztonsági előtét oszlopra, melynek töltete RP-18e (3,5 μm ; 2,0 x 4,0 mm; Phenomenex) injektáltuk 2695 automata adagolóval (Waters, Milford, MA). Az oszlop hőmérsékletét 40°C-ra állítottuk. A mintákat 1,2 ml/perc térfogatárammal 26 percig eluáltuk 15% tetrahidrofurán és lineáris 5-50% acetonitril gradiens vízben eluenssel. A II, III, IV, V, VI, VII, és VIII vegyületeket 996 diódasoros detektorral (Waters) monitoroztuk 240 nm-en. A fenti körülmények között a retenciós idők a következők voltak: II, 8,58 perc; III, 6,42 perc; IV, 3,72 perc; V, 8,85 perc; VI, 15,18 perc; VII, 20,05 perc; VIII, 20,50 perc. IX-et 280 nm-en monitoroztuk, ugyanazt a detektort használva, és a retenciós idő 9,48 perc volt.

4.14 Szitoszterin transzformációs termékek azonosítása

Mutáns és rekombináns *Mycobacterium* törzsek lebomlási termékeit 5 liter, 200 $\mu\text{g/ml}$ szitoszterin tartalmú M-ADC-TW táptalajon, 500 ml-es rázott lombikban előállított tenyészetéből izoláltuk. A fermentlevek etilacetáttal nyert extraktumait szárazra pároltuk és a lebomlási termékeket oszlopkromatográfiás módszerrel (szilikagél adszorbens; etilacetát-n-hexán eluens, növekvő etilacetát gradiens) és preparatív vékonyrétegkromatográfiás módszerrel (Kieselgel HF₂₅₄₋₃₆₆ adszorbens; kifejlesztő rendszer a fentebb leírt, a vegyületeket az adszorbensről metanollal eluáltuk) tisztítottuk.

A szteroid gyógyszer-szintézis kulcsintermedierek: a 4-androsztén-3,17-dion (II), az 1,4-androsztadién-3,17-dion (III), 9 α -hidroxi-4-androsztén-3-17-dion (IV) és a tesztoszteron hormon (V) azonosítását kromatográfiás analízissel és spektroszkópiai módszerekkel, standard vegyületek adataival történt összehasonlítás alapján végeztük.

A szakirodalomban leírt vegyületeknek bizonyultak a szitoszterin oldalláncának részleges lebontásával keletkező termékek: a 22-hidroxi-23,24-dinor-4-kolén-3-on (VI)^{28,107,108,109,110}, 3-oxo-23,24-dinor-4,17(20)-koladién-22-sav-metilészter (VII)^{101,111,112,113}, és a 3-oxo-23,24-dinor-4-kolén-22-sav-metilészter (VIII)^{28,101,107,108}, valamint a vázbontási termék: a 3-hidroxi-9,10-szeko-1,3,5(10)-androsztatrién-9,17-dion (IX)^{4,114}. Ez utóbbiak szerkezetét bizonyító magmágneses rezonancia (NMR) és tömegspektroszkópiai (MS) adatokat az alábbiakban adjuk meg.

NMR spektroszkópia. A ^1H és ^{13}C NMR spektrumokat 300 K-en, Bruker Avance 500 spektrométeren CDCl_3 -ban, tetrametilszilán és CDCl_3 (77.2 ppm) belső referencia standardok jelenlétében, 500.1 (tetrametilszilán) és 125.8 (CDCl_3) MHz frekvencián vettük fel. A vegyületek szerkezetmeghatározásához egydimenziós ^1H , ^{13}C , DEPT és két-dimenziós ^1H , ^1H COSY, ^1H , ^{13}C -HSQC és ^1H , ^{13}C -HMBC módszerek kerültek felhasználásra.

Tömegspektroszkópia. Elektronionizációs (EI) méréseket az alábbiak szerint végeztük: Finningan Polaris Q tömegspektrométer, inlet rendszer: direkt, ionizációs mód EI (+); forrás hőmérséklet: 250°C; elektronenergia: 70 eV. APCI mérés: Finningan LCQ tömegspektrométer; alkalmazási mód: direkt inlet; ionizációs mód: APCI (+); forrás hőmérséklet: 25°C.

22-hidroxi-23,24-dinor-4-kolén-3-on (VI):

^1H NMR: $\delta = 5.73$ s, br (H-4); $\delta = 3.64$ dd, $J_1 = 10.5$ Hz, $J_2 = 3.3$ Hz és $\delta = 3.37$ dd, $J_1 = 10.5$ Hz, $J_2 = 6.9$ Hz (CH_2OH); $\delta = 1.6$ - 1.5 m (H-20); $\delta = 1.19$ s (CH_3 -19); $\delta = 1.05$ d, $J = 6.9$ Hz (CH_3 -21); $\delta = 0.74$ s (CH_3 -18).

^{13}C NMR: $\delta = 199.8$ (C-3); 171.7 (C-5); 124.0 (C-4); 68.1 (CH_2OH); 38.8 (C-20); 17.6 (CH_3 -19); 16.9 (CH_3 -21); 12.2 (CH_3 -18).

MS: EI: 330 $[\text{M}]^+$, 124 $[\text{ring A} + \text{C}_6 + 2\text{H}]^+$; APCI: 331 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

3-oxo-23,24-dinor-4,17(20)-koladién-22-sav-metilészter (VII):

^1H NMR: $\delta = 5.75$ s, br (H-4); $\delta = 3.71$ s (OCH_3); $\delta = 2.83$ m és 2.65 m (CH_2 -16); $\delta = 1.96$ dd, $J_1 = J_2 = 2.0$ Hz (CH_3 -21); $\delta = 1.20$ s (CH_3 -19); $\delta = 0.98$ s (CH_3 -18).

^{13}C NMR: $\delta = 199.6$ (C-3); 171.1 (C-5); 170.2 (COOCH_3); 163.7 (C-17); 124.1 (C-4); 118.7 (C-20); 51.3 (OCH_3); 33.0 (C-16); 17.5 (CH_3 -19), 15.5 (CH_3 -18), 14.9 (CH_3 -21).

MS: EI: 356 $[\text{M}]^+$, 341 $[\text{M} \cdot \text{CH}_3]^+$, 324 $[\text{M} \cdot \text{CH}_3\text{OH}]^+$, 309 $[324 \cdot \text{CH}_3]^+$.

3-oxo-23,24-dinor-4-kolén-22-sav-metilészter (VIII):

^1H NMR: $\delta = 5.73$ s, br (H-4); $\delta = 3.66$ s (OCH_3); $\delta = 2.4$ m (H-20); $\delta = 1.20$ d, $J = 7.0$ Hz (CH_3 -21); $\delta = 1.19$ s (CH_3 -19); $\delta = 0.74$ s (CH_3 -18).

^{13}C NMR: $\delta = 199.7$ (C-3); 177.3 (COOCH_3); 171.4 (C-5); 124.2 (C-4); 51.5 (OCH_3); 42.6 (C-20); 17.6 (CH_3 -21); 17.3 (CH_3 -19); 12.3 (CH_3 -18).

MS: EI: 358 $[\text{M}]^+$, 343 $[\text{M} \cdot \text{CH}_3]^+$, 316 $[\text{M} \cdot 42]^+$, 229 $[\text{M} \cdot (\text{C}_{15}\text{-C}_{17}\text{+H})]^+$, 124 $[\text{ring A} + \text{C}_6 + 2\text{H}]^+$.

3-hidroxi-9,10-szeko-1,3,5(10)-androsztatrién-9,17-dion (IX):

^1H NMR: $\delta = 7.00$ d, $J = 8.1$ Hz (H-1); $\delta = 6.68$ d, $J = 2.7$ Hz (H-4); $\delta = 6.60$ dd, $J_1 = 8.1$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz (H-2); $\delta = 4.72$ s, br (OH); $\delta = 2.73$ m and $2.55 - 2.45$ m (CH₂-6); 2.60 m and $2.27 - 2.21$ m (CH₂-16); $\delta = 2.27$ s (CH₃-19); $\delta = 1.18$ s (CH₃-18).

^{13}C NMR: $\delta = 218.0$ (C-17), 210.6 (C-9), 153.7 (C-3); 141.9 (C-5); 131.2 (C-1); 128.0 (C-10), 115.7 (C-4), 112.7 (C-2), 47.5 (C-13), 36.1 (C-16), 31.0 (C-6), 18.4 (C-19), 13.5 (C-18).

MS: EI: 300 [M]⁺, 134 [ring A + C₆-C₇ - H]⁺, 121 [ring A + C₆]⁺.

5 ÖSSZEFOGLALÁS, SUMMARY

5.1 Összefoglalás

Az 1970-es évek végétől az olcsón és nagy mennyiségben hozzáférhető növényi eredetű szterinek kerültek előtérbe alapanyagként a szteroid gyógyszerek szintézisében. Jelenleg a szteroid gyógyszerek mintegy 65%-át szójaból nyert szitoszterinből állítják elő. A szitoszterinből a szterin-oldallánc szelektív, mikrobiológiai úton történő lebontásával nyernek kulcsintermediereket a szteroid gyógyszerek szintéziséhez.

A szterin-oldallánc lebomlása 9 enzim közreműködésével 16 lépésben valósul meg. A lebontás láncvégi oxidációval kezdődik, majd a létrejött szteroid karbonsav szénlánc a zsírsavakra jellemző β -oxidációs mechanizmussal fokozatosan rövidül és hasad le a szterán vázról.

A szterinek oldalláncának lebomlása után, esetleg azzal párhuzamosan a szteránváz is lebomlik. A 3-ketoszteroid- 9α -hidroxiláz egyik kulcsenzimje a szteránváz felhasadásához vezető reakcióútnak, melynek során a szteránvázon instabil 9α -hidroxi-1,4-dién-3-on-szerkezetű intermedier jön létre, ami spontán bomlik és B gyűrűben felhasadt 9,10-szekofenol-származékokat eredményez. A C_1 - C_2 helyzetben telített szteroid vegyületek 9α -hidroxilezése révén ugyanakkor előnyös intermedierek nyerhetők a kortikoszteroid gyógyszerek szintéziséhez. A 9α -hidroxilázt expresszáló, de a $\Delta 1$ -dehidrogenázban hiánymutáns *Mycobacterium* törzsszel 9α -hidroxi-4-androsztén-3,17-dion, a kortikoszteroid gyógyszerek, míg a 9α -hidroxiláz működésében gátolt, de a $\Delta 1$ -dehidrogenázt kifejező mikroorganizmussal az 1,4-androsztadién-3,17-dion, az ösztrogén hormonok és a fogamzásgátlók szintézis intermedierje nyerhető. Ebből következik, hogy a 9α -hidroxiláz enzim izolálása és molekuláris jellemzése döntő fontosságú a szitoszterin mikrobiológiai lebontásában.

A géntechnológiai módszerek mikobaktériumokra való alkalmazása az 1980-as évek végén kezdődött. A kutatásokat az ösztönözte, hogy a mikobaktériumok okozzák a világon a két legnagyobb halálozási arányú bakteriális fertőzést, a tuberkulózist és a leprát, valamint számos állati megbetegedést is. Kutatócsoportunk korán bekapcsolódott a mikobaktériumok területén induló géntechnológiai kutatásokba. Az első ingázó vektorok egyikét, a pYUB12

Mycobacterium-E. coli vektort Jekkel Antalné dr. állította elő a John Innes kutatási központban, ösztöndíjas tanulmányútján Norwich-ban, 1988-ban.

A gazda-vektor rendszerek mellett az inszerciós elemek is értékes eszközei a baktériumok genetikai analízisének. Különböző "mozgékony elem"-eket izoláltak mikobaktériumokból az elmúlt néhány évben. A Tn611 transzpozont hordozó pCG79 jelű hőérzékeny shuttle plazmid DNS alkalmazásával Guilhot és munkatársai 1994-ben létrehozták az első inszerciós mutáns könyvtárat *Mycobacterium smegmatis*-ban a Pasteur Intézetben.

Intézetünkben mi is megkíséreltünk transzpozon mutagenézist kiváltani a Pasteur Intézetből származó, kanamicin rezisztencia gént hordozó pCG79 jelű plazmiddal a szterin-átalakító *Mycobacterium* törzsekben. Célunk az volt, hogy a transzpozont hordozó vektor szterin-átalakító *Mycobacterium* törzsekbe juttatásával szterin-átalakító képességben blokkolt inszerciós mutánsokat állítsunk elő. Ilyen mutánsok birtokában ugyanis lehetőség nyílik a szterin-átalakítás génszintű vizsgálatára.

Inszerciós mutáns könyvtárakat állítottunk elő a szitoszterinből 4-androsztén-3,17-diont képző *M. phlei* M51-Ept jelű törzsből és a szitoszterint intermedier képződés nélkül teljesen lebontó *M. smegmatis* mc²155 jelű törzsből. Southern-blot analízissel bizonyítottuk, hogy a pCG79 plazmid DNS random módon integrálódott a kromoszómába.

Nagy-áteresztőképességű módszert fejlesztettünk ki a szterin-átalakító képességért felelős gének valamelyikében mutáns törzsek kiválasztásához. Nagyszámú inszerciós mutánst szaporítottunk szitoszterin jelenlétében mikrotiter lemezek lyukaiban és szterin-átalakító képességüket e „mini” fermentorokban felhalmozódott intermedierek vékonyréteggromatográfiás analízisével vizsgáltuk.

Összesen 4 törzset találtunk, melyek szterin lebontó enzimaktivitásai különböztek a szülői törzsekétől.

A *Mycobacterium smegmatis* mc²155-ben minden szterinlebontó enzim aktív és így a szitoszterint intermedier-képzés nélkül teljesen lebontja. A 10A12 jelű inszerciós mutánsa ellenben gátolt a 9 α -hidroxiláz működésében és ennek következtében a szteránváz épen marad, intermedierként pedig 1,4-androsztadién-3,17-dion képződik.

A 4-androsztén-3,17-diont termelő *Mycobacterium phlei* M51-Ept szülői törzsből képzett mutánsoknál az inszerció az oldallánc lebontóképességet befolyásolta. A *Mycobacterium phlei* 3B7 jelű törzs a szitoszterin-oldalláncot csak részlegesen bontja le és 23,24-dinorkolánváz vegyületeket képez az utolsó enzimatis lépések hiánya

következtében. Az általa termelt 3-oxo-23,24-dinor-4,17(20)-koladién-22-sav-metilészterből az intézetünkben kidolgozott új szintetikus eljárásokkal 4,16-pregnadién-3,20-dion és 17 α -hidroxi-4-pregnén-3,20-dion szteroid gyógyszerszintézis intermedierek nyerhetők.

A *Mycobacterium phlei* 5G4 és 10G9 azonos intermediereket, főtermékként tesztoszteront képez.

Transzpozon mutagenézis alkalmazásával hatékonyan tudunk beavatkozni a szterinlebontási út lépéseit kontrolláló gének működésébe oly módon, hogy azok egyúttal jelölődtek is a beépült transzpozonnal. Mindez lehetővé teszi a kromoszómán elhelyezkedő szterinlebontásban szerepet játszó gének feltérképezését.

A *Mycobacterium smegmatis* 10A12 inszerciós mutánst felhasználva klónoztuk, szekvenáltuk és molekulárisan jellemeztük a 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz enzim terminális oxigenáz komponensét.

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.

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

A 9 α -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 mutánst, helyreállt a 9 α -hidroxilező aktivitása, melynek következtében a szitoszterint intermedier képződés nélkül ismét teljesen lebontotta. Az eredetileg 9 α -hidroxiláz aktivitást nem mutató *Mycobacterium phlei* transzformánsai a 4-androsztén-3,17-diont 9 α -helyzetben hidroxilezték a rekombináns 9 α -hidroxiláz expressziója révén. Szubsztrátumként 1,4-androsztadién-3,17-diont adva tenyészethez, 9 α -hidroxi-1,4-androsztadién-3,17-dion átmeneti termékén keresztül 3-hidroxi-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 9 α -hidroxiláz aktivitást, majd szekvenálással meghatároztuk az inszerció pontos helyét és a 9 α -hidroxilázt kódoló ORF-1 szekvenciáját.

A 9 α -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 $[2\text{Fe-2S}]_R$ domén és egy nem haem Fe(II) domén.

A rekombináns 3-ketoszteroid-9 α -hidroxiláz enzim terminális oxigenáz komponensét heterológ rendszerben, *E. coli*-ban funkcionálisan aktív formában expresszáltuk, ami újabb bizonyítékot szolgáltat az izolált DNS szekvencia funkciójára.

5.2 Summary

From the eighties on the majority of the steroid drug synthesis has been based on microbial transformation of the cheap and widespread available plant sterols. Nowadays approximately 65% of the steroid drugs are prepared from sitosterol obtained from soya bean. The selective, microbial degradation of the sitosterol side chain results in key intermediates of the synthesis of steroid drugs.

The degradation of the sitosterol side chain is accomplished with 9 enzymes, in 16 enzymatic steps. Removal of the side chain begins with oxidation at the end of the side chain resulting in a carboxylic acid. Subsequent cleavage of the side chain takes place stepwise by a process analogous to β -oxidation of fatty acids that results in complete removal of the side chain.

After the degradation of the side chain or parallel to it, the steroid skeleton also degrades. 3-Ketosteroid 9 α -hydroxylase is a key enzyme in the reaction leading to the opening of the steroid skeleton, the enzyme catalyses the formation of an unstable 9 α -hydroxy-1,4-diene-3-one intermediate structure, which spontaneously cleaves to a 9,10-secophenol derivatives with an opened B-ring.

9 α -Hydroxylation of steroid molecules saturated in C₁-C₂ position results in excellent starting material for the synthesis of corticosteroids. *Mycobacterium* strains expressing 9 α -hydroxylase enzyme but blocked mutants in Δ^1 -dehydrogenase activity can produce the precursor of corticosteroid drugs, 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione, while *Mycobacterium* strains blocked in 9 α -hydroxylase activity but having Δ^1 -dehydrogenase activity can produce 1,4-androstadiene-3,17-dione, an intermediate of synthesis of contraceptives. As 9 α -hydroxylase enzyme plays an important role in the microbiological degradation of sitosterol and also have a key role in the industrial production of steroid drugs, isolation and molecular characterization of this enzyme may have both theoretical and industrial advantages.

Application of gene technology for *Mycobacterium* started in the end of 1980's years. The researches were challenged by the fact that mycobacteria are responsible for two of the world's most important bacterial diseases leading to the highest mortality worldwide, the tuberculosis and the leprosy, as well as some animal infections. From the beginning our research team was involved in the molecular genetic work. 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.

Beside the host-vector systems, the insertion elements are also valuable tools in the genetic analysis of bacteria. Several “jumping elements” were isolated from mycobacteria in the last years. Applying the pCG79 thermosensitive shuttle plasmid DNA, carrying Tn611 transposon, Guilhot and co-workers developed the first insertion mutant library in *Mycobacterium smegmatis* in the Pasteur Institute in 1994.

We also used transposon mutagenesis in our sterol transforming *Mycobacterium* strains with the pCG79 plasmid carrying kanamycin resistance gene. We aimed to construct insertionally blocked mutants of sterol degradation pathway via introducing the vector carrying the transposon into sterol transforming *Mycobacterium* strains. Having this kind of mutants opens the way to the molecular genetic analysis of sterol transformation.

We prepared insertional mutant libraries from the *M. phlei* M51-Ept and *M. smegmatis* mc²155 strains producing 4-androstene-3,17-dione from sitosterol and degrading sitosterol completely, respectively. Random integration of pCG79 plasmid into the chromosome was proved with Southern blot hybridization.

A high throughput screening method was developed to enable the selection of mutants of any of these genes responsible for sterol transforming ability. Thousands of insertion mutants were grown in the presence of sitosterol in the wells of microtiter plates, and their sterol transforming ability was determined by the analysis of the intermediates accumulated in these “mini” fermenters with thin layer chromatography.

Altogether 4 strains with sterol degrading enzyme activity different from the parent strains were identified.

In *Mycobacterium smegmatis* mc²155, all sterol degrading enzymes are active therefore it degrades sitosterol completely without production of any intermediar. Its insertion mutant, signed 10A12, is blocked in the 9 α -hydroxylase activity, thus the steroid skeleton remains intact and the strain accumulates 1,4-androstadiene-3,17-dione.

In the mutants originated from *Mycobacterium phlei* M51-Ept parent strain, which produces 4-androstene-3,17-dione, the insertion influenced the side chain degradation. The *Mycobacterium phlei* 3B7 strain degrades the sitosterol side chain partially and produces compounds with 23,24-dinorcholane structure due to the lack of the last enzymatic steps. From the 3-oxo-23,24-dinor-4,17(20)-choladiene-22-oic acid methyl ester produced by this strain, 4,16-pregnadiene-3,20-dione and 17 α -hydroxy-4-pregnene-3,20-dione, important

intermediates of steroid drug synthesis can be prepared with the methods developed in our institute.

Mycobacterium phlei 5G4 and 10G9 strains produce the same intermediates, and their main product is testosterone.

We were able to affect effectively the function of genes controlling the sterol degrading pathway in a way where the genes were also labelled by the transposon inserted. It makes possible to localise the genes which play roles in the sterol degradation on the chromosome.

Using *Mycobacterium smegmatis* 10A12 insertional mutant, we cloned, sequenced and characterised the terminal oxygenase component of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase.

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

We isolated the intact *NotI* chromosomal fragment carrying the 9 α -hydroxylase gene from the parent *M. smegmatis* mc²155 strain using two segments of the pFJ92 plasmid labelled with radioactive isotope. The *NotI* chromosomal fragment carrying the 9 α -hydroxylase gene was inserted into pOLYG *Mycobacterium-E. coli* shuttle vector having hygromycin resistance marker. The obtained pAA23 recombinant plasmid was transformed into *Mycobacterium* 10A12 insertional mutant, whereupon the metabolic block in 9 α -hydroxylation was complemented.

pAA23 plasmid was transformed in *M. phlei* M51-Ept also, which lacks 9 α -hydroxylase activity, with selection for hygromycin-resistant transformants. These transformants were found to convert 4-androstene-3,17-dione into 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione. When 1,4-androstadiene-3,17-dione was added as the substrate, 3-hydroxy-9,10-seco-1,3,5(10)-androstatriene-9,17-dione was formed because of spontaneous rearrangement of the unstable compound 9 α -hydroxy-1,4-androstatriene-3,17-dione. These observations demonstrate the ability of transformants to introduce a hydroxyl group at the 9 α -position of the steroid skeleton.

Via deletion mutagenesis, followed by complementation experiments, the 9 α -hydroxylase activity could be localised within a 3 kb *EcoRI-EcoRV* region, thereafter the exact position of the integration site and the DNA sequence of the ORF-1 encoding the 383-amino-acid 9 α -hydroxylase enzyme was determined.

The identified 9 α -hydroxylase can be classified in the terminal oxygenases of the class IA of monooxygenase, based on the homology analysis the protein translated from the DNA sequence. 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.

The terminal oxygenase component of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase enzyme was expressed in active form in *E. coli*, which provides further evidence for the correct DNA sequence.

IRODALOMJEGYZÉK

-
- ¹ Söhngen, N. L.: Benzin, Petroleum, Paraffinöl und Paraffin als Kohlenstoff und Energiequelle für Mikroben. Zbl. Bacteriol. Parasitenk. Abt. II. **37**, 595-609 (1913)
- ² Stadman, T. C., A. Cherkes, C. B. Anfinsen: Studies on the microbial degradation of cholesterol. J. Biol. Chem. **206**, 511-523 (1954)
- ³ Schubert, K., K. H. Böhme, C. Z. Hörhold: Bildung einer Ketosäure durch mikrobiellen Abbau von Progesteron. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **325**, 260-262 (1961)
- ⁴ Dodson, R. M., R. D. Muir: Microbiological transformations: VI The microbiological aromatization of steroids. J. Am. Chem. Soc. **83**, 4627-4631 (1961)
- ⁵ Arima, K., G. Tamura, M. Bae, H. Nagasawa: Process for preparing androst-4-en-3,17-dione from sitosterol compounds by the action of microorganisms. 504508 sz. japán szabadalom (1964)
- ⁶ Wix Gy., Büki K., Tömörkény E.: Eljárás 1,4-androsztadién-3,17-dion mikrobiológiai előállítására. 153173 sz. magyar szabadalom (1965)
- ⁷ Wix Gy., Büki K., Tömörkény E., Ambrus G.: Eljárás 1,4-dién-3,17-dion szerkezetű szteroidok mikrobiológiai előállítására. 153831 sz. magyar szabadalom (1965)
- ⁸ Driden Jr., H. L., G. M. Webber, J. J. Wiczolek: The reductive aromatization of steroidal dienones. A new method for the preparation of estrone. J. Am. Chem. Soc. **86**, 742-743 (1964)
- ⁹ Kalvoda, J., H. Heusler, H. Ueberwasser, G. Anner, A. Wettstein: 19-Norsteroido. Über die reduktive Ätherspaltung bei 5 α -Halogen-6 β , 19-oxido-steroiden. Helv. Chim. Act. **46**, 1361-1369 (1963)
- ¹⁰ Sih, C. J., S. S. Lee, Y. Y. Tsong, K. C. Wang, F. N. Chang: An efficient synthesis of estrone and 19-norsteroids from cholesterol. J. Am. Chem. Soc. **87**, 2765-2766 (1965)
- ¹¹ Albrecht, K., G. Ambrus, M. Rados, K. Büki, E. Tömörkény, L. Vargha: Verfahren zur Herstellung von 6,19-Oxido-androst-4-en-3,17-dion. Österreichische Patentschrift NR. 287929 (1968)
- ¹² Büki K., Ambrus G., Halmos M., Szabó T.: Eljárás androsztánvázás szteroidok előállítására 168731 sz. magyar szabadalom (1974)
- ¹³ Büki, K., G. Ambrus, Gy. Horváth: Metabolic fate of cholesterol methyl ether in *Mycobacterium phlei*. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. **22**, 447-451 (1975)

-
- ¹⁴ Ambrus G., Albrecht K., Barta I., Fábíán M., Könczöl K.: Eljárás természetes eredetű szterinek oldalláncának szelektív lebontására. 190665 sz. magyar szabadalom (1980)
- ¹⁵ Kraychy, S., W. J. Marsheck, R. D. Muir: Selective microbiological degradation of steroidal 17-alkyls. 3684657 sz. Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalom (1970)
- ¹⁶ Wovcha, M. G., F. J. Antosz, J. C. Knight, L. A. Kominek, T. R. Pyke: Bioconversion of sitosterol to useful steroidal intermediates by mutants of *Mycobacterium fortuitum*. *Biochem. Biophys. Act.* **531**, 308-321 (1978)
- ¹⁷ Marsheck, W. J., S. Kraychy: Selective microbiological preparation of androst-4-ene-3,17-dione. 1329387 sz. brit szabadalom (1971)
- ¹⁸ Van Rhynen, V., K. P. Shephard: New synthesis of corticosteroids from 17-keto steroids: Application and stereochemical study of the unsaturated sulfoxide-sulfonate rearrangement. *J. Org. Chem.* **44**, 1582-1584 (1979)
- ¹⁹ Sih, C. J., H. H. Tai, Y. Y. Tsong: Mechanism of microbial conversion cholesterol into 17-keto steroids. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 1957-1958 (1967)
- ²⁰ Fujimoto, Y., C.-S. Chen, Z. Szeleczky, D. Di-Tullio, C. J. Sih: Microbial degradation of the phytosterol side-chain. I. Enzymatic conversion of 3-oxo-24-ethylcholest-4-en-26-oic acid into 3-oxochol-4-en-24-oic-acid and androst-4-ene-3,17-dione. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4718-4720 (1982)
- ²¹ Fujimoto, Y., C.-S. Chen, A. S. Gopalan, C. J. Sih: Microbial degradation of the phytosterol side-chain. II. Incorporation of NaH^{14}CO onto C-28-position. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4720-4722 (1982)
- ²² Szentirmai, A.: Microbial physiology of sidechain degradation of sterols. *J. Ind. Microbiol.* **6**, 101-116 (1990)
- ²³ Ambrus, G., É. Ilkőy, A. Jekkel, Gy. Horváth, Zs. Böcskei: Microbial transformation of β -sitosterol and stigmasterol into 26-oxygenated derivatives. *Steroids* **60**, 621-625 (1995)
- ²⁴ Ambrus, G., A. Jekkel, É. Ilkőy, Gy. Horváth, Zs. Böcskei: Novel 26-oxygenated products in microbial degradation of ergosterol. *Steroids* **60**, 626-629 (1995)
- ²⁵ Szentirmai A., Tömörkény E., Albrecht K., Udvardy N. I.-né, Simonovits E., Hantos G., Lengyel L.-né: Új eljárás 1,4-androsztadién-3,17-dion előállítására szterinek 17-alkil oldalláncának mikrobiológiai lebontása útján. 188753 sz. magyar szabadalom (1980)
- ²⁶ Szentirmai A., Tömörkény E., Albrecht K., Udvardy N. I.-né, Simonovits E., Hantos G., Lengyel L.-né: Új eljárás 9α -hidroxi-4-androsztén-3,17-dion előállítására szterinek 17-alkilláncának mikrobiológiai lebontása útján. 188754 sz. magyar szabadalom (1980)

-
- ²⁷ Jekkel A., Szabó I. M., Lengyel L.-né, Albrecht K., Hantos G., Ambrus G., Láng T., Ilkőy É., Könczöl K., Moravcsik I., Simonovits E., Vida Zs., Csajági É.: Eljárás 9 α -hidroxi-4-androsztén-3,17-dion mikrobiológiai előállítására. 196627 sz. magyar szabadalom, 2197869(B) sz. angol szabadalom (1986)
- ²⁸ 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)
- ²⁹ Jekkel, A., É. Csajági, É. Ilkőy, G. Ambrus: In vivo genetic recombination by spheroplast fusion of sitosterol transforming *Mycobacterium* strains. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 1727-1733 (1989)
- ³⁰ Toró, A., G. Ambrus: Oxidative decarboxylation of 17(20)-dehydro-23,24-dinorcholanoic acids. *Tetrahed. Lett.* **31**, 3475-3476 (1990)
- ³¹ Toró, A., G. Ambrus: Synthesis of 17 α -hydroxy-20-oxo-pregnanes from 17(20)-dehydro-23,24-dinorcholan-22-oic acids. *Tetrahed. Lett.* **33**, 5265-5266 (1992)
- ³² Toró A., Ambrus G., Pallagi I., Makk N., Horváth Gy., Szederkényi F., Ilkőy É., Jekkel A., Moravcsik I., Könczöl K.: Eljárás 17 α -hidroxi-20-oxo-pregnán-oldalláncú szteroidok előállítására. 208022 sz. magyar szabadalom, 5,241,063 sz. Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalom (1990)
- ³³ Jacobs, Jr., W. R., M. Tuckman, B. R. Bloom: Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle phasmid. *Nature* **327**, 532-535 (1987)
- ³⁴ Labidi, A., C. Dauguet, K. S. Goh, H. L. David: Plasmid profiles of *Mycobacterium fortuitum* complex isolates. *Curr. Microbiol.* **11**, 235-240 (1984)
- ³⁵ Crawford, J. T., J. O. Falkinham III: Plasmids of the *Mycobacterium avium* complex. In: *Molecular Biology of the Mycobacteria* (ed. J. Mcfadden), London: Harcourt Brace Jovannovich Publishers, 97-119 (1990)
- ³⁶ Jucker, M. T., J. O. Falkinham III: Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. IX. Evidence for two DNA homology groups among small plasmids in *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*. *Am. Rev. Resp. Dis.* **142**, 858-862 (1990)

-
- ³⁷ Labidi, A., H. L. David, D. Roulland-Dussoix: Restriction endonuclease mapping and cloning of *Mycobacterium fortuitum* var. *fortuitum* plasmid pAL5000. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **136**, 209-215 (1985)
- ³⁸ Picardeau, M., V. Vincent: Characterization of large linear plasmids in mycobacteria. *J. Bacteriol.* **179**, 2753-2756 (1997)
- ³⁹ Miessner, P. S., J. O. Falkinham III: Plasmid-encoded mercuric reductase in *Mycobacterium scrofulaceum* J. *Bacteriol.* **157**, 669-672 (1984)
- ⁴⁰ Erardi, F. X., M. L. Failla, J. O. Falkinham III: Plasmid-encoded copper resistance and precipitation by *Mycobacterium scrofulaceum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1951-1954 (1987)
- ⁴¹ Beggs, M. L., J. T. Crawford, K. D. Eisenach: Isolation and sequencing of the replication region of *Mycobacterium avium* plasmid pLR7. *J. Bacteriol.* **177**, 4836-4840 (1995)
- ⁴² Qin, M., H. Taniguchi, Y. Mizuguchi: Analysis of the replication region of a Mycobacterial plasmid, pMSC262. *J. Bacteriol.* **176**, 419-425 (1994)
- ⁴³ Gavigan, J-A., J. A. Ainsa, E. Pérez, I. Otal, C. Martin: Isolation by genetic labeling of a new Mycobacterial plasmid, pJAZ38, from *Mycobacterium fortuitum* J. *Bacteriol.* **179**, 4115-4122 (1997)
- ⁴⁴ Gicquel-Sanzey, B., J. Moniz-Pereira, M. Gheorghiu, J. Rauzier: Structure of pAL5000, a plasmid from *M. fortuitum* and its utilization in transformation of mycobacteria. *Acta Leprologica* **7** (Suppl. 1), 208 (1989)
- ⁴⁵ Raney, M. G., J. Rauzier, M. Lagranderie, M. Gheorghiu, B. Gicquel: Functional analysis of pAL5000, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum*: construction of a "Mini" *Mycobacterium-Escherichia coli* shuttle vector. *J. Bacteriol.* **172**, 2793-2797 (1990)
- ⁴⁶ Rauzier, J., J. Moniz-Pereira, B. Gicquel-Sanzey: Complete nucleotide sequence of pAL5000, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum*. *Gene* **71**, 315-321 (1988)
- ⁴⁷ Stover, C. K., V. F. de la Cruz, T. R. Fuerst, J. R. Burlein, L. A. Benson, L. T. Bennett, G. P. Bansal, J. F. Young, M. H. Lee, G. F. Hattfull, S. B. Snapper, R. G. Barletta, W. R. Jacobs Jr, B. R. Bloom: New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* **351**, 456 -460 (1991)
- ⁴⁸ Stolt, P., N. G. Stoker: Functional definition of regions necessary for replication and incompatibility in the *Mycobacterium fortuitum* plasmid pAL5000. *Microbiol.* **142**, 2795-2802 (1996)
- ⁴⁹ Stolt, P., N. G. Stoker: Protein-DNA Interactions in the *ori* Region of the *Mycobacterium fortuitum* Plasmid pAL5000. *J. Bacteriol.* **178**, 6693-6700 (1996)

-
- ⁵⁰ Biémont, C., C. Vieira: Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* **443**, 521-524 (2006)
- ⁵¹ McFadden, J. J., P. D. Butcher, J. Thompson, R. J. Chiodini, J. Hermon-Taylor: The use of DNA probes identifying restriction-fragmentlength polymorphisms to examine the *Mycobacterium avium* complex. *Mol. Microbiol.* **1**, 283-291 (1987)
- ⁵² Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry III, et al.: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537-544 (1998)
- ⁵³ Gordon, S. T., B. Heym, J. Parkhill, B. Barrel, S. T. Cole: New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiol.* **145**, 881-892 (1999)
- ⁵⁴ McEvoy, C. R. E., A. A. Falmer, N. C. Gey van Pittius, T. C. Victor, P. D. van Helden, R. M. Varren: The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc.* **87**, 393-404 (2007)
- ⁵⁵ Thierry, D., M. D. Cave, K. D. Eisenach, J. T. Crawford, J. H. Bates, B. Gicquel, J. L. Guesdon: IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucl. Ac. Res.* **18**, 188 (1990)
- ⁵⁶ Via, L. E., J. O. Falkinham III: GeneBank. L10239 (1993)
- ⁵⁷ Garcia, M. J., C. Guilhot, R. Lathigra, M. C. Menendez, P. Domenech, C. Moreno, B. Gicquel, C. Martin: Insertion sequence IS1137, a new IS3 family element from *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiol.* **140**, 2821-2828 (1994)
- ⁵⁸ Fayet, O., P. Ramond, P. Polard, M. F. Prère, M. Chandler: Functional similarities between retroviruses and the IS3 family of bacterial insertion sequences? *Mol. Microbiol.* **4**, 1771-1777 (1990)
- ⁵⁹ Chandler, J. D., O. Fayet: Translational frameshifting in the control of transposition in bacteria. *Mol. Microbiol.* **7**, 497-503 (1993)
- ⁶⁰ Green, E. P., M. L. V. Tizar, M.T. Moss, J. Thompson, D. J. Winterbourne, J. J. McFadden, J. Hermon-Taylor: Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium partuberculosis*. *Nucl. Ac. Res.* **17**, 9063-9073 (1989)
- ⁶¹ Kunce, Z. M., S. Wall, R. Appelberg, M. T. Silva, F. Portaels, J. J. McFadden: IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in *Mycobacterium avium*. *Mol. Microbiol.* **5**, 2265 (1991)

-
- ⁶² Moss, M. T., Z. T. Malik, M. L. V. Tizard, E. P. Green, J. D. Sanderson, J. Hermon-Taylor: IS902, an insertion element of the chronic-enteritis-causing *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. J. Gen. Microbiol. **138**, 139-145 (1992)
- ⁶³ Hernandez-Perez, M., N. G. Fomukong, T. Hellyer, L. N. Braun, J. W. Dale: Characterization of IS1110, a highly mobile genetic element from *Mycobacterium avium*. Mol. Microbiol. **12**, 717-724 (1994)
- ⁶⁴ Collins, D. M., D. M. Stephens: Identification of an insertion sequence, IS1081 in *Mycobacterium bovis*. FEMS Microbiol. Lett. **83**, 11-16 (1991)
- ⁶⁵ Guilhot, C., B. Gicquel, J. Davies, C. Martin: Isolation and analysis of IS6120, a new insertion sequence from *Mycobacterium smegmatis*. Mol. Microbiol. **6**, 107-113 (1992)
- ⁶⁶ Martin, C., J. Timm, J. Rauzier, R. Gómez-Lus, J. Davies, B. Gicquel: Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria. Nature **345**, 739-743 (1990)
- ⁶⁷ Cirillo, J. D., R. G. Barletta, B. R. Bloom, W. R. Jacobs, Jr.: A Novel Transposon trap for mycobacteria: Isolation and characterization of IS1096. J. Bacteriol **173**, 7772-7780 (1991)
- ⁶⁸ Snapper, S. B., L. Lugosi, A. Jekkel, R. Melton, T. Kieser, B. R. Bloom, W. R. Jacobs, Jr.: Lysogeny and transformation in mycobacteria: Stable expression of foreign genes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **85**, 6987-6991 (1988)
- ⁶⁹ Jacobs, Jr., W. R., S. B. Snapper, L. Lugosi, A. Jekkel, R. E. Melton, T. Kieser, B. R. Bloom: Development of genetic systems for the mycobacteria. Acta Leprologica **7**, 203-207 (1989)
- ⁷⁰ Kieser, T., R. E. Melton: Plasmid pIJ699, a multi-copy positive-selection vector for *Streptomyces*. Gene **65**, 83-91 (1988)
- ⁷¹ Berg, D. E., J. Davies, B. Allet, J. D. Rochaix: Transposition of R factor genes to bacteriophage λ . Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **72**, 3628-3632 (1975)
- ⁷² Chang, A. C. Y., S. N. Cohen: Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. J. Bacteriol. **134**, 1141-1156 (1978)
- ⁷³ Snapper, S. B., R. E. Melton, S. Mustafa, T. Kieser, W. R. Jacobs, Jr.: Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. Mol. Microbiol. **4**, 1911-1919 (1990).
- ⁷⁴ Jacobs, Jr., W. R., G. V. Kalpana, J. D. Cirillo, L. Pascopella, S. B. Snapper, R. A. Udani, W. Jones, R. G. Barletta, B. R. Bloom: Genetic systems for mycobacteria. Methods Enzymol. **204**, 537-555 (1991)

-
- ⁷⁵ Philipp, W. J., S. Poulet, K. Eiglmeier, L. Pascopella, V. Balasubramanian, B. Heim, S. Bergh, B. R. Bloom, W. R. Jacobs, Jr., S. T. Cole: An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **93**, 3132-3137 (1996)
- ⁷⁶ Garbe, T. R., J. Barathi, S. Barnini, Y. Zhang, C. Abou-Zeid, D. Tang, R. Mukherjee, D. B. Young: Transformation of mycobacterial species using hygromycin resistance as selectable marker. Microbiol. **140**, 133-138 (1994)
- ⁷⁷ O'Gaora, P. S. Barnini, C. Hayward, E. Filley, G. Rook, D. Young, J. Thole: Mycobacteria as immunogens: Development of expression vectors for use in multiple mycobacterial species. Med. Principles. Pract. **6**, 91-96 (1997)
- ⁷⁸ Aldovini, A., R. A. Young: Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. Nature **351**, 479-482 (1991)
- ⁷⁹ Abdelhak, S., H. Louzir, J. Timm, L. Blel, Z. Benlasfar, M. Lagranderie, M. Gheorghiu, K. Dellagi, B. Gicquel: Recombinant BCG expressing the leishmania surface antigen Gp63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in BALB/c mice. Microbiol. **141**, 1585-1592 (1995)
- ⁸⁰ Stover, C. K., G. P. Bansal, M. S. Hanson, J. E. Burlein, S. R. Palaszynski, J. F. Young, S. Koenig, D. B. Young, A. Sadziene, A. G. Barbour: Protective immunity elicited by recombinant *Bacille Calmette-Guerin* (BCG) expressing outer surface protein A (OspA) lipoprotein: A candidate lyme disease vaccine. J. Exp. Med. **178**, 197-209 (1993)
- ⁸¹ Guilhot, C., B. Gicquel, C. Martin: Temperature-sensitive mutants of the *Mycobacterium* plasmid pAL5000. FEMS Microbiol. Lett. **98**, 181-186 (1992)
- ⁸² Guilhot, C., I. Otal, I. van Rompaey, C. Martin, B. Gicquel: Efficient transposition in mycobacteria: Construction of *Mycobacterium smegmatis* insertional mutant libraries. J. Bacteriol. **176**, 535-539 (1994)
- ⁸³ Pelicic, V., M. Jackson, J-M. Reyrat, W. R. Jacobs, Jr., B. Gicquel, C. Guilhot.: Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **94**, 10955-10960 (1997)
- ⁸⁴ Goto, Y., H. Taniguchi, T. Udou, Y. Mizuguchi, T. Tokunaga: Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol. Lett. **83**, 277-282 (1991)
- ⁸⁵ McAdam, R. A., T. R. Weisbrod, J. Martin, J. D. Scuderi, A. M. Brown, J. D. Cirillo, B. R. Bloom, W. R. Jacobs, Jr.: In vivo growth characteristics of leucine and methionine

auxotrophic mutants of *Mycobacterium bovis* BCG generated by transposon Mutagenesis. *Infect Immun.* **63**, 1004-1012 (1995)

⁸⁶ England, P. M., S. Wall, J. McFadden: IS900-promoted stable integration of a foreign gene into mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **5**, 2047-2052 (1991)

⁸⁷ Fomukong, N. G., J. W. Dale: Transpositional activity of IS986 in *Mycobacterium smegmatis*. *Gene* **130**, 99-105 (1993)

⁸⁸ Molnar, I., K. P. Choi, M. Yamashita, Y. Murooka: Molecular cloning, expression in *Streptomyces lividans*, and analysis of a gene cluster from *Arthrobacter simplex* encoding 3-ketosteroid-delta 1-dehydrogenase, 3-ketosteroid-delta 5-isomerase and a hypothetical regulatory protein. *Mol. Microbiol.* **15**, 895–905 (1995)

⁸⁹ Itagaki, E., T. Wakabayashi, T. Hatta: Purification and characterization of 3-ketosteroid-D1-dehydrogenase from *Nocardia corallina*. *Biochim. Biophys. Acta* **1038**, 60–67 (1990)

⁹⁰ Morii, S., C. Fujii, T. Miyoshi, M. Iwami, E. Itagaki: 3-Ketosteroid-D1-dehydrogenase of *Rhodococcus rhodochrous*: sequencing of the genomic DNA and hyperexpression, purification, and characterization of the recombinant enzyme. *J. Biochem.* **124**, 1026–1032 (1998)

⁹¹ Geize, R., G. I. Hessels, L. Dijkhuizen: Molecular and functional characterization of the kstD2 gene of *Rhodococcus erythropolis* SQ1 encoding a second 3-ketosteroid D(1)-dehydrogenase isoenzyme. *Microbiology* **148**, 3285–3292 (2002)

⁹² Knol, J., K. Bodewits, G. I. Hessels, L. Dijkhuizen, R. van der Geize: 3-Keto-5 α -steroid Δ^1 -dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* SQ1 and its orthologue in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv are highly specific enzymes that function in cholesterol catabolism. *J. Biochem.* **410**, 339-346 (2008)

⁹³ Brzostek, A., T. Śliwiński, A. Rumijowska-Galevicz, M. Korycka-Machała, and J. Dziadek. Identification and targeted disruption of the gene encoding the main 3-ketosteroid dehydrogenase in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **151**, 2393-2402 (2005)

⁹⁴ Horinouchi, M., T. Hayashi, T. Yamamoto, T. Kudo: A new bacterial steroid degradation gene cluster in *Comamonas testosteroni* TA441 which consists of aromatic-compound degradation genes for seco-steroids and 3-ketosteroid dehydrogenase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4421–4430 (2003)

⁹⁵ van der Geize, R., G. I. Hessels, R. van Gerwen, P. van der Meijden, L. Dijkhuizen: Molecular and functional characterization of kshA and kshB, encoding two components of 3-

ketosteroid 9 α -hydroxylase, a class IA monooxygenase, in *Rhodococcus erythropolis* SQ1. Mol. Microbiol. **45**, 1007-1018 (2002)

⁹⁶ van der Geize, R., G. I. Hessels, M. Nienhuis-Kuiper, L. Dijkhuizen: Characterization of a second *Rhodococcus erythropolis* SQ1 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase activity comprising a terminal oxygenase homologue, KshA2, active with oxygenase-reductase component KshB. Appl. Environ. Microbiol. **74**, 7197-7203 (2008)

⁹⁷ 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)

⁹⁸ 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)

⁹⁹ Perbal, B.: A practical guide to molecular cloning. 363-367, John Wiley and Sons, New York (1988)

¹⁰⁰ 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)

¹⁰¹ 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)

¹⁰² Andor A., Jekkel A., Hopwood, D. A., Ambrus G.: Új módszerek alkalmazása a szitoszterin mikobaktériumok által végzett lebontásában résztvevő enzimeket kódoló gének szerkezetének és genomban lévő helyének megismerésében. MTA Szteroidkémiai Munkabizottság Ülése (2008. november 27.)

¹⁰³ 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)]

-
- ¹⁰⁴ 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.)
- ¹⁰⁵ Hopwood, D. A., M. J. Bibb, K. F. Chater, T. Kieser, C. J. Bruton, H. M. Kieser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, J. M. Ward, H. Schrempf: Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich (1985)
- ¹⁰⁶ Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis: Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (1989)
- ¹⁰⁷ Meystre C., K. Miescher: Über Steroide. Abbau der Oxy-bisnor-cholensaure I. Helv. Chim. Act. **32** (No. 232), 1758-1763 (1949)
- ¹⁰⁸ Schwarz, V., P. Pihera, J. Protiva, R. Micková: Biodegradation of cholesterol by a mutant of the *Mycobacterium* species. Collect. Czech. Chem. Commun. **49**, 2713-2719 (1984)
- ¹⁰⁹ Nahar, L., A. B. Turne: Synthesis of 3 β ,6 α -dihydroxy-5 α -cholan-23-one. Tetrahed. **59**, 8623-8628 (2003)
- ¹¹⁰ Poza, J. J., R. F. F. Reyes, J. Rodri'guez, C. Jime'nez: Isolation, biological significance, synthesis, and cytotoxic evaluation of new natural parathiosteroids A-C and analogues from the soft coral *Paragorgia* sp. J. Org. Chem. **73**, 7978-7984 (2008)
- ¹¹¹ Jiu, J., W. J. Marsheck: 3-oxo-pregna-4,17(20)-dien-20-carboxylic acid and esters. 3,994,933. sz. Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalom (1976)
- ¹¹² Jiu, J., W. J. Marsheck: Process of preparing 3-oxo-pregna-4,17(20)-dien-21-carboxylic acid and esters with *Mycobacterium*. 4,032,408. sz. Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalom (1977)
- ¹¹³ Toró A., Ambrus G., Makk N., Láng T., Ilkőy É., Toldy L., Jekkel A., Tóth-Sarudy É., Albrecht K., Horváth Gy.: Eljárás 16-dehidro-20-oxo-pregnán-származékok előállítására. 198736 sz. magyar szabadalom (1986)
- ¹¹⁴ Horváth, Gy., G. Ambrus: The mass spectral fragmentation of 9 α -hydroxy steroids and related compounds. Biomed. Mass Spectrom. **4**, 376-380 (1977)