



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 690 33 616 T3** 2008.07.03

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 405 370 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **690 33 616.0**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **90 111 916.4**

(96) Europäischer Anmeldetag: **22.06.1990**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.01.1991**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **30.08.2000**

(97) Veröffentlichungstag

des geänderten Patents beim EPA: **19.12.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.07.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/52** (2006.01)

C12P 25/00 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

370378 22.06.1989 US

(73) Patentinhaber:

DSM IP Assets B.V., TE Heerlen, NL

(74) Vertreter:

Lederer & Keller, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, FR, GB, IT, LI, NL

(72) Erfinder:

Perkins, John B., Reading, Massachusetts 01867,

US; Pero, Janice G., Lexington, Massachusetts

02173, US; Sloma, Alan, Watertown,

Massachusetts 02172, US

(54) Bezeichnung: **Riboflavin überproduzierende Bakterienstämme**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Riboflavin (Vitamin B₂) wird von allen Pflanzen und vielen Mikroorganismen synthetisiert, wird aber nicht von höheren Tieren erzeugt. Da es ein Vorläufer von Coenzymen, wie Flavinadenindinucleotid und Flavinmononucleotid ist, die für die enzymatische Oxidation von Kohlenhydraten erforderlich sind, ist Riboflavin für den Grundstoffwechsel essentiell. Bei höheren Tieren kann eine ungenügende Menge an Riboflavin Haarverlust, Hautentzündungen, Sehstörungen und Wachstumsstörungen verursachen.

[0002] Riboflavin kann kommerziell entweder durch eine vollständige chemische Synthese ausgehend von Ribose oder durch Fermentation mit den Pilzen *Eremothecium ashbyii* oder *Ashbya gossypii* (The Merck Index, Windholz et al., Herausgeber, Merck & Co., S. 1183, 1983) erzeugt werden. Es wurde berichtet, dass Mutanten von *Bacillus subtilis*, die durch Kontakt mit den Purinanaloga Azaguanin und Azaxanthin selektiert wurden, Riboflavin in gewinnbaren Mengen erzeugen (U.S.-Patent Nr. 3 900 368, Enei et al., 1975). Im Allgemeinen selektiert der Kontakt mit Purin oder Riboflavinanaloga deregulierte Mutanten, die eine erhöhte Riboflavinbiosynthese zeigen, da die Mutationen dem Mikroorganismus erlauben, das Analogon durch eine erhöhte Produktion "auszustechen" (Matsui et al., Agric. Biol. Chem. 46: 2003, 1982). Es wurde auch über eine Purin erfordernde Mutante von *Saccharomyces cerevisiae* berichtet, die Riboflavin erzeugt (U.S.-Patent Nr. 4 794 081, Kawai et al., 1988). Rabinovich et al. (Genetika 14: 1696 (1978)) berichten, dass das Riboflavin-Operon (rib-Operon) von *B. subtilis* in einem 7 Megadalton (Md) EcoRI-Fragment enthalten ist (später als 6,3 Md-Fragment bezeichnet von Chikindas et al., Mol. Genet. Mik. Virusol. Nr. 2: 20 (1987)). Es wird auch berichtet, dass die Amplifikation des rib-Operons in *E. coli* erreicht werden könnte, indem das Operon in ein Plasmid kloniert wird, das Ampicillinresistenz beiträgt und Bakterien, die das Plasmid enthalten, wachsenden Mengen an Antibiotikum ausgesetzt werden. Der einzige Hinweis auf die rib-Amplifikation ist ein gleichzeitiger Anstieg einer grün fluoreszierenden Substanz im Medium; die Autoren präsentieren eine Anzahl alternativer Möglichkeiten außer einer tatsächlichen Amplifikation des Operons, um das beobachtete Phänomen zu erklären.

[0003] Die Französische Patentanmeldung Nr. 2 546 907 von Stepanov et al. (veröffentlicht am 7. Dezember 1984) offenbart eine Methode zur Erzeugung von Riboflavin, bei der ein Mutantenstamm von *B. subtilis* verwendet wird, der Azaguanin und Roseoflavin ausgesetzt wurde und der mit einem Plasmid transformiert wurde, das eine Kopie des rib-Operons enthält.

[0004] Morozov et al. (Mol. Genet. Mik. Virusol. Nr. 7: 42 (1984)) beschreiben die Kartierung des rib-Operons von *B. subtilis*, indem die Fähigkeit von klonierten *B.-subtilis-rib*-Fragmenten, *E.-coli*-Riboflavinauxotrophe zu komplementieren oder bei *B.-subtilis*-Riboflavinauxotrophen ein Markierungsgen zu isolieren, getestet wird. Basierend auf den bekannten Funktionen der *E.-coli-rib*-Gene wurde das folgende Modell für das *B.-subtilis*-Operon vorgeschlagen: ribG (das eine Deaminase codiert) – ribO (Kontrollelement) – ribB (eine Synthetase) – ribF – ribA (eine GTP-Cyclohydrolase) – ribT/D (eine Reduktase bzw. Isomerase) – ribH (eine Synthetase).

[0005] Morozov et al. (Mol. Genet. Mik. Virusol. Nr. 11: 11 (1984)) beschreiben die Verwendung von Plasmiden, die das *B.-subtilis-rib*-Operon entweder mit Wildtyp-(ribO⁺) oder konstitutiven (ribO 335) Operatorregionen enthalten, um deren Fähigkeit, *B.-subtilis*-Riboflavinauxotrophe zu komplementieren, zu testen. Aufgrund der Ergebnisse wurde ein revidiertes Modell des rib-Operons vorgeschlagen, bei dem nun ribO strom aufwärts aller Strukturgene, einschließlich ribG, angeordnet ist und bei dem die Existenz eines zusätzlichen Operators hypothetisch angenommen wird, das möglicherweise direkt stromaufwärts von ribA angeordnet ist.

[0006] Morozov et al. (Mol. Genet. Mik. Virusol. Nr. 12: 14 (1985)) berichten, dass das *B.-subtilis-rib*-Operon insgesamt drei verschiedene Promotoren enthält (zusätzlich zu einem vierten "Promotor", der nur in *E. coli* aktiv ist). Es wurde berichtet, dass der primäre Promotor des Operons innerhalb der ribO-Region angeordnet ist, wobei die zwei sekundären Promotoren zwischen den ribB- und ribF-Genen bzw. innerhalb der Region der ribTD- und ribH-Gene angegeben werden.

[0007] Chikindas et al. (Mol. Genet. Mik. Virusol. Nr. 2: 20 (1987)) schlagen eine Restriktionsenzymkarte für ein 6,3 Md DNA-Fragment vor, die das rib-Operon von *B. subtilis* enthält. Es sind Stellen für die Enzyme EcoRI, PstI, Sall, EcoRV, PvuII und HindIII angegeben.

[0008] Chikindas et al. (Mol. Genet. Mik. Virusol. Nr. 4: 22 (1987)) berichten, dass alle Strukturgene des *B. subtilis-rib*-Operons auf einem 2,8 Md BglII-HindIII-Fragment angeordnet sind und dass die BglII-Stelle zwischen dem primären Promotor des Operons und der ribosomalen Bindungsstelle des ersten Strukturgens liegt. Wie unten beschrieben, zeigen die Anmelder, dass diese BglII-Stelle tatsächlich innerhalb des am weitesten 5' befindlichen 5' offenen Leserahmens des rib-Operons liegt, so dass das beschriebene 2,8 Md-Fragment

nicht alle rib-Strukturgene enthält. Im Gegensatz zu dem Bericht von Chikindas et al. enthält das 1,3 Md BgIII-Fragment nicht die ribosomale Bindungsstelle für das erste Strukturgen; Insertionen an dieser Stelle führen zu einem Riboflavin-negativen Phänotyp. Demzufolge würde jeder Versuch, diese BgIII-Stelle zu verwenden, um das rib-Operon gentechnisch zu erzeugen, um die Expression zu erhöhen, z. B., indem die regulatorische Region 5' durch einen stärkeren Promotor ersetzt wird, tatsächlich die Integrität des ersten Strukturgens und damit auch des Operons zerstören.

[0009] Chikindas et al. (Dokl. Akad. Nauk. 5 SSSR 298: 997 (1988)) offenbaren ein weiteres Modell des B. subtilis-rib-Operons, das den ersten Promotor, p_1 , und zwei kleinere Promotoren, p_2 und p_3 , enthält: ribO(p_1)-ribG-ribB- p_2 -ribF-ribA-ribT-ribD- p_3 -ribH.

[0010] Wie vorher ist es unrichtig angegeben, dass das 1,3 Md BgIII-Fragment das gesamte erste Strukturgen des Operons enthält und dass diese proximale BgIII-Stelle innerhalb der primären regulatorischen Region liegt.

[0011] Die vorliegende Erfindung ist auf Bakterien gerichtet, die Riboflavin überproduzieren. Die Erfindung betrifft die Nucleotidsequenz des rib-Operons und seine offenen Leserahmen und rekombinante Bakterien, die das rib-Operon enthalten. Genauer ist die Erfindung auf Bakterien gerichtet, die so mutiert wurden, dass ihre Produktion von Riboflavin und/oder Purinen dereguliert ist, und Bakterien, denen Kopien des rib-Operons inseriert wurden und innerhalb ihrer Chromosomen-DNA amplifiziert wurden. In einer Ausführungsform kann das rib-Operon selbst dereguliert werden, indem seine Kontrollregionen durch Sequenzen ersetzt werden, die eine konstitutive oder ungesteuerte Expression zulassen. Die Bakterien, Operons und Sequenzen der Erfindung können verwendet werden, um große Mengen an Riboflavin durch Fermentation herzustellen.

[0012] Die vorliegende Erfindung wird mit Hilfe von spezifischen Beispielen erläutert, die unten angegeben sind. Z. B. wird eine Mutante von B. subtilis 1A382, RB50::[pRF8]₆₀(Ade⁺), hergestellt, die bezüglich der Riboflavin- und Purinproduktion dereguliert ist und bei der das rib-Operon innerhalb des Chromosoms amplifiziert ist. Diese Mutante kann mehr als 5 g/l Riboflavin nach 48 Stunden Fermentation in einem 14-l-Gefäß erzeugen. Andere Bakterien werden beschrieben, bei denen die Riboflavinproduktion auf mehr als 10 g/l unter gleichen Bedingungen erhöht ist.

[0013] Die Erfindung betrifft allgemein die Herstellung großer Mengen (mehr als 10 g/l) Riboflavin durch Konstruktion verschiedener Bakterienstämme und das Wachstum bzw. die Anzucht dieser Bakterienstämme in einem Medium und unter solchen Bedingungen, die zur Produktion von Riboflavin geeignet sind. Gemäß einem ersten Aspekt betrifft die Erfindung ein rekombinantes Bakterium, das mindestens eine Kopie einer exogen eingeführten Nucleinsäure in ihrem Chromosom enthält. Diese Nucleinsäure codiert ein oder mehrere Riboflavinbiosyntheseproteine, ist vererbbar und kann von dem Bakterium exprimiert werden, so dass die Riboflavinbiosynthese des Bakteriums erhöht ist bezogen auf ein Bakterium, dem eine solche Sequenz fehlt.

[0014] Unter "rekombinantem Bakterium" wird ein Bakterium verstanden, das eine oder mehrere Nucleinsäuresequenzen von dem gleichen oder einem anderen Organismus enthält an einer Stelle, an der diese Sequenzen natürlich nicht vorkommen und/oder in einer Kopienzahl, in der sie natürlich nicht vorkommen. Der Ausdruck schließt somit solche Bakterien ein, in denen zwei Kopien einer Nucleinsäuresequenz, z. B. eines Gens oder eines Operons, an einem Ort vorgesehen sind, der normalerweise nur eine Kopie dieser Sequenz aufweist. Sie schließt auch Bakterien ein, bei denen eine oder mehrere Kopien einer Nucleinsäuresequenz an einem Ort eingeführt wurden, der normalerweise diese Sequenz nicht enthält. Solche rekombinanten Bakterien werden mit Standardgentechnik konstruiert.

[0015] Unter "exogen eingeführt" wird verstanden, dass die Nucleinsäure in das Chromosom von einer Quelle außerhalb des Chromosoms mit irgendeiner Standardtechnik, einschließlich Gentechnik, Transformation und Transfektion eingeführt wird. Sie schließt auch die Nachkommen solcher Bakterien ein, z. B. solcher Bakterien, die durch Zellteilung eines ursprünglich konstruierten, transformierten oder transfizierten Bakteriums erzeugt wurden.

[0016] "Riboflavinbiosyntheseproteine" soll solche Peptide, Polypeptide oder Proteine einschließen, die direkt an der Synthese von Riboflavin aus Guanosintriphosphat beteiligt sind. Diese Proteine können identisch mit solchen sein, die natürlich in einem Bakterium vorkommen und an der Synthese von Riboflavin in dem Bakterium beteiligt sind. Alternativ können es Modifikationen solcher Proteine sein, z. B. können sie Modifikationen enthalten, die die biologische Aktivität des Proteins nicht wesentlich beeinflussen. Z. B. kann das natürliche Protein modifiziert werden, indem eine oder mehrere Aminosäuren eingeführt oder ersetzt werden, bevorzugt durch konservative Aminosäuresubstitution oder indem nicht essentielle Bereiche des Proteins entfernt wer-

den. Solche Modifikationen können leicht mit Standardtechniken durchgeführt werden.

[0017] In einigen Ausführungsformen enthält das Bakterium zwei oder mehr Kopien der Nucleinsäuresequenz und die Nucleinsäure, die ein oder mehrere Riboflavinbiosynthesepoteine codiert, ist an mindestens zwei Orten in dem Chromosom des Bakteriums vorhanden.

[0018] Unter "Ort" wird ein distinkter Chromosomenort bezogen auf ein Wildtyp-Bakterium verstanden, an dem die Nucleinsäure, die die Biosynthesepoteine codiert, angeordnet ist. Z. B. kann eine solche Nucleinsäure an dem natürlich vorkommenden Ort für Gene, die solche Proteine codieren (d. h. ein rib locus) angeordnet sein oder sie kann an einem von diesem Ort entfernten Ort angeordnet sein. Bevorzugt werden solche voneinander entfernte Orte aus Bereichen der chromosomalen Nucleinsäure ausgewählt, die für das rekombinante Bakterium nicht essentiell sind, z. B. Regionen, die Proteine codieren, die für die Produktion von Riboflavin nicht wesentlich sind. Beispiele für solche Regionen schließen solche ein, die bestimmte extrazelluläre Enzyme, wie Proteasen, codieren. Die Insertion an solchen Orten behindert eine wünschenswerte Qualität oder Ausbeute nicht. Jeder Ort ist geeignet, solange die Funktion des Bakteriums im Hinblick auf die Riboflavinproduktion nicht wesentlich beeinflusst wird.

[0019] In anderen Ausführungsformen ist die Nucleinsäure in einer Vielzahl von Kopien an einem oder mehreren Orten vorhanden und die Nucleinsäure ist an mindestens drei Orten innerhalb des Chromosoms vorhanden. Indem die Nucleinsäure an verschiedenen Orten eingeführt wird, kann die Gesamtzahl von Kopien der Nucleinsäure innerhalb des Chromosoms erhöht werden. Das Erhöhen der Kopienzahl erhöht die Menge an Riboflavinproduktion.

[0020] Allgemein werden die Riboflavinbiosynthesepoteine von einem oder mehreren rib-Genen codiert (z. B. eines, dessen Inaktivierung ein Riboflavinauxotroph erzeugt), bevorzugt von mindestens fünf verschiedenen rib-Genen, die durch die in **Fig. 3** gezeigte Nucleotidsequenz identifizierbar sind. Bevorzugt werden mindestens fünf Kopien solcher Gene bereitgestellt. Unter "rib-Genen" werden solche Gene oder Teile von Genen verstanden, die Proteine codieren, die natürlich innerhalb eines Organismus auftreten oder eine ähnliche oder gleiche Funktion wie solche Proteine zeigen, die an der biosynthetischen Umwandlung von Guanosintriphosphat in Riboflavin innerhalb eines Bakteriums beteiligt sind.

[0021] Gemäß einem verwandten Aspekt liefert die Erfindung ein rekombinantes Bakterium, das eine Nucleinsäure enthält, die ein oder mehrere Riboflavinbiosynthesepoteine codiert, z. B. die Genprodukte, die als ORF1 und ORF6 in **Fig. 4** angegeben sind, wobei die Expression mindestens eines davon durch ein Transkriptionselement kontrolliert wird, das nicht natürlicherweise mit der Nucleinsäure verbunden ist. Alternativ enthält das rekombinante Bakterium ein oder mehrere rib-Gene oder Transkriptionseinheiten, deren Expression durch ein Transkriptionselement kontrolliert wird, das nicht natürlicherweise mit dem rib-Gen verbunden ist.

[0022] Unter "Transkriptionselement" wird jede Nucleinsäure verstanden, die die Transkription der Nucleinsäure stromabwärts des Transkriptionselements bewirkt (d. h. anschaltet). Beispiele für solche Elemente schließen Promotoren und Operatoren ein. Solche Transkriptionselemente sind natürlicherweise nicht mit der Nucleinsäure verbunden, z. B. können es heterologe Transkriptionselemente sein. Das bedeutet, dass sie von einer anderen Art oder Gattung von Bakterien oder anderen Organismen isoliert worden sein können. Alternativ kann das Transkriptionselement eines sein, das natürlicherweise in dem Bakterium vorhanden ist, aber normalerweise nicht mit einem rib-Gen assoziiert ist, mit dem es nun transkriptionell verbunden ist. Solche Elemente schließen nicht solche ein, die natürlicherweise mit einem rib-Gen assoziiert sind.

[0023] In anderen Ausführungsformen schließt das rekombinante Bakterium mindestens drei (oder mindestens fünf) rib-Gene ein und die Expression aller drei rib-Gene wird durch ein Transkriptionselement kontrolliert, das natürlicherweise nicht mit diesen rib-Genen assoziiert ist; mindestens zwei Transkriptionselemente werden bereitgestellt; die rib-Gene werden innerhalb des Chromosoms des rekombinanten Bakteriums vorgesehen; das rekombinante Bakterium ist bezüglich der Riboflavingenexpression dereguliert und das Transkriptionselement ist ein Promotor. Z. B. ist der Promotor ein konstitutiver, wachstumsgesteuerter oder induzierbarer Promotor, z. B. einer der mit dem SPO1-Phagen assoziiert ist und/oder ein veg-, amy- und sacQ-empfindlicher Promotor, z. B. apr.

[0024] Unter "dereguliert" wird verstanden, dass das Ausmaß der Riboflavinproduktion höher ist als das, das bei einem Bakterium beobachtet wird mit natürlichen Riboflavinsteuersystemen (d. h. ein Wildtyp-Bakterium). Beispiele für solche deregulierten Bakterien schließen solche ein, die gegenüber verschiedenen Purinanaloge oder Antagonisten resistent sind, wobei solche Analoga oder Antagonisten z. B. ausgewählt sein können aus

der Gruppe bestehend aus 8-Azaguanin, Psicofuranin, Decoyinin, 8-Azaxanthin, Sulfaguanin, 6-Thioguanin und Methioninsulfoxid und/oder Riboflavinanaloga, z. B. Roseoflavin. Bevorzugte deregulierte Bakterien sind resistent gegenüber mindestens den folgenden Purinanaloga oder Antagonisten 8-Azaguanin oder Decoyinin und Roseoflavin.

[0025] In anderen spezifischen Ausführungsformen schließt mindestens eines der rib-Gene eine Ribosomenbindungsstelle ein, die nicht natürlicherweise mit dem rib-Gen assoziiert ist; die rib-Gene sind an zwei Stellen innerhalb des Chromosoms vorhanden und die rib-Gene sind in einer Vielzahl von Kopien innerhalb des Chromosoms vorhanden. In bevorzugteren Ausführungsformen sind die rib-Gene Bacillus-rib-Gene, z. B. ORF3 und ORF4, wie in [Fig. 4](#) gezeigt, und das Transkriptionselement ist in einem Bereich 5'-stromaufwärts von ORF3 oder ORF5 angeordnet und die rib-Gene sind ausgewählt aus β -Riboflavinsynthase codierendem Gen, ORF2, ORF3, ORF4 und ORF5 und das Bakterium gehört zu einer Art von Escherichia, z. B. E. coli, Bacillus, z. B. B. subtilis, Klebsiella oder Corynebacterium.

[0026] Gemäß einem weiteren verwandten Aspekt liefert die Erfindung eine Nucleinsäure, die fünf oder mehr rib-Gene enthält, deren Expression von einem Transkriptionselement kontrolliert wird, das nicht natürlicherweise mit diesem rib-Gen assoziiert ist.

[0027] Gemäß einem weiteren Aspekt offenbart das Patent einen Vektor, der als erstes eine Nucleinsäuresequenz bakteriellen Ursprungs, insbesondere aus Bacillus, wobei B. subtilis bevorzugt ist, oder aus E. coli oder aus Hefe, die ein oder mehrere Riboflavinbiosynthesepoteine, wobei mindestens fünf bevorzugt sind, codiert und als zweites ein oder mehrere, wobei ein oder zwei bevorzugt sind, Transkriptionselemente, die nicht natürlicherweise mit dieser Nucleinsäuresequenz verbunden sind, umfasst. Solche Vektoren sind bevorzugt, bei denen die Transkriptionselemente wie bereits oben angegeben sind. Weiter bevorzugt sind Vektoren, wie in den Beispielen angegeben, z. B. pRF50, pRF69, pRF70, pRF71, pRF78, pRF81 und/oder pRF89.

[0028] Das Patent offenbart ein rekombinantes Bakterium, das ein Bakterium umfasst, das mit einem Vektor, wie oben angegeben, transformiert wurde, wodurch mindestens eine Kopie, bevorzugt eine Vielzahl von Kopien, der Nucleinsäuresequenz mit den Transkriptionselementen an einem oder mehreren Orten in dem Chromosom eingeführt wurde und wobei die Nucleinsäuresequenz, die die Transkriptionselemente einschließt, vererbbar ist und von dem Bakterium exprimiert werden kann, so dass die Riboflavinbiosynthese des Bakteriums erhöht ist verglichen mit einem Bakterium, dem eine solche Nucleinsäuresequenz mit Transkriptionselementen fehlt. Die Einführung an ein oder zwei solchen Orten ist bevorzugt. Weiterhin sind rekombinante Bakterien bevorzugt, bei denen das Bakterium, das transformiert ist, bereits bezüglich der Riboflavingenexpression dereguliert ist. Von diesen deregulierten Bakterien sind E. coli oder Bacillus, insbesondere B.-subtilis-Stämme bevorzugt, wobei die B.-subtilis-Stämme RB50 und RB58 besonders bevorzugt sind.

[0029] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Bakteriums, bei dem ein Bakterium, insbesondere ein solches, wie oben angegeben, mit einem Vektor transformiert wird, der eine Nucleinsäuresequenz bakteriellen Ursprungs oder aus Hefe enthält, die ein oder mehrere Riboflavinbiosynthesepoteine codiert oder einen Vektor, wie oben angegeben, bei dem mindestens eine Kopie, bevorzugt eine Mehrzahl von Kopien der Nucleinsäuresequenz, die gegebenenfalls Transkriptionselemente enthält, an einem oder mehreren, bevorzugt ein oder zwei Orten in dem Chromosom eingeführt wird und die Nucleinsäure, die gegebenenfalls Transkriptionselemente enthält, vererbbar ist und von den Bakterien exprimiert werden kann, so dass die Riboflavinbiosynthese des Bakteriums erhöht ist bezogen auf ein Bakterium, dem diese Nucleinsäuresequenz, die gegebenenfalls Transkriptionselemente enthält, fehlt.

[0030] Die Erfindung betrifft auch Bakterien, wie oben angegeben, bei denen ein oder mehrere Transkriptionselemente, die natürlicherweise mit den rib-Biosynthesegenen in dem Chromosom dieser Bakterien verbunden sind, durch Transkriptionselemente, wie oben angegeben, ersetzt sind. Solche Ersetzungen können auf Basis der Beschreibung der vorliegenden Erfindung und mit im Stand der Technik bekannten Methoden erfolgen.

[0031] Gemäß einem weiteren Aspekt liefert die Erfindung eine Methode oder ein Verfahren zur Herstellung von Riboflavin. Das Verfahren schließt ein, dass man Zellen, insbesondere rekombinante Bakterien, wie oben spezifisch erwähnt, unter geeigneten Wachstumsbedingungen züchtet. Solche geeigneten Wachstumsbedingungen sind dadurch gekennzeichnet, dass die Verfügbarkeit einer Komponente des Wachstumsmediums und/oder des Nährmediums in solcher Weise limitiert ist, dass aerobe Bedingungen für das Wachstum des rekombinanten Bakteriums erhalten bleiben. Solche Bedingungen können auch z. B. dadurch gekennzeichnet werden, dass der Gehalt an gelöstem Sauerstoff auf einer Konzentration zwischen etwa 5 und 30% gehalten

wird. Dem Fachmann auf diesem Gebiet ist die Tatsache bekannt, dass solche Gehalte an gelöstem Sauerstoff variieren können abhängig von der spezifischen technischen Ausstattung, die für das Züchten solcher rekombinanten Bakterien verwendet wird und davon, wie diese Konzentration an gelöstem Sauerstoff gemessen wird. Unter anaeroben Bedingungen ist die Synthese von Riboflavin vermindert. In einigen Ausführungsformen wird die limitierende Komponente ausgewählt aus einer Kohlenstoffquelle, einer Stickstoffquelle oder einer Komponente, die die Zellen erfordern (z. B. im Nährmedium). Wenn z. B. die Zellen auxotroph sind, z. B. bezüglich Methionin, kann ein begrenzender Gehalt an Methionin in dem Wachstumsmedium bereitgestellt werden. In einem weiteren Beispiel könnte eine solche Komponente Glucose oder eine Carbonsäure, z. B. eine Säure des Citronensäurezyklus, z. B. Citronensäure oder Bernsteinsäure, oder eine Aminosäure sein.

[0032] Gemäß einem verwandten Aspekt liefert die Erfindung eine weitere Methode, um die Produktion an Riboflavin in einem Bakterium zu erhöhen. Bei dieser Methode ist der verwendete Bakterienstamm bezüglich der Riboflavinproduktion dereguliert. Mehr als eine Kopie einer Nucleinsequenz, die ein oder mehrere Riboflavinbiosynthesepoteine codiert, wird in die Chromosomen-DNA dieses Bakteriums eingeführt. Bevorzugt wird das für diese Methode verwendete Bakterium aus einem der oben beschriebenen ausgewählt. Die Erfindung betrifft auch eine Methode zur Herstellung von Riboflavin, indem ein rekombinantes Bakterium gezüchtet wird, das mit einem Verfahren, wie oben angegeben, unter den ebenfalls oben angegebenen Bedingungen erhalten wurde.

[0033] Gemäß weiteren Aspekten der Erfindung werden gereinigte Nucleinsäure und das rekombinante Polypeptidprodukt einer solchen Nucleinsäure bereitgestellt. Allgemein besteht die gereinigte Nucleinsäure im Wesentlichen aus dem gesamten oder einem Teil des rib-Operons, z. B. den spezifischen offenen Leserahmen, die in **Fig. 3** gezeigt sind. Eine solche gereinigte Nucleinsäure kann in einem Vektor, z. B. einem Plasmid, Phagen oder Cosmid bereitgestellt werden oder kann in dem Chromosom eines Bakteriums integriert sein. Diese Nucleinsäure wird von der Nucleinsäure, mit der sie natürlicherweise verbunden ist, getrennt. Z. B. können 6,5 kb der Nucleinsäure, die das gesamte rib-Operon codiert, in ein *Bacillus-subtilis*-Chromosom inseriert werden an einem Ort, der von dem Ort verschieden ist, an dem die 6,5-kb-DNA normalerweise vorhanden ist. Unter rekombinantem Polypeptid wird ein biologisch aktives Protein verstanden, das frei ist von fremdem Polypeptid (d. h. nicht mit einem heterologen Polypeptid fusioniert ist) mit einer enzymatischen Aktivität, die der eines natürlich erzeugten Polypeptids äquivalent ist.

[0034] Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der folgenden Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen und aus den Ansprüchen.

[0035] Zuerst werden kurz die Zeichnungen beschrieben:

[0036] **Fig. 1.** Der Riboflavinbiosyntheseweg, modifiziert von Keller et al., *Biochem. 27: 1117 (1988)*. Die gezeigten entsprechenden Zwischenprodukte sind die, die von *E. coli* erzeugt werden (die wahrscheinlich die gleichen sind, die von *B. subtilis* erzeugt werden): Struktur 1, Guanosintri-phosphat (GTP); Struktur 2: 2,5-Diamino-6-(ribosylamino)-4-(3H)pyrimidinon-5'-phosphat; Struktur 3: 5-Amino-6-(ribosylamino)-2,4-(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat; Struktur 4: 5-Amino-6-(ribitylamino)-2,4-(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat; Struktur 5: 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin; Struktur 6: Riboflavin. Die biosynthetischen Enzyme, die angegeben sind, sind die, die von *B. subtilis* codiert werden (GTP-Cyclohydrolase, α - und β -Untereinheiten von Riboflavinsynthase) oder solche, von denen vorgeschlagen wird, dass sie von *B. subtilis* codiert werden (eine rib-spezifische Deaminase und eine rib-spezifische Reductase).

[0037] **Fig. 2.** Schematische Darstellung der Purinbiosynthese. Der Purinbiosyntheseweg mit dem Teil, der für die Riboflavinbiosynthese verantwortlich ist, ist dargestellt. Die einzelnen Enzyme des Stoffwechselwegs sind durch ihre Gensymbole angegeben (*E.-coli*-Nomenklatur). Die Abkürzungen sind wie folgt: PRPP: Phosphoribosylpyrophosphat; GAR: Glycinamidribonucleotid; pur: GAR-Formyltransferase; PRA: Phosphoribosylamin; purA: Adenylosuccinatsynthetase; purB: Adenylosuccinatsynthetase; FGAR: Formylglycinamidribonucleotid; SAICAR: Aminoimidazolsuccinocarboxamidribonucleotid; purC: SAICAR-Synthetase; FGAM: Formylglycinamidinribonucleotid; purD: GAR-Synthetase; AIR: Aminoimidazolribonucleotid; purE: AIR-Carboxylase; CAIR: Carboxyaminoimidazolribonucleotid; purF: PRPP-Amidottransferase; AICAR: Aminoimidazolcarboxamidribonucleotid; purH: AICAR-Formyltransferase; purJ: Inosinmonophosphat(IMP)cyclohydrolase; FAICAR: Formamidoimidazolcarboxamidribonucleotid; purL: FGAR-Amidottransferase; guaA, Guanotinmonophosphat(GMP)-synthetase; purM: AIR-Synthetase; guaB: IMP-Dehydrogenase.

[0038] **Fig. 3.** Das vollständige Nucleotid und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen des *B.-subtilis*-rib-Operons. Die Nucleotidsequenz wurde durch Didesoxysequenzierung von M13-Klonen bestimmt. Die

abgeleitete Aminosäuresequenz ist im Ein-Buchstaben-Code angegeben (Lehninger, Biochemistry, 2. Ausgabe, Worth Publishers, Inc., New York, Seite 72).

[0039] Fig. 4. Eine schematische Darstellung des rib-Gen-Clusters. Das obere Diagramm ist die Restriktionsendonucleasekarte des klonierten 10 kb EcoRI-DNA-Fragments in Plasmid pRF2, das das B.-subtilis-rib-Operon enthält. Die Homologie mit der 54-mer-Sonde, die für das Riboflavinsynthasegen spezifisch ist, ist durch einen festen Balken dargestellt. Der schraffierte Kasten zeigt Rib⁺-klonierte DNA, während die dünne schwarze Linie pBR322-DNA zeigt. Das untere Diagramm basiert auf der vollständigen Nucleotidsequenz des 6,0-kb-Fragments, in dem das rib-Operon lokalisiert wurde. Die offenen Leserahmen sind durch offene Kästchen dargestellt, wobei Pfeile die Richtung der Transkription zeigen und geschlossene Kästchen zeigen die mutmaßlichen Ribosomenbindungsstellen. Wahrscheinliche σ^A -Promotorregionen sind gezeigt. Identifizierte rho-unabhängige Transkriptionsterminationsstellen sind durch ein "Haarnadelsymbol" gezeigt. Es sind nicht alle Restriktionsstellen angegeben.

[0040] Fig. 5. Stammbaum des Stamms RB50. Die Abstammung des Riboflavin überproduzierenden Stamms von B. subtilis, RB50, ist dargestellt. Die verschiedenen Elternstämme wurden Riboflavin und Purinaloga ausgesetzt, um geeignete Mutationen auszuwählen.

[0041] Fig. 6. Die Ursprünge von rib⁺-rekombinanten Plasmiden. Ein schematisches Diagramm der Erzeugung der rekombinanten Plasmide pRF1, pRF2, pRF3, pRF6 und pRF7, die das rib-Operon enthalten, wird dargestellt. Eine Bibliothek mit der Größe nach ausgewählten 9 bis 11 kb-Fragmenten von B.-subtilis-DNA wurde verwendet, um eine Genbibliothek in E.-coli-Plasmidvektoren zu erzeugen. Die Klone wurden ausgewählt durch Hybridisierung mit der 54-mer-Sonde, die für die β -Untereinheit des Riboflavinsynthasegens spezifisch ist.

[0042] Fig. 7. Stammbaum von B. subtilis RB53::[pRF8]₆₀. Das Plasmid pRF8 wurde in das Chromosom des Zwischenstamms RB52 integriert und amplifiziert; der entstehende Stamm wurde dem Purinanalogen Azaguanin ausgesetzt.

[0043] Fig. 8. Identifikation von Regionen, die für die Riboflavinbiosynthese essentiell sind, unter Verwendung von Insertionen und Deletionen. Ein Diagramm des klonierten EcoRI-DNA-Fragmentes mit 10 kb ist gezeigt, wobei die Regionen, die für die Riboflavinbiosynthese essentiell sind, angegeben sind. Insertionen und Deletionen an den angegebenen Restriktionsstellen ermöglichten die Lokalisierung des rib-Operons. Es sind nicht alle Restriktionsstellen gezeigt.

[0044] Fig. 9. Haarnadelstrukturen der möglichen rho-unabhängigen Transkriptionsterminationsstellen. Ihre Anordnungen in der Nucleotidsequenz von Fig. 3 sind unten für jede Struktur gezeigt. Es ist auch die freie Energie der Bildung gezeigt, die gemäß Tinoco et al. bestimmt wurde (Nature (London) New Biology 246: 40 (1973)).

[0045] Fig. 10. Struktur verschiedener Plasmidderivate, die mit S-30 für in-vitro-gekuppelte Transkriptions/Translationsreaktionen verwendet werden. Ein schematisches Diagramm der rib-Operon-Regionen wird gezeigt, die in den Plasmidderivaten enthalten sind, die in den S-30-Reaktionen verwendet werden, ebenso wie die offenen Leserahmen, die gemäß Vorhersage exprimiert werden sollen.

[0046] Fig. 11. Vergleich von Riboflavinproduktionskurven. Riboflavinproduktionskurven für verschiedene Fermentationsprotokolle sind gezeigt.

Offene Quadrate:	RBF-14 unter Verwendung von RB50::[pRF8] ₆₀ (Ade ⁻).
Gefüllte Quadrate:	RBF-22 unter Verwendung von RB50::[pRF8] ₆₀ (Ade ⁻).
Offene Kreise:	RBF-23 unter Verwendung von RB50::[pRF8] ₆₀ (Ade ⁻).
Gefüllte Kreise:	RBF-29 unter Verwendung von RB50::[pRF8] ₆₀ (Ade ⁺).

[0047] Fig. 12. Konstruktion von pRF40.

[0048] Fig. 13. Konstruktion von pRF50.

[0049] [Fig. 14](#), [Fig. 15](#) und [Fig. 16](#). Struktur verschiedener Vektoren.

[0050] [Fig. 17](#). 55-mer, das für die Plasmidkonstruktion verwendet wird.

[0051] [Fig. 18](#). Verschiedene Oligonucleotide, die für die Vektorkonstruktion verwendet werden.

[0052] Bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung werden Bakterienstämme abgeleitet, die eine oder mehrere Mutationen in Genen des Riboflavinbiosynthesewegs oder im Biosyntheseweg verschiedener Purine enthalten, wobei die Mutationen zu einer Riboflavinüberproduktion führen. In einer Ausführungsform führten diese Mutationen zu einer Riboflavinüberproduktion, indem Stufen im Riboflavinbiosyntheseweg dereguliert wurden. In einer anderen Ausführungsform erhöhen die Mutationen die Riboflavinproduktion, indem sie bei der Verwendung für einen alternativen metabolischen Weg eine Hemmung eines Vorläufers der Riboflavinbiosynthese verursachen.

[0053] In einer spezifischen Ausführungsform können gewünschte Mutationen im genetischen Hintergrund der Wirtsbakterien induziert werden, indem sie Analogen von Purin oder Riboflavin ausgesetzt werden, die mit ihren authentischen Gegenstücken im Stoffwechselweg des Wirts konkurrieren; Bakterien, die eine solche Exposition überleben, werden Mutationen aufweisen, die es ihnen erlauben, das ursprüngliche Gegenstück zu dem Analogon überzuproduzieren, und damit das Purin- oder Riboflavinanalogon "auszustechen", das ansonsten letal wäre. Die Biosynthese von Riboflavin in *B. subtilis* beginnt mit Guanosintriphosphat ([Fig. 1](#), Strukturformel 1). Guanosintriphosphat (GTP) ist über Guanosinmonophosphat (GMP) ein Produkt des Purinbiosynthesewegs ([Fig. 2](#)). In einer bevorzugten Ausführungsform kann man, um einen Wirkstamm zu erhalten, der Riboflavin überproduziert, die klassische Genetik verwenden, um sowohl die Menge an GTP, die die Zellen produzieren, zu erhöhen, als auch den Riboflavinweg zu deregulieren. Die Purinüberproduktion in *B. subtilis* kann erreicht werden, indem Mutanten erhalten werden, die gegenüber Purinanaloga oder Antagonisten resistent sind. Beispiele für einige Purinanaloga, die verwendet werden können, schließen 8-Azaguanin (Ishii und Shii, *Agric. Biol. Chem.*, 36: 1511, 1972; Konishi und Shiro, *Agric. Biol. Chem.*, 32: 396, 1968), Psicofuranin und Decoyinin (Matsui et al., *Agric. Biol. Chem.*, 43: 1739, 1979; Matsui et al., *Agric. Biol. Chem.*, 43: 393, 1979), 8-Azaxanthin, Sulfaguanin, 6-Thioguanin (Debabov, V. G. in *The Molecular Biology of the Bacilli*, Bd. 1, *Bacillus subtilis*, D. A. Dubnau, Herausgeber (Academic Press, New York), Seiten 331–370, 1982) und andere, und/oder den Antagonisten Methioninsulfoxid (Matsui et al., *App. Env. Microbiol.*, 34: 337, 1977) und irgendeine Kombination davon ein, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0054] Der Riboflavinweg kann dereguliert werden, indem Mutanten erhalten werden, die gegen ein Riboflavinanalogon resistent sind. Ein Beispiel eines Riboflavinanalogs, das verwendet werden kann, ist Roseoflavin (Matsui et al., *Agric. Biol. Chem.* 46: 2003, 1982).

[0055] In einer spezifischen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können Bakterien, die durch Mutationen gegenüber den Analoga Azaguanin, Decoyinin und Roseoflavin resistent sind, verwendet werden. Spezifische Mutanten, die gegen jede dieser Verbindungen resistent sind, werden unten beschrieben. Bakterien mit Mutationen, die sie resistent gegenüber anderen Analoga machen, können auch verwendet werden. Es wird auch als im Schutzbereich der vorliegenden Erfindung liegend angesehen, Bakterien mit verschiedenen Mutationen zu verwenden, die eine Resistenz gegenüber diesen Analoga erzeugen, oder verschiedene Kombinationen dieser Mutationen, entweder in Kombination, mit oder ohne verschiedene Mutationen gegenüber anderen Analoga zu verwenden.

[0056] Wenn der Kontakt mit dem Analog alleine keine resistenten Mutanten in ausreichender Häufigkeit erzeugt, können verschiedene Mutagene verwendet werden, um die Mutationshäufigkeit allgemein zu erhöhen und damit die Anzahl von Analogresistenten Mutanten zu erhöhen. Als ein Beispiel kann Ethylmethylsulfonat verwendet werden, aber andere Mutagene können auch verwendet werden, unter anderem Nitrosoguanidin oder UV-Strahlung, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0057] Geeignete Bakterienwirte schließen alle Bacilli-Arten (einschließlich *B. subtilis* in einer bevorzugten Ausführungsform), *E. coli* und viele andere Gram-positive und Gram-negative Bakterien ein. Arten, die die Promotorsequenzen des klonierten rib-Operons, das in ihr Genom eingesetzt werden soll, erkennen können, sind zur Verwendung geeignet. Die unten beschriebenen Plasmide können verwendet werden, um rib-Gene in andere Bakterien mit Standardverfahren einzuführen, z. B. mit Transformation. Die Expression der insertierten rib-Gene kann durch Spektroskopie, wie unten beschrieben, bestimmt werden oder durch Beobachtung der Bakterien unter UV-Licht, wie unten beschrieben.

[0058] Zusätzlich zur Erzeugung von Mutationen durch Kontakt mit Purin- oder Riboflavinanaloga können Bakterienstämme, die bereits Mutationen enthalten, von denen bekannt ist, dass sie deren Purin- oder Riboflavinbiosyntheseweg beeinflussen, verwendet werden. Z. B. verwendet die vorliegende Erfindung *B. subtilis* Stamm 1A382, der die Mutation *pur-60* enthält, was ihn auxotroph für Adenin macht, ohne darauf beschränkt zu sein. Da diese Mutation die Verwertung des Riboflavinvorläufers Inosinmonophosphat (IMP) auf einem anderen Stoffwechselweg als der Riboflavinherzeugung blockiert, sind erhöhte Mengen an IMP für die Riboflavinbiosynthese verfügbar, wodurch die Riboflavinproduktion erhöht wird. Es gibt viele andere Mutationen, die verwendet werden können, um potenziell die Riboflavinproduktion zu erhöhen, unter anderem *guaC3*, *his⁻* und andere, ohne darauf beschränkt zu sein, die im Schutzbereich der vorliegenden Erfindung enthalten sind. Die *guaC3*-Mutation verhindert die Umwandlung von GMP zurück in IMP (siehe [Fig. 2](#)), was die Menge an verfügbaren Riboflavin-Biosynthesevorläufern erhöht.

[0059] Geeignete Mutationen, die die Riboflavinüberproduktion beeinflussen, können mit verschiedenen Methoden, die im Stand der Technik bekannt sind, kartiert werden. In einer spezifischen Ausführungsform kann eine Mutation durch Ergänzung auxotropher Mutanten kartiert werden.

[0060] Die Riboflavinbiosynthesegene von verschiedenen Bakterien können für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung kloniert werden. Hefe- oder Bakterienzellen von Arten einschließlich der Gattung *Bacillus*, *E. coli* und viele andere Gram-positive und Gram-negative Bakterien können potenziell als Nucleinsäurequelle für das molekulare Klonieren des *rib*-Operons dienen, ohne darauf beschränkt zu sein. Die DNA, die das *rib*-Operon enthält, kann mit Standardverfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, erhalten werden, z. B. aus einer DNA-Bibliothek, die hergestellt wird, indem Chromosomen-DNA oder Fragmente davon kloniert werden, aus der gewünschten Bakterienzelle gewonnen werden und zur Vermehrung des Gens in einen geeigneten Vektor eingesetzt werden. (Siehe z. B. Maniatis et al., 1982, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; D. M. Glover (Herausgeber), 1982, *DNA Cloning: A Practical Approach*, MRL Press, Ltd., Oxford, G. B., Bd. I, II).

[0061] Bei der molekularen Klonierung des Gens aus Chromosomen-DNA werden Fragmente erzeugt, von denen einige das gewünschte *rib*-Operon codieren. Die DNA kann an spezifischen Stellen unter Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme gespalten werden. Alternativ kann man DNase in Gegenwart von Mangan verwenden, um die DNA zu fragmentieren oder die DNA kann physikalisch durch Schereinwirkung behandelt werden, z. B. durch Beschallung. Die linearen DNA-Fragmente können dann der Größe nach mit Standardtechniken aufgetrennt werden, unter anderem mit Agarose- und Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Dichtegradientenzentrifugation, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0062] Sobald die DNA-Fragmente erzeugt sind, werden DNA-Bibliotheken erstellt unter Verwendung eines geeigneten Klonierungs- und/oder Expressionsvektors. Eine große Anzahl von Vektor-Wirt-Systemen, die im Stand der Technik bekannt sind, kann verwendet werden. Mögliche Vektoren schließen Plasmide oder modifizierte Viren ein, ohne darauf beschränkt zu sein, aber das Vektorsystem muss mit der verwendeten Wirtszelle kompatibel sein. Für *E. coli* schließen solche Vektoren unter anderem Bakteriophagen, wie λ -Derivate, Plasmide mit hoher Kopienzahl wie pBR322 oder pUC-Plasmide oder Plasmide mit geringer Kopienzahl, die von *Pseudomonas*-Plasmid RK2 stammen, ein, ohne darauf beschränkt zu sein. Für *Bacillus* schließen solche Vektoren unter anderem Bakteriophagen, wie p11 (Dean et al., *J. Virol.* 20: 339, 1976; Kawamura et al., *Gene* 5: 87, 1979) oder $\Delta 105$ -Derivate (Iijima et al., *Gene* 9: 115, 1980; Errington, *J. Gen. Microbiology* 130: 2615, 1984; Dhaese et al., *Gene* 32: 181, 1984; J. Errington in *Bacillus Molecular Biology and Biotechnology Applications*, A. T. Ganesan und J. A. Hoch, Herausgeber (Academic Press, New York), Seite 217, 1986), Plasmide mit hoher Kopienzahl wie pUB110 (Ehrlich, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 74: 1680, 1977) oder pBD64 oder Plasmide mit geringer Kopienzahl wie pE194-Derivate (T. J. Gryczan in *The Molecular Biology of the Bacilli*, D. A. Dubnau, Herausgeber (Academic Press, New York), Seiten 307–329, 1982; Horinouchi und Weisblum, *J. Bacteriol.* 150: 804, 1982) ein, ohne darauf beschränkt zu sein. Rekombinante Moleküle können in Wirtszellen durch Transformation, Transfektion, Protoplastenbildung, Infektion, Elektroporation etc. eingeführt werden.

[0063] Sobald die DNA-Bibliotheken erzeugt sind, kann die Identifizierung der spezifischen Klone, die rekombinante DNA mit dem *rib*-Operon beinhalten, auf einer Vielzahl von Wegen erreicht werden (wie z. B. bei Maniatis et al., oben, beschrieben). Wenn z. B. eine Menge des Operons oder ein Fragment davon aus einer anderen Bakterienquelle verfügbar ist (z. B. von *E. coli*) und ausreichend homolog ist zu den Riboflavinbiosynthesegenen von *Bacillus*, um damit zu hybridisieren, kann diese DNA gereinigt und markiert werden und die erzeugte Bibliothek von DNA-Fragmenten kann durch Nucleinsäurehybridisierung mit markierten Sonden gescreent werden (W. Genton und R. Davis, 1977, *Science* 196: 180; M. Grunstein und D. Hogness, 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 72: 3961). Alternativ können Sequenzen, die offene Leserahmen des endogenen

rib-Operons oder Untersequenzen davon mit etwa 10, bevorzugt 15 oder mehr Nucleotiden umfassen, als Hybridisierungs sonden verwendet werden. Solche Sonden können synthetisch hergestellt werden, basierend auf einem Teil der Nucleinsäure- oder Aminosäuresequenz (wovon Beispiele unten angegeben sind) oder eines Genprodukts, von dem bekannt ist, dass es von dem Operon codiert wird ("reverse Genetik"). Wenn eine gereinigte rib-Operonspezifische Sonde nicht verfügbar ist, können klonierte Genbibliotheken von Restriktionsfragmenten (z. B. von einem teilweisen Sau3A-Verdau) in Bakterien erstellt werden, insbesondere *B. subtilis* oder *E. coli*, und die rib-Operon-haltigen rekombinanten Klone können identifiziert werden entweder durch Wiederherstellung der Markierung oder Komplementierung bekannter rib-Mutationen.

[0064] In einer bevorzugten Ausführungsform kann das rib-Operon von *B. subtilis* aus einer *E.-coli*-Plasmidbibliothek von *B.-subtilis*-DNA zur Verwendung isoliert werden. Insbesondere und wie unten beschrieben, kann das *B.-subtilis*-rib-Operon aufgrund seiner Homologie mit einer radioaktiv markierten, synthetisierten Nucleotidsonde isoliert werden, die von einem inneren Bereich eines Genproduktes stammt, von dem bekannt ist, dass es das Operon von *B. subtilis* codiert. Obwohl ein Teil der Aminosäuresequenz für β -Riboflavinsynthese (Ludwig et al., *J. Biol. Chem.*, 262: 1016, 1987) die Basis für eine solche Sonde sein kann, wobei das dritte Nucleotid jedes Codons bezüglich der Häufigkeit der Codonverwendung geschätzt wird, kann eine ähnliche Sonde basierend auf einem anderen Bereich dieses Proteins oder einem anderen Protein des rib-Operons verwendet werden und würde in den Schutzbereich der vorliegenden Erfindung fallen. Die vorliegende Erfindung ermöglicht weiterhin das Screening durch Verwendung von synthetischen Sonden, die von der in **Fig. 3** gezeigten Nucleinsäuresequenz stammen.

[0065] Analoge Methoden zu den im Detail hier ausgeführten können verwendet werden, um das rib-Operon anderer Bakterien zu isolieren, insbesondere anderer Bacilli oder von *E. coli*. In einer spezifischen Ausführungsform können solche Klone selektiert werden mit einem Assay auf die Fähigkeit, mit markiertem *B.-subtilis*-rib-Operon oder einem hybridisierbaren Anteil davon zu hybridisieren. Es ist im Stand der Technik wohl bekannt, dass ausgehend von einem geeigneten mRNA-Präparat cDNA hergestellt werden kann; eine solche cDNA kann auch erfindungsgemäß verwendet werden, um Vektoren für die Transformation geeigneter Bakterien für die Riboflavinüberproduktion herzustellen.

[0066] Sobald Wirtszellen mit rekombinanten DNA-Molekülen, die das isolierte rib-Operon oder einen Teil davon enthalten, identifiziert sind, kann die DNA in großen Mengen erhalten werden. Dadurch kann dann das rib-Operon manipuliert werden und seine Nucleotidsequenz bestimmt werden unter Verwendung verschiedener Klonierungs- und Sequenzierungstechniken, die dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt sind.

[0067] Zum Beispiel kann eine Insertionsmutagenese verwendet werden, um das rib-Operon und Gene davon innerhalb eines klonierten Stücks DNA zu lokalisieren und charakterisieren. In einer spezifischen Ausführungsform können rib-biosynthesehaltige Regionen identifiziert werden, indem kleine cat-(Chloramphenicolacetyltransferase)-haltige Restriktionsfragmente in mehrere verschiedene Restriktionsenzymstellen der klonierten DNA inseriert werden und jedes Derivat auf Inaktivierung der Riboflavinbiosynthese durch Insertion in einem geeigneten Wirt getestet wird (siehe unten).

[0068] Die dem rib-Operon entsprechende klonierte DNA kann mit Methoden analysiert werden, die Southern-Hybridisierung (E. M. Southern, 1975, *J. Mol. Biol.* 98: 503–517), Northern-Hybridisierung (siehe z. B. Freeman et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 80: 4094–4098), Restriktionsendonucleasekartierung (Maniatis et al., 1982, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) und DNA-Sequenzanalyse einschließen, ohne darauf beschränkt zu sein. Die Restriktionsendonucleasekartierung kann verwendet werden, um grob die genetische Struktur des rib-Operons zu bestimmen. Restriktionskarten, die von einer Spaltung mit Restriktionsendonuclease stammen, können durch DNA-Sequenzanalyse bestätigt werden.

[0069] Die DNA-Sequenzanalyse kann mit irgendeiner im Stand der Technik bekannten Technik durchgeführt werden, unter anderem mit der Methode von Maxam und Gilbert (1980, *Meth. Enzymol.* 65: 499–560), der Sanger-Didesoxymethode (F. Sauger et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74: 5463) oder unter Verwendung eines automatisierten DNA-Sequenzators (z. B. Applied Biosystems, Foster City, CA), ohne darauf beschränkt zu sein. Als Beispiel ist die DNA-Sequenz des rib-Operons von *B. subtilis* in **Fig. 3** dargestellt.

[0070] Wenn die Nucleotidsequenz des rib-Operons bestimmt worden ist, können mögliche offene Leserahmen (ORFs) zusammen mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz des davon codierten Produktes identifiziert werden. Die tatsächliche Identifizierung des codierten Produktes kann z. B. durchgeführt werden, indem S-30-gekuppelte in-vitro-Transkriptions/Translationsreaktionen durchgeführt werden mit verschiedenen ORFs,

die als Matrizen verwendet werden. Verschiedene Mutationsderivate der ORFs können auch auf ihre Aktivität in Funktions-Assays der S-30-Reaktionsprodukte getestet werden, um die Funktion der codierten Produkte zu testen.

[0071] In einer spezifischen Ausführungsform der Erfindung betreffend das B.-subtilis-rib-Operon, die in den Beispielen unten detailliert angegeben ist, wurden die oben beschriebenen Methoden verwendet, um zu bestimmen, ob die B.-subtilis-Riboflavinbiosynthese von einem einzigen Operon mit ungefähr 4,2 kb kontrolliert wird, das fünf Biosynthesegene enthält: die β -Untereinheit von Riboflavinsynthase und ORFs, die mit 2, 3, 4 und 5 bezeichnet sind (siehe [Fig. 4](#)). Es wurde dann gezeigt, dass die ORFs 2, 3, 4 und 5 Proteine codieren mit Molekulargewichten von etwa 15 kd, 47 kd, 26 kd bzw. 44 kd. Wie unten beschrieben, wurde gezeigt, dass der ORF5 eine mögliche rib-spezifische Deaminase codiert, die die Reduktion eines desaminierten Pyrimidins zu einer Ribitylaminobindung in einer frühen Stufe der Riboflavinbiosynthese katalysiert. Unsere Daten deuten auch darauf hin, dass ORF4 die α -Untereinheit von Riboflavinsynthase codiert und ORF3 eine GTP-Cyclohydrolase codiert, während ORF2 möglicherweise eine ribspezifische Reduktase codiert. Es wurde gefunden, dass ORF1 und ORF6 außerhalb der primären Transkriptionseinheit des rib-Operons liegen. Es wurde festgestellt, dass der primäre Ort für den Start der Transkription des rib-Operons wahrscheinlich der scheinbare σ^A -Promotor ist, der 290 bp stromaufwärts des ersten Gens im Operon angeordnet ist. ORF5 ([Fig. 4, P₁](#)). Die codierenden Regionen, Promotoren und Transkriptionsterminationsstellen des B.-subtilis-rib-Operons sind in Tabelle VI unten gezeigt.

[0072] Die vorliegende Erfindung umfasst die Nucleotid- und Aminosäuresequenzen der Gene des rib-Operons ebenso wie Untersequenzen davon, die funktionell aktive Peptide codieren und Sequenzen, die im Wesentlichen gleich sind wie diese Sequenzen. Ein funktionell aktives Peptid, wie es hier verwendet wird, bedeutet ein Protein oder Peptid, das eine Reaktion katalysieren kann, die zur Riboflavinbiosynthese führt. Eine funktionell aktive Nucleinsäuresequenz bedeutet eine Sequenz, die die Riboflavinbiosynthese steuern kann. Eine Sequenz, die im Wesentlichen einer anderen Sequenz gleicht, bedeutet eine Sequenz, die mit deren komplementärer Sequenz hybridisieren kann. Außerdem soll eine Nucleinsäuresequenz, die die Expression einer zweiten Nucleinsäuresequenz nicht natürlicherweise kontrolliert, eine Sequenz sein, die die Expression der zweiten Sequenz in dem Bakterium, aus dem die zweite Sequenz isoliert wurde, nicht kontrolliert.

[0073] Sobald die genetische Struktur des rib-Operons bekannt ist, ist es möglich, die Struktur für eine optimale Verwendung für die vorliegende Erfindung zu manipulieren. Z. B. kann das rib-Operon so bearbeitet werden, dass die Riboflavinproduktion maximiert wird.

[0074] Abhängig von dem verwendeten Wirt-Vektorsystem kann irgendeines aus einer Anzahl geeigneter Transkriptions- und Translationselemente verwendet werden. Promotoren, die von rekombinanter DNA oder mit Synthesetechniken erzeugt werden, können auch verwendet werden, um für die Transkription der insertierten Sequenzen zu sorgen. Wenn in Bakterien vermehrt wird, können die regulatorischen Sequenzen des rib-Operons selbst verwendet werden. In einer Ausführungsform, in der das gesamte rib-Operon oder mehr als ein Gen davon, als polycistronische Nachricht exprimiert werden soll, ist ein prokaryontischer Wirt erforderlich. In einer Ausführungsform, in der ein eukaryotischer Wirt verwendet werden soll, müssen geeignete Steuersequenzen (z. B. ein Promotor) in der rekombinanten DNA stromaufwärts jedes Gens/ORFs, das/der exprimiert werden soll, angeordnet werden.

[0075] Spezifische Startsignale sind auch für eine wirksame Translation insertierter Protein codierender Sequenzen erforderlich. Diese Signale schließen das Startcodon (ATG, GTG oder TTG) und benachbarte Sequenzen, wie die Ribosomen-Bindungsstelle (RBS) ein. Es ist anzumerken, dass die RBS einer gegebenen codierenden Sequenz manipuliert werden kann, um eine effizientere Expression der codierenden Sequenz auf Translationsebene zu bewirken. In den Fällen, in denen ein vollständiger offener Leserahmen des rib-Operons einschließlich des dazugehörigen Startcodons und benachbarter Steuersequenzen in die geeigneten Expressionsvektoren insertiert wird, sind keine zusätzlichen Translationskontrollsignale erforderlich. In den Fällen jedoch, wo nur ein Teil der codierenden Sequenz insertiert wird oder wo die nativen Steuersignale von der Wirtszelle nicht erkannt werden, müssen exogene Translationskontrollsignale einschließlich des Startcodons vorgesehen werden. Das Startcodon muss außerdem in Phase mit dem Leserahmen der Protein codierenden Sequenzen sein, um die Translation des gesamten Inserts sicherzustellen. Diese exogenen Translationskontrollsignale und Startcodons können aus vielen Quellen stammen, sowohl natürlichen als auch synthetischen.

[0076] Außerdem kann ein Wirtszellstamm ausgewählt werden, der die Expression des rib-Operon-Gens/der rib-Operon-Gene moduliert oder modifiziert und das Genprodukt/die Genprodukte in der spezifisch gewünschten Weise prozessiert. Die Expression von bestimmten Promotoren kann in Gegenwart bestimmter Induktoren

erhöht werden; so kann die Expression von gentechnisch hergestellten rib-Operon-Proteinen kontrolliert werden. In einer Ausführungsform können die Steuerregionen oder regulatorischen Bereiche des Operons, z. B. der Promotor und die Terminations/Antiterminationsregelsequenzen manipuliert werden oder durch konstitutive oder wachstumsregulierte Promotoren ersetzt werden, um das rib-Operon zu deregulieren und dadurch die Riboflavinproduktion zu erhöhen. Weiterhin können geeignete Zelllinien oder Wirtssysteme ausgewählt werden, um die gewünschte Modifikation und Prozessierung der exprimierten Proteine sicherzustellen. Viele Manipulationen sind möglich und liegen im Schutzbereich der vorliegenden Erfindung.

[0077] In einer spezifischen Ausführungsform der Erfindung kann die 5'-Steuersequenz des B.-subtilis-rib-Operons entfernt werden und durch einen oder mehrere von verschiedenen B.-subtilis-Promotoren ersetzt werden; eine solche Konstruktion bewirkt eine Expression der rib-Biosynthesegene auf hohem Niveau.

[0078] Dieser Ansatz beinhaltet die Einführung neuer Restriktionsstellen innerhalb einer 20 bis 30 bp-Region zwischen dem Ende des Transkriptionsterminators und der RBS-Sequenz des ersten Gens im Operon ORF5. Solche Restriktionsstellen können entweder durch punktgerichtete Mutagenese eingeführt werden, oder indem alle Steuersequenzen stromaufwärts der rechtesten BgIII-(BgIII_R)-Stelle, die innerhalb der ersten 30 bp von ORF5 angeordnet ist (siehe **Fig. 3** und **Fig. 4**) entfernt werden und an dieser Stelle ein synthetisches Oligonucleotid eingesetzt wird, das am 5'-Ende von ORF5 endet (einschließlich der ribosomalen Bindungsstelle) und neue stromaufwärts gelegene Restriktionsstellen enthält. Sobald diese Konstruktionen erfolgt sind, können promotorhaltige Restriktionsfragmente mit Enden, die mit den neuen Restriktionsstellen kompatibel sind, eingeführt werden, was die Expression der rib-Gene unter der Kontrolle des neuen Promotors verursacht. Sowohl konstitutive als auch wachstumsregulierte B.-subtilis-Promotoren können verwendet werden, unter anderem starke Promotoren aus den lytischen Bakteriophagen-SPO1-Genen, veg, amy (Amylase) und apr (Subtilisin), ohne darauf beschränkt zu sein.

[0079] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung können rib-Operon-DNA-Fragmente, die eine Transkriptionssteueraktivität haben (z. B. Promotoren) verwendet werden, um die Expression heterologer Genprodukte zu steuern.

[0080] Erfindungsgemäß kann das rib-Operon in Bakterien eingeführt werden, unter anderem z. B. Bacilli und E. coli, wo es exprimiert wird. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der bakterielle Wirt einer der oben beschriebenen Mutantenwirte. In einer spezifischen Ausführungsform wird das klonierte rib-Operon in die Wirtschromosomen-DNA integriert, wo sie repliziert und zusammen mit der genomischen DNA des Wirts exprimiert wird. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform werden mehrere Kopien des rib-Operons in die Chromosomen-DNA des Wirts integriert, wodurch eine verstärkte Expression des rib-Operons in dem deregulierten Wirt möglich wird. Eine Methode, mit der dies erreicht werden kann, ist die Chromosomeninsertion eines cat-haltigen rib-Operons gefolgt von einer Chloramphenicolamplifikation des Operons, wie im Detail in den Beispielen unten angegeben. Man kann auch ein tet^r-Gen oder verschiedene andere Arzneimittelresistenzgene verwenden, die in Bacillus exprimiert werden, mit der gleichen Technik.

[0081] In spezifischen Ausführungsformen können Integrationsvektoren, die das rib-Operon-Fragment enthalten, gentechnisch hergestellt werden, damit sie das rib-Operon auf dem kleinstmöglichen DNA-Fragment enthalten, in dem Versuch, eine stärkere Vermehrung des Vektors innerhalb des Wirtschromosoms zu erhalten. Zum Beispiel können Vektor-DNA-Sequenzen deletiert werden und/oder nicht essentielle DNA, die das rib-Operon flankiert, kann entfernt werden.

[0082] Allgemein überleben Bakterien, die für Riboflavin prototroph sind, auf Minimalmedium ohne Riboflavin. Die Erzeugung von Riboflavin kann nachgewiesen werden und quantitativ ausgewertet werden mit verschiedenen Methoden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Überproduktion von Riboflavin leicht beobachtet, wenn überproduzierende Bakterien UV-Licht mit 366 nm ausgesetzt werden, wie unten beschrieben, was eine nachweisbare gelbe Fluoreszenz erzeugt. Viele der gentechnisch erzeugten Plasmide der vorliegenden Erfindung werden z. B. in E. coli hergestellt. Für einige dieser Plasmide wurde eine Überproduktion von Riboflavin mit dieser Methode bestätigt. Die Menge an hergestelltem Riboflavin kann quantitativ bestimmt werden, z. B. mit Reverse-Phase-Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). Zellfreie Überstände von Bakterien können über eine HPLC-Säule fraktioniert werden, wie unten beschrieben, und auf Riboflavin bei 254 nm überwacht werden. Durch Extrapolation von einer Standardkurve kann die Konzentration an Riboflavin aus der Peakfläche auf dem Chromatogramm bestimmt werden.

[0083] Riboflavin kann auch quantitativ ausgewertet werden durch Fluoreszenzspektrophotometrie. Zum Beispiel können Proben, die Riboflavin enthalten, in einem Fluoreszenzspektrophotometer abgelesen werden,

das auf eine Emissionswellenlänge von 525 nm und eine Anregungswellenlänge von 450 nm eingestellt ist.

[0084] Außerdem sind andere Methoden im Stand der Technik verfügbar, um Riboflavin auf Basis seiner physikalischen und biologischen Eigenschaften nachzuweisen oder quantitativ auszuwerten.

[0085] Riboflavin überproduzierende Bakterien können in Gefäßen gezüchtet werden im Bereich von Schüttelkolben bis zu großen "Chargen"-Fermentern, mit Methoden, die im Stand der Technik bekannt sind (siehe unten). In einer bevorzugten Ausführungsform kann die Nährstoffzufuhr manipuliert werden, um die Riboflavin-erzeugung bei minimalen Kosten durch Variieren der Nährstoffe im Medium zu maximieren.

[0086] In einer spezifischen Ausführungsform können amplifizierte *rib*-haltige Gene in hoher Kopienzahl in dem Bakterienchromosom erhalten werden durch Einschluss von etwa 60 µg/ml Chloramphenicol in dem Inoculum-Stamm (aber nicht notwendigerweise im Fermenter). Chemap 14-l-Fermenter können mit 1000 Upm mit einem Kopfdruck von 0,6 atm verwendet werden. Um eine hohe Zelldichte zu erreichen, können verschiedene Kohlenstoffquellen, z. B. Glucose, Saccharose, Säuren des Citronensäurezyklus, Maltose oder Stärke und verschiedene Stickstoffquellen, wie Hefeextrakt, Maisquellwasser, Ammoniak und/oder Proteinhydrolysate verwendet werden. Es ist jedoch wesentlich, Teile dieser Inhaltsstoffe des Mediums auf solche Weise zuzugeben, dass Beschränkungen, die für die Riboflavinproduktion unvorteilhaft sind (z. B. Sauerstoffmangel durch zu hohe Konzentration der Kohlenstoffquelle) vermieden werden. Fermentationsmedien und Bedingungen, die für die Verwendung geeignet sind, sind im Detail unten angegeben.

Beispiele

Beispiel 1: Riboflavin überproduzierende *B.-subtilis*-Mutanten

[0087] In den Beispielen beschreiben wir die Produktion von Stämmen von *Bacillus subtilis*, die Riboflavin überproduzieren. Um dies zu erreichen, wurde klassische Genetik, Gentechnik und Fermentation verwendet. Klassische Genetik mit Selektion unter Verwendung von Purin- und Riboflavinanaloga wurde verwendet, um den Stoffwechselweg für Purin (Riboflavinvorläufer) und die Riboflavinbiosynthese zu deregulieren. Die Riboflavinproduktion wurde weiter erhöht, indem die Gene des Riboflavinbiosynthesewegs (das *rib*-Operon) kloniert und gentechnisch hergestellt wurden, was eine konstitutive Erzeugung der geschwindigkeitsbegrenzenden biosynthetischen Enzyme auf hohem Niveau zulässt.

Die Biosynthese von Riboflavin in *B.-subtilis*-Abkömmlingen mit GTP ([Fig. 1](#))

[0088] Um einen Wirt zu erhalten, der Riboflavin überproduziert, wurde die klassische Genetik verwendet, sowohl um die Menge an GTP, die die Zelle produziert, zu erhöhen als auch den Riboflavinstoffwechselweg zu deregulieren. Die Purinüberproduktion in *B. subtilis* kann erreicht werden, indem Mutanten erhalten werden, die resistent sind gegenüber Purinanaloga, wie Azaguanin und Decoyinin und gegenüber anderen Antagonisten, wie Methioninsulfoxid (siehe z. B. Ishii und Shii, *Agric. Biol. Chem.* 36(9): 1511–1522, 1972; Matsui et al., *Agric. Biol. Chem.* 43(8): 1739–1744, 1979). Der Riboflavinweg kann dereguliert werden, indem Mutanten erhalten werden, die resistent sind gegenüber dem Riboflavinanalogon Roseoflavin (Matsui et al., *Agric. Biol. Chem.* 46(8): 2003–2008, 1982).

[0089] Roseoflavin-resistente Stämme wurden aus verschiedenen Stämmen ausgewählt, die vorher mutagenisiert worden waren und die gegenüber verschiedenen Purinanaloga resistent waren. Unten beschrieben sind die Methoden, die verwendet werden, um einen Stamm zu erzeugen (RB50), der Riboflavin überproduziert.

8-Azaguanin-resistente Mutanten

[0090] *B. subtilis* wird von dem Purinanalogon 8-Azaguanin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) bei einer Konzentration von 500 µg/ml wirksam abgetötet und resistente Mutanten treten spontan mit einer Häufigkeit von weniger als 1 pro 10⁸ auf. Ethylmethylsulfonat (EMS; Sigma) mit 30 µg/ml wurde als Mutagen verwendet, um die Häufigkeit von Azaguanin-resistenten (Ag^r)-Mutationen zu erhöhen. Die Mutagenese wurde an Zellen des *B.-subtilis*-Stamms 168 mit Standardverfahren durchgeführt (Miller, 1972, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Nach dem Ausplattieren von 4 × 10⁶ mutagenisierten Zellen auf Minimalmedium (Sloma et al., *J. Bact.* 170: 5557, 1988), das 500 µg/ml Azaguanin enthielt, und dem erneuten Ausstreichen einzelner Kolonien ergaben sich 35 Ag^r-Kolonien. Eine Mutante, RB11 (Ag^r-11), wurde bei der Konstruktion von RB50 verwendet.

Decoyinin-resistente Mutanten

[0091] Decoyinin-resistente (Dc^r)-Mutationen wurden spontan mit einer Häufigkeit von 1 auf 10^6 oder nach EMS-Mutagenese von 1 auf 10^8 erhalten, indem Zellen auf Minimalmedium ausplattiert wurden, das 100 $\mu\text{g/ml}$ Decoyinin (Upjohn Co., Kalamazoo, MI) enthielt. Eine Dc^r -Mutante von RB11 wurde erhalten durch Mutagenese mit EMS, wie oben beschrieben. Eine Dc^r -Kolonie, RB15 (Ag^r -11, Dc^r -15) wurde für die Konstruktion von RB50 verwendet.

Transfer der Ag- und Dc-Mutationen

[0092] Diese gegenüber Purinanaloga resistenten Mutationen wurden in Stämme mit verschiedenem Hintergrund überführt, um sie von irgendwelchen unerwünschten durch EMS induzierten Mutationen zu isolieren und sicherzustellen, dass die Ag^r - und Dc^r -Mutationen auf einem einzelnen Locus beruhten. Da ein Teil des "Kohlenstoffflusses" von Inosinmonophosphat (IMP), einem Riboflavinvorläufer, auch für die Adeninnucleotidbiosynthese verwendet wird, wurde ein Wirtsstamm ausgewählt, bei dem der Adenosinmonophosphat-(AMP)-Weg über die Mutation pur-60 blockiert war, wodurch mehr Kohlenstoffmaterial von IMP zu den Guaninnucleotidvorläufern von Riboflavin "fließen" kann ([Fig. 2](#)). Der *B.-subtilis*-Stamm 1A382 (*his* H2, *trp*C2, pur-60) wurde kompetent gemacht (Sloma et al., *J. Bact.* 170: 5557 (1988)) und (mit der Methode von Gryczan et al., *J. Bact.* 134: 318 (1978)) mit der gesamten DNA, die aus der Ag^r/Dc^r -Mutante RB15 präpariert worden war, transformiert. Die Trp^+ -(Tryptophan)-Revertanten-Kolonien wurden ausgewählt, wobei 3,3% (10/300) von diesen auch Dc^r waren und 2,3% (7/300) Ag^r waren. Dieses Ergebnis war nicht unerwartet, da aufgrund der "Kongression" (Transformation eines zweiten ungebundenen Markers) eine Anzahl von Trp^+ -Kolonien auch resistent gegenüber Decoyinin oder Azaguanin sein sollte.

[0093] Eine Dc^r -Kolonie, RB36 (*his* H2, pur-60, Dc^r -15), eine Ag^r -Kolonie, RB40 (*his* H2, pur-60, Ag^r -11) und eine Dc^r/Ag^r -Kolonie (die sich auch als *his*⁺ erwies), RB39 (pur-60, Ag^r -11, Dc^r -15) wurden für die weitere Untersuchung ausgewählt.

Methioninsulfoxid-resistente Mutanten

[0094] Eine Selektion unter Verwendung hoher Anteile von Methioninsulfoxid (MS; 10 mg/ml, Sigma) führte zum Auftreten spontaner Mutanten in einer ausreichend hohen Häufigkeit, so dass eine Mutagenese mit EMS nicht notwendig war. Die Ag^r/Dc^r -Mutante, RB39, wurde auf Minimalmedium, das 10 $\mu\text{g/ml}$ MS enthielt, ausgestrichen. Resistente Kolonien wurden erhalten und wurden wieder ausgestrichen, um einzelne resistente Kolonien zu erhalten. Ein Stamm, RB46 (pur-60, Ag^r -11, Dc^r -15, MS^r -46) wurde für die weitere Untersuchung ausgewählt.

Roseoflavin-resistente Mutanten

[0095] Obwohl es wahrscheinlich war, dass viele dieser Ag^r -, Dc^r - und MS^r -Mutanten GTP überproduzieren, erzeugte keiner von diesen nachweisbare Anteile an Riboflavin auf den Platten. Um den Riboflavinbiosyntheseweg zu deregulieren, wurden Bedingungen bestimmt, um auf die Resistenz gegenüber dem Riboflavinanalogon Roseoflavin auszuwählen (Toronto Research Chemical). Eine maximale Tötungsrate der Zellen erfolgte bei 100 $\mu\text{g/ml}$ Roseoflavin in Minimal- oder Kompletmedium; eine Erhöhung der Konzentration führte nicht zu einem weiteren Abtöten. Mutationen der Roseoflavinresistenz (RoF^r) traten spontan in einer ausreichend hohen Rate (ungefähr 5×10^{-5}) auf, so dass eine Mutagenese mit EMS oder anderen Chemikalien nicht notwendig war.

[0096] Ungefähr 1000 RoF^r -Kolonien wurden von jedem der oben beschriebenen Stämme erhalten, 1A382, RB36, RB39, RB40 und RB46. RoF^r -Mutanten aller dieser Stämme zeigten einen geringen Grad an Fluoreszenz auf Minimalmediumplatten, wenn sie langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgesetzt wurden, was auf eine gewisse Riboflavinproduktion deutet. Eine der aus RB46 erhaltenen RoF^r -Kolonien, RB46Y (pur-60, Ag^r -11, Dc^r -15, MS^r -46, RoF^r -46) erzeugte, wenn sie auf Minimalmedium gezüchtet wurde, 14 mg/l Riboflavin, was mit HPLC bestimmt wurde (oben beschrieben).

[0097] Von all den behandelten Stämmen erzeugten nur RB39 und RB46 einen signifikant anderen Phänotyp, wenn RoF^r -Kolonien ausgewählt wurden. Ungefähr 0,5% bis 1,0% der RoF^r -Kolonien entweder von RB39 oder RB46 erzeugten eine intensiv fluoreszierende gelbe Kolonie. Von diesen Kolonien erzeugte RB51 (pur-60, Ag^r -11, Dc^r -15, RoF^r -51), die aus RB39 entstanden war, und RB50 (pur-60, Ag^r -11, Dc^r -15, MS^r -46, RoF^r -50), die aus RB46 entstanden war, einen stabilen, fluoreszenzgelben Phänotyp, der mit einem höheren Anteil an

Riboflavinproduktion korrelierte, was mit HPLC bestimmt wurde. Wenn RB50 und RB51 in Minimalmedium gezüchtet wurden, erzeugten beide höhere Anteile an Riboflavin im Überstand, als die anderen RoF⁻-Stämme, etwa 40 mg/l bzw. 30 mg/l. Die Abstammung von RB50 ist in [Fig. 5](#) dargestellt.

[0098] Da intensiv fluoreszierende (und somit Riboflavin überproduzierende) Kolonien in Nicht-MS⁻-Stämmen, wie RB51, erhalten werden konnten, schien es, dass diese Mutation im Allgemeinen nicht wesentlich zu dem Phänotyp mit höherer Produktion beitrug. Die beiden anderen Mutationen, Ag⁻ und Dc⁻ (Ag⁻-11 und Dc⁻-15 bei RB39) scheinen notwendig zu sein, um hohe Anteile an Riboflavin zu erzeugen, da keine intensiv fluoreszierenden RoF⁻-Kolonien in solchen Stämmen gefunden werden konnten, die nur die Ag⁻-11- (von RB40) oder Dc⁻-15-(von RB36)-mutation allein enthielten.

guaC-Mutationen

[0099] Eine andere möglicherweise wichtige Mutation, um eine Überproduktion von GTP, und somit Riboflavin, zu erreichen, ist *guaC3*, die die Umwandlung von GMP zurück in IMP verhindert (siehe [Fig. 2](#)). Um einen Stamm zu konstruieren, der *guaC3* enthält, der Riboflavin überproduziert, wurden kompetente Zellen des *B. subtilis*-Stammes 62121 (*guaC3*, *trpC2*, *metC7*) (Endo et al., J. Bact. 15: 169, 1983) mit RB50-DNA transformiert und auf Dc⁻ selektiert auf Platten, die 100 µg/ml Decoyinin enthielten. Tausende von Dc⁻-Kolonien entstanden. Von 200 Kolonien, die auf Dc⁻-Platten getüpfelt wurden, wurde eine gefunden, die den Phänotyp der Riboflavinüberproduktion aufwies (bezogen auf UV-Fluoreszenz) und RoF⁻ war. Diese Kolonie wurde mit RB52 (*guaC3*, *trpC2*, *metC7*, Dc⁻-15, RoF⁻-50) bezeichnet und wurde für die nachfolgende Untersuchung aufbewahrt.

Andere Analogon-resistente Mutanten

[0100] Da von Mutanten, die resistent gegenüber verschiedenen weiteren Purinanaloga waren, berichtet wurde, dass ihr Purinmetabolismus verändert ist, wurden schließlich Mutationen untersucht, um deren Wirkung auf Riboflavin überproduzierende Stämme festzustellen. Es wurde festgestellt, dass 500 g/ml 8-Azaxanthin, 1 mg/ml 6-Thioguanin oder 2 mg/ml Sulfaguanidin (Sigma) Wildtyp-*B. subtilis* wirksam töten. Es wurde gefunden, dass die Azaguanin-resistenten, Riboflavin überproduzierenden Stämme RB50::[pRF8]₉₀ und RB53::[pRF8]₉₀ (siehe unten) bereits resistent gegen Azaxanthin sind. Obwohl getrennte Azaguanin- und Azaxanthin-resistente Mutationen mit verschiedenen Eigenschaften vorher beschrieben wurden, schienen in diesem Fall die Agr-11 und Agr-53-Mutationen auch die Azaxanthinresistenz beizutragen.

HPLC-Analyse von Riboflavin in rohen Überständen von *B. subtilis*

[0101] Die Anreicherung von Riboflavin in *B. subtilis*-Kulturen wurde quantitativ mit Reverse-Phase-HPLC ausgewertet. Riboflavinstandards (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) oder zellfreie Überstände von den zu testenden Stämmen wurden mit einer 4,6 mm × 250 mm Vydac C₁₈-Säule fraktioniert, die mit 1% Ammoniumacetat (pH 6,0) equilibriert worden war. Bei der Injektion wurde die Säule mit einem linearen Gradienten von Methanol entwickelt und auf Riboflavin mit 254 nm überwacht. Authentisches Riboflavin (d. h. Riboflavin-"Standard") eluiert am Mittelpunkt des Gradienten.

Beispiel 2: Klonierung des *rib*-Operons von *B. subtilis*

[0102] Die allgemeine Strategie zur Isolierung eines Restriktionsfragmentes, das das *rib*-Operon enthielt, bestand darin, eine "Mini"-*E. coli*-Plasmidbibliothek von *B. subtilis*-DNA zu screenen durch Hybridisierung mit einer synthetischen Oligonucleotidsonde, deren DNA-Sequenz teilweise aus der veröffentlichten Aminosäuresequenz für die β-Untereinheit der Riboflavinsynthase abgeleitet war (Ludwig et al., J. Biol. Chem. 262: 1016, 1987). Eine Zusammenfassung des Protokolls ist in [Fig. 6](#) dargestellt.

[0103] Eine synthetische 54-Basen-"guess-a-mer"-Oligonucleotidsonde wurde für dieses Screening verwendet auf Basis der Aminosäuren 84 bis 102 des Riboflavinsynthaseproteins mit 240 Aminosäuren, das von Ludwig et al. sequenziert worden war (J. Biol. Chem. 262: 1016–1021, 1987). Das dritte Nucleotid jedes Codons in der Sonde wurde nach der häufigsten Codonverwendung von *B. subtilis* ausgewählt z. B. auf Basis einiger Sequenzen, die bei der GenBank® (Los Alamos Nat. Lab. Los Alamos, NM) verfügbar sind. Die Sonde bestand aus der folgenden Sequenz:

5' -GGAGCTACAACACATTATGATTATGTTTGAATGAAGCTGCTAAAGGAATTGCT- 3' .

[0104] Um die Spezifität der Sonde zu testen, wurde die ³²P-markierte 54-mer-DNA mit Nylonfiltern hybridisiert, die EcoRI-verdaute Chromosomen-DNA enthielten (Southern, J. Mol. Biol., 98: 503, 1975), die von Wild-

typ- und mutierten *B. subtilis*-Stämmen isoliert worden war. Die Sonde hybridisierte stark mit einem einzelnen 9–10 kb-Fragment von mit EcoRI verdauter *B. subtilis*-(*rib*⁺ *met*⁻)-DNA, was gut übereinstimmt mit der vorhergesagten Größe des *rib*-haltigen Fragments (Osina et al., FEBS. Lett. 196: 75, 1986). Ein markiertes Fragment der identischen Größe wurde nachgewiesen, als die Sonde mit zwei Mutantenstämmen, RB46 (*pur*⁻-60, *Ag*⁻-11, *Dc*⁻-15, *MS*⁻-46) und RB50 (*pur*⁻-60, *Ag*⁻-11, *Dc*⁻-15, *MS*⁻-46, *RoF*⁻-50) hybridisierte, wobei letzterer ein Riboflavinüberproduzierer ist. Diese Hybridisierungsexperimente wurden wiederholt unter Verwendung von mit HindII-geschnittener Chromosomen-DNA, die zu der Sonde führte, mit der ein kleineres einzelnes Fragment mit ungefähr 1,8 kb aufgefunden wurde; letzteres Ergebnis war nützlich, um die allgemeine Anordnung des *rib*-Biosynthese-Operons innerhalb der klonierten DNA zu bestimmen.

Isolierung der Plasmide pRF1, pRF2 und pRF3, die Wildtyp-*rib*-Biosynthesegene enthalten

[0105] Eine "Mini"-Genbibliothek mit 9 bis 11 kb EcoRI-Fragmenten aus DNA von *B. subtilis*-Stamm 168 (*rib*⁺) wurde hergestellt unter Verwendung von pRK290, einem Vektor mit niedriger Kopienzahl, der von dem Pseudomonas-Replikon RK2 abgeleitet ist (Ditta et al., Plasmid 13: 149, 1985). EcoRI-Fragmente (Größe 9 bis 11 kb) von *B. subtilis*-(*rib*⁺ *met*⁻)-DNA wurden mit Saccharose-(10–40%)-Zonenzentrifugation isoliert. Ein vierfacher Überschuss dieser Fragmente (0,22 µg) wurde mit mit EcoRI geschnittenem pRK290 (0,26 µg) ligiert, der mit alkalischer Phosphatase aus Kälbereingeweide (CIAP) dephosphoryliert worden war, mit einer Gesamt-DNA-Konzentration von 10 µg/ml. Ungefähr 10 ng ligierte DNA wurden in *E. coli* DH5 (*F*⁻, *endA*1, *hsdR*11 [*r*_k⁻, *m*_k⁺], *supE*₄₄, *thi*-1, *λ*⁻, *recA*1, *gyrA*96, *relA*1) ligiert, was zu Tetracyclin-resistenten (*Tc*^r) Kolonien mit einer Häufigkeit von $7,7 \times 10^4/\mu\text{g}$ DNA führte. Um die Fraktion von Transformanten zu bestimmen, die die insertierte DNA mit 9 bis 11 kb enthielt, wurden Plasmid-Minilysate aus verschiedenen *Tc*^r-Transformanten hergestellt und deren DNA wurde durch Restriktionsenzymverdau analysiert. Es wurde gefunden, dass etwa 40% der *Tc*^r-Transformanten einzelne mit EcoRI erzeugte Inserts mit 9 bis 11 kb enthielten.

[0106] Ungefähr 1140 der *Tc*^r-Kolonien wurden mit der ³²P-markierten 54-mer-Sonde gescreent, die für das Riboflavinsynthesegen spezifisch ist. Eine Kolonie ergab ein positives Signal. Plasmid-DNA, die mit pRF1 bezeichnet wurde, wurde aus diesem Klon isoliert und bezüglich ihrer Aktivität, den *Rib*⁺-Marker zu retten, getestet, indem die DNA in *B. subtilis* 1A210 transformiert wurde, der die Riboflavin-defiziente Mutation *rib*-2 enthält, und es wurden *Rib*⁺-prototrophe Kolonien ausgewählt. pRF1 transformierte 1A210 mit hoher Frequenz zu *Rib*⁺-Prototrophie. Plasmid-DNA aus einem statistisch ausgewählten *Tc*^r-Transformanten konnte diesen Marker nicht wiederherstellen.

[0107] Eine Restriktionsenzymanalyse ergab, dass pRF1 tatsächlich zwei EcoRI-Fragmentinserts enthielt, mit 10 kb und 11 kb. Um zu bestimmen, welches Fragment das *rib*-Operon enthielt, wurde mit EcoRI verdauter pRF1 mit der ³²P-markierten, 54-mer Riboflavinsynthesonde sondiert. Die Ergebnisse zeigten, dass nur das kleinere Fragment mit 10 kb mit der Sonde kreuzreagierte. Wenn das 10-kb-EcoRI-Fragment wieder in die EcoRI-Stelle von pBR322 kloniert wurde, entstanden außerdem die rekombinanten Plasmide pRF2 und pRF3, die zwei mögliche Orientierungen der Insertion darstellen. Es wurde gefunden, dass beide Plasmide mit hoher Häufigkeit die *rib*-2-Mutation von *B. subtilis* 1A210 mit Prototrophie wiederherstellen.

Isolierung der Plasmide pRF6 und pRF7, die *rib*-Biosynthesegene enthalten, aus *RoF*⁻-*B. subtilis*-Stamm RB50

[0108] RB50 ist einer der *RoF*⁻-Mutanten von *B. subtilis*, die wie oben beschrieben hergestellt wurden, der bezüglich der Riboflavinbiosynthese dereguliert ist. Es wurde berichtet, dass ungefähr 80% der *RoF*⁻-Mutationen innerhalb des *rib*-Operons am *rib0*-Locus auftreten (Stepanov et al., Genetika (USSR) 13: 490, 1977). Wie das Wildtyp-*rib*-Operon enthielten auch die *rib*-Gene in RB50 ein 9-10-kb-EcoRI-Fragment; daher wurde dieses Fragment kloniert unter Verwendung des in [Fig. 6](#) aufgeführten Protokolls, wobei pBR322 als Klonierungsvektor verwendet wurde. Die der Größe nach ausgewählten EcoRI-Fragmente mit 9 bis 11 kb (0,1 µg) von RB50 wurden wie vorher präpariert und mit einem zweifachen Überschuss an Enden der mit EcoRI geschnittenen dephosphorylierten pBR322-DNA (0,34 µg) bei einer Gesamt-DNA-Konzentration von 22 µg/ml ligiert. Ungefähr 9 ng ligierte DNA wurden in *E. coli* DH5 transformiert, was zu Ampicillin-resistenten (*Ap*^r)-Kolonien in einer Häufigkeit von $3,5 \times 10^5/\mu\text{g}$ DNA führte.

[0109] Die Restriktionsenzymanalyse von Plasmid-DNA, die aus einer Probennahme von 12 *Ap*^r-Kolonien isoliert worden war, zeigte, dass 50% Plasmide mit 9 bis 11 kb EcoRI-Inserts enthielten. Ungefähr 1140 *Ap*^r-Kolonien wurden mit der ³²P-markierten 54-mer-Sonde gescreent, die für das Riboflavinsynthesegen spezifisch ist, mit Koloniehybridisierung. Sechs Kolonien lieferten positive Signale. Die Plasmide pRF6 und pRF7, die aus zwei dieser sechs Kolonien isoliert wurden, wurden mit Restriktionsenzymanalyse identifiziert als solche, die

Inserts mit der gleichen Orientierung wie pRF2 bzw. pRF3 enthielten. Außerdem konnten die beiden Plasmide die Markierung der rib-2-Mutation mit hoher Häufigkeit wiederherstellen.

Beispiel 3: Einführen von rib⁺-DNA in *B. subtilis*

[0110] Wie oben beschrieben wurde das rib-Operon sowohl von einem Wildtypstamm als auch von einer RoF⁻-Mutante von *B. subtilis* in Form identischer 10-kb-EcoRI-Fragmente in die EcoRI-Stelle des *E. coli*-Replikons pBR322 kloniert; die Abstammung dieser rekombinanten Plasmide ist schematisch in [Fig. 6](#) dargestellt. Um das 10-kb-EcoRI-Fragment, das das rib-Operon enthält, in *B. subtilis* in mehrfachen Kopien einzuführen und somit die Riboflavinproduktion weiter zu erhöhen, wurde ein Plasmidvektor konstruiert, der die Integration in das *B. subtilis*-Chromosom zuließ. Die integrierte DNA wurde amplifiziert, indem Kolonien ausgewählt wurden, die bei hohen Konzentrationen des Arzneimittels Chloramphenicol wachsen würden.

Konstruktion und Transformation der Integrations-rib-Plasmide pRF4 und pRF8

[0111] Um den Integrationsvektor zu konstruieren, wurde das Arzneimittelresistenz-Gen Chloramphenicolacetyltransferase (cat), das in *B. subtilis* selektierbar ist, in pRF2 und pRF6 eingeführt, die pBR322-Vektoren mit dem 10-kb-Fragment von Wildtyp- oder RoF⁻-*B. subtilis*-Stämmen. Die Plasmide pRF2 und pRF6 wurden mit BamHI verdaut, das die Plasmide an nur einer Stelle innerhalb der pBR322-Sequenz schneidet und mit CIAP dephosphoryliert. Die geschnittene DNA wurde in ein 1,3-kb-BamHI-Fragment, das das cat-Gen enthielt (Youngman et al., Plasmid 12: 1–9, 1984) ligiert und die ligierten DNAs wurden dann in *E. coli*-DH5-Zellen (Hanahand, J. Mol. Biol. 166: 557, 1983) transformiert. Ungefähr 80 bis 90% der Ap^r-Transformanten waren Chloramphenicol-resistent (Cm^r); die Restriktionsanalyse der isolierten Plasmide (Maniatis et al.) bestätigte, dass die Plasmid-DNA aus den Cm^r-Kolonien das 1,3-kb-Fragment enthielt. Das Plasmid, das das Wildtyp-Riboflavinfragment und das cat-Gen enthielt, wurde mit pRF4 bezeichnet; das Plasmid, das das klonierte Riboflavinfragment aus dem RoF⁻-Stamm enthielt, wurde pRF8 genannt. (Da anschließend gezeigt wurde, dass die RoF⁻-Mutation außerhalb des rib-Operons liegt, sind diese Plasmide wahrscheinlich identisch).

[0112] Die Plasmide pRF4 und pRF8 wurden in vier verschiedene *B. subtilis*-Stämme transformiert: den Riboflavinüberproduzierer RB50 (Ag⁻-11, Dc⁻-15, MS⁻-46, RoF⁻-50), den RB50-Elternstamm RB46 (Ag⁻-11, Dc⁻-15, MS⁻-46), den RB50-Elternstamm 1A382 und IS75, einen üblichen Laborstamm. Kompetente IS75- und 1A382-Zellen wurden mit pRF4 oder pRF8 transformiert; diese gleichen Plasmide wurden in RB46 und RB50 durch Transformation von Protoplasten eingeführt (Chang und Cohen, Mol. Gen. Genet 168: 111–115, 1979). Die in jeden dieser vier Stämme integrierte pRF4- oder pRF8-DNA wurde amplifiziert, indem Kolonien ausgewählt wurden, die bei höheren Chloramphenicolkonzentrationen wuchsen. Es war möglich, in jedem Stamm Kolonien zu erhalten, die bei bis zu 60 µg/ml Chloramphenicol wuchsen.

[0113] Außerdem wurde RB52 (guaC3, trpC2, metC7 Dc⁻-15, ROF⁻-50), der erzeugt wurde, indem der guaC3-*B. subtilis*-Stamm 62121 mit DNA von RB50 transformiert wurde, kompetent gemacht und mit pRF8 transformiert. Das integrierte Plasmid in einer der vielen Cm^r-Kolonien, die entstanden, wurde amplifiziert unter Verwendung von 90 µg/ml Chloramphenicol. Die entstehenden Zellen, RB52::[pRF8]₉₀, wurden bis zur mittleren log-Phase gezüchtet und auf Minimalmedien ausplattiert, die 500 µg/ml Azaguanin enthielten.

[0114] Es entstanden ungefähr 20 Ag⁻-Kolonien. Eine solche Kolonie schien eine intensivere Fluoreszenz zu erzeugen. Die Abstammung dieses Stamms, RB53::[pRF8]₉₀, ist in [Fig. 7](#) angegeben.

Beispiel 4: Riboflavinüberproduktion bei Stämmen, die pRF4 oder pRF8 enthalten.

[0115] RB50, der pRF4 oder pRF8 enthielt, zeigte einen Riboflavinüberproduktions-Phänotyp (gelbe und UV-fluoreszierende Kolonien). Die Amplifikation der rib⁺-DNA in einem Wildtypstamm oder den Elternstämmen von RB50 lieferte keine gelben oder UV-fluoreszierenden Kolonien, eine Erkenntnis, die darauf hindeutet, dass die RoF⁻-Mutation (die die Biosynthese von Riboflavin dereguliert) erforderlich ist für die chromosomale Amplifikation von Wildtyp-DNA, um eine Riboflavinüberproduktion zu verursachen. Eine Reihe von Schüttelkolben-Fermentationen wurden durchgeführt in 25 ml Riboflavin-Minimalmedium (RMM, in Tabelle I) in einem mit Strombrechern ausgerüsteten Kolben mit 300 ml (Bellco), um die Produktion an Riboflavin bei RB50, der das integrierte und amplifizierte rib-Operon, enthielt, zu messen.

Tabelle I

Zusammensetzung der Medien

RMM	g/l
Natriumglutamat	2,0
Casaminosäuren (Difco)	0,2
Hefeextrakt (Difco)	0,2
KH_2PO_4	6,0
K_2HPO_4	14,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0
Natriumcitrat	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2
Adenosin (eingestellt auf pH 7,0 und autoklaviert)	0,05
Maltose (zugegeben als sterile 20%ige Lösung nach dem Autoklavieren)	15,0

[0116] Die Fermentationen wurden mit den Stämmen RB46, RB50 und RB50, der pRF4 enthielt und durch Selektion auf Resistenz gegenüber 30 µg/ml Chloramphenicol (RB50::[pRF4]₃₀) und 90 µg/ml Chloramphenicol (RB50::[pRF4]₉₀) amplifiziert worden war, durchgeführt. Nach 24 und 48 Stunden wurden Proben des Überstands entnommen und auf den Riboflavingehalt mit Reverse-Phase-HPLC untersucht.

[0117] Wie in Tabelle II gezeigt, erzeugte RB50::[pRF4]₃₀ 0,3 g/l Riboflavin und RB50::[pRF4]₉₀ 0,7 g/l Riboflavin in 48 Stunden, was signifikant mehr ist als der Anteil, der von den Stämmen ohne rib-Amplifikation erzeugt wurde, z. B. RB46 und RB50.

Tabelle II

Quantitative Analyse von riboflavinhaltigen Überständen aus *B. subtilis*

Stamm	Kulturzeit (h)	Riboflavin* (g/l)
RB46	24	0,009
RB50	24	0,02
RB50::[pRF4] ₃₀	24	0,1
RB50::[pRF4] ₉₀	24	0,4
RB46	48	0,007
RB50	48	0,05
RB50::[pRF4] ₃₀	48	0,3
RB50::[pRF4] ₉₀	48	0,7

* Riboflavin wurde gemessen unter Verwendung eines HPLC-Assays

[0118] Der dramatische Anstieg der Riboflavinproduktion, der durch Amplifikation von rib-Genen im deregulierten Wirt entsteht, deutet darauf hin, dass Information, die von der klonierten DNA codiert wird, geschwindigkeitsbestimmend für die Riboflavinbiosynthese ist.

Beispiel 5: Kartierung der RoF^r-50-Mutation

[0119] Die RoF^r-50-Mutation in RB50 schien für den Phänotyp der Riboflavinüberproduktion kritisch zu sein. Um die Mutation bei verschiedenen Hintergrundstämmen zu identifizieren und möglicherweise zu verschieben, war es notwendig, den Ort der RoF^r-50-Mutation auf dem *B.-subtilis*-Chromosom zu kartieren.

[0120] Da pRF4 und pRF8 sehr ähnliche Anteile der Riboflavinproduktion in allen Hintergrundstämmen ergaben, war es unwahrscheinlich, dass die RoF^r-50-Mutation auf dem klonierten rib-haltigen EcoRI-Fragment mit 10 kb angeordnet war. Wahrscheinlicher ist die RoF^r-50-Mutation eine ungebundene repressorartige Mutation, möglicherweise in ribC, eine Repressormutation, von der berichtet wurde, dass sie in der lys-aroD-Region des B.-subtilis-Chromosoms kartiert ist (Chernik et al., Genetika (USSR) 15: 1569, 1979). Um zu bestimmen, ob die RoF^r-50-Mutation mit dem Riboflavin-Operon verbunden oder nicht verbunden war, wurden kompetente B.-subtilis-1A210-(rib-2)-Zellen mit RB50-DNA transformiert, wobei auf rib⁺ selektiert wurde. Es entstanden Tausende von rib⁺-Kolonien und 200 Kolonien wurden auf Tryptose-Blutagarbase, die 100 g/ml Roseoflavin enthielt, verteilt. Es entstanden keine RoF^r-Kolonien und keine der Kolonien zeigte den Phänotyp der Riboflavinüberproduktion, was bestätigt, dass die RoF^r-50-Mutation nicht auf dem rib-Operon liegt.

Beispiel 6: Lokalisierung von rib⁺-Biosynthesegenen unter Verwendung der Mutagenese mit CAT-Insertion

[0121] [Fig. 4](#) enthält eine Restriktionskarte des rib-haltigen 10-kb-EcoRI-Fragments von pRF2, das mit Standardverfahren hergestellt worden war. Die Restriktionsenzymstellen für XbaI, BglII, SstI, HpaI und NcoI sind auf der Insert-DNA einmalig vorhanden, wohingegen Sall und PstI einmal in dem Insert und einmal im Vektor schneiden; das Insert enthält keine BamHI-, XhoI- oder NheI-Restriktionsstellen. Das Restriktionsenzym HindIII spaltet das Insert an mehreren Stellen; die 54-mer-Sonde, die für das Riboflavinsynthesegen spezifisch ist, hybridisierte mit einem HindIII-Fragment mit ungefähr 1,8 kb, was darauf hindeutet, dass das rib-Operon auch in dem allgemeinen Bereich liegen muss, der die Sall- und die am weitesten links gelegene BglII-(BglII_L)-Stellen umgibt.

[0122] Um die Grenzen des rib-Operons zu bestimmen, wurden allgemein kleine cat-haltige Restriktionsfragmente verwendet, um Insertionen und Deletionen in dem rib⁺-klonierten DNA-Fragment von pRF2 zu konstruieren. Das E.-coli-Plasmid pEcc1 diente als erste Quelle für Restriktionsfragmente, die ein cat-Gen tragen, das Chloramphenicolresistenz sowohl in E. coli als auch in B. subtilis liefert. Dieses Plasmid, ein Derivat von pMI1101 (Youngman et al., Plasmid 12, 1–9, 1984), bei dem ein nicht wesentlicher Bereich des Plasmids mit rekombinanten Standard-DNA-Techniken entfernt wurde, enthält ein cat-haltiges Fragment mit 1,3 kb, das von den "Polylinkern" von M13mp7 flankiert wird und daher cat-Kassetten entweder mit SmaI-, EcoRI-, Sall- oder BamHI-Enden erzeugen kann. Um Fragmente mit SstI- oder XbaI-Enden zu erzeugen, die das cat-Gen enthalten, wurde das cat-haltige BamHI-Fragment mit 1,3 kb von pEcc1 isoliert, die Enden mit HindIII-Linkern modifiziert und das modifizierte Fragment in die HindIII-Stelle innerhalb des Polylinkerbereichs von pIC20R kloniert, was das Plasmid pEcc4 erzeugte.

[0123] Integrative Plasmidderivate wurden zuerst in E. coli konstruiert und dann in den rib-Chromosomenlocus von B. subtilis durch DNA-Transformation überführt. Dies erfolgte, indem das Plasmid mit einem Restriktionsenzym, das außerhalb des klonierten DNA-Inserts schnitt, linearisiert wurde, kompetente Zellen des B.-subtilis-Stamms 1A382 oder PY79 (β^c, rib⁺) mit dieser geschnittenen DNA transformiert wurden und auf Cm^r selektiert wurden. Da das pBR322-Replikon in B. subtilis nicht replizieren kann und das cat-Gen an beiden Seiten an Sequenzen gebunden ist, die homolog zu dem rib⁺-Locus sind, kann die cat-haltige Insertion oder Deletion in das Chromosom nur durch ein Double-Crossover-Rekombinationsereignis insertiert werden, was Cm^r-Transformanten liefert. Um zu bestimmen, ob die Insertion oder Deletion die Riboflavinsynthese inaktiviert, wurden Cm^r-Kolonien auf Wachstum auf Minimalmedium-Agarplatten untersucht mit oder ohne die Gegenwart von Riboflavin (Rib-Phänotyp).

[0124] Wie in [Fig. 8](#) graphisch dargestellt, wurden cat-haltige Restriktionsfragmente durch Ligation in die einzelnen Restriktionsstellen für XbaI, SstI, Sall und BglII von pRF2 insertiert, zwischen das Paar von BglII- oder NcoI-Stellen insertiert (was Deletionen erzeugt, bei denen entweder ein 2,0-kb-BglII-Fragment oder ein 0,8-kb-NcoI-Fragment entfernt wird) oder in einzelne HaeIII- und EcoRV-Stellen des HindIII-Fragments mit ungefähr 1,8 kb, das mit der rib-spezifischen DNA-Sonde hybridisierte, mit Standardtechniken insertiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle III gezeigt.

Tabelle III

Charakterisierung von Insertions- und Deletionsderivaten von rib⁺-DNA

Insertionsderivat ^a	B. subtilis ^b Riboflavinphänotyp
A (XbaI)	
r	+
l	ND
B (SstI _L)	
r	+
l	ND
C (SstI _R)	
r	--
l	--
D (BglII _L)	
r	--
l	--
E (Sall)	
r	--
l	--
F (BglII _R)	
r	--
l	--
G (HaeIII)	
r	ND
l	+
H (EcoRV)	
r	+
l	ND
Deletionsderivat	
Bgl	
r	--
l	--
Nco	
r	+
l	+

^a "r" (rechts) und "l" (links) identifizieren die Transkriptionsorientierung des insertierten cat-Gens in Bezug auf die Restriktionskarte in [Fig. 8](#).

^b B.-subtilis-Stamm 1A382 (rib⁺, trpC2, pur-60, hisH2) oder PY79 (SP β^c, rib⁺).

[0125] Wie in [Fig. 8](#) und Tabelle III zusammengefasst, erzeugten Insertionen in die Sall-, entweder BglII- oder am weitesten rechts gelegenen SstI-(SstI_R)-Stellen oder die Deletion des 2,0-kb-BglII-Fragmentes alle Cm^r-Kolonien, die kein Riboflavin produzieren konnten (Rib⁻), was darauf hindeutet, dass das rib-Operon zentral innerhalb der klonierten DNA angeordnet ist. Offensichtlich hatte die Entfernung des 0,8-kb-NcoI-Fragments keine Wirkung auf die Riboflavinproduktion (Rib⁺), was darauf hindeutet, dass ein Ende des rib-Gen-Clusters links von der am weitesten links gelegenen NcoI-(NcoI_L)-Stelle gelegen war. Das andere Ende des rib-Operons wur-

de anfangs so bestimmt, dass es innerhalb eines HindIII-Fragments mit ungefähr 1,8 kb lag, da die zwei Insertionen an Stellen innerhalb des Fragmentes, EcoRV und HaeIII, ebenso wie Stellen, die distal von dem Fragment angeordnet waren, XbaI und SstI_L, alle Cm^r-Kolonien erzeugten, die Riboflavin produzierten.

Beispiel 7: Nucleotidsequenz des rib-Operons

[0126] Basierend auf der cat-Insertionsmutagenese des klonierten 10-kb-DNA-Fragmentes wurde das gesamte rib-Operon innerhalb einer Region mit 6,0 kb lokalisiert, die an die SstI_L- und NcoI_L-Stellen grenzte.

[0127] Diese 6,0-kb-Region von pRF2, die das rib-Operon enthielt, und die flankierenden Regionen wurden mit der Didesoxymethode von Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463, 1977) sequenziert. Kurz gesagt wurden M13-Klone für die Sequenzierung hergestellt entweder durch Subklonierung spezifischer Restriktionsfragmente in M13, durch Verwendung der Exonucleaseaktivität der T4-DNA-Polymerase, um eine Reihe überlappender Deletionen zu erzeugen (Dale et al., Plasmid 13: 31, 1985) oder durch "shot-gun"-Klonierung von statistischen Fragmenten von beschallten Restriktionsfragmenten in M13. In einigen Fällen wurde die Nucleotidsequenz über eine Restriktionsstellenverbindung von benachbarten Fragmenten auch durch Primerextensionssequenzierung bestimmt. Ungefähr 5500 bp wurden auf beiden Strängen sequenziert und auf Sequenzen analysiert, die typischen offenen Leserahmen glichen mit Ribosomenbindungsstellen von Gram-positiven Bakterien, Gram-positiven Promotoren und rho-unabhängigen Transkriptionsterminationsstellen.

[0128] Die Analyse lieferte sechs vollständige nicht überlappende offene Leserahmen (**Fig. 3**): ORF2 (124 Aminosäuren), das Gen, das für die β -Untereinheit der Riboflavinsynthase codiert (154 Aminosäuren), ORF3 (398 Aminosäuren), ORF4 (215 Aminosäuren), ORF5 (361 Aminosäuren) und ORF6 (105 Aminosäuren).

[0129] Jedem ORF ging eine starke Bacillus-Ribosomenbindungsstelle (RBS) mit berechneter Thermostabilität im Bereich von $\Delta G = -16$ bis -22 kcal/mol voran und alle waren in der gleichen Transkriptionsrichtung orientiert. Außerdem wurden innerhalb der codierenden Region von ORF5 eine zweite RBS-Stelle und ein ATG-Startcodon gefunden, die möglicherweise ein kleineres Protein mit 248 Aminosäuren codieren. Bezogen auf in vitro gekuppelte S-30-Transkriptions-/Translationsreaktionen (siehe unten) scheint ORF5 jedoch nur ein Protein mit 361 Aminosäuren zu codieren. Schließlich wurde auch ein Teil einer weiteren codierenden Region, ORF1, die die letzten 170 Aminosäuren eines Proteins codiert und in der entgegengesetzten Richtung orientiert ist, gefunden.

[0130] Basierend auf den folgenden Beobachtungen wird die Riboflavinbiosynthese in Bacillus von einem einzigen Operon kontrolliert, das 5 Gene enthält: das β -Riboflavinsynthasegen, ORF2, ORF3, ORF4 und ORF5, von denen mindestens 4, das β -Riboflavinsynthasegen, ORF3, ORF4 und ORF5, unzweideutig biosynthetische Enzyme codieren, wobei das verbleibende, ORF2, möglicherweise ein biosynthetisches Enzym codiert.

1. ORF3, ORF4 und ORF5 überlappen Restriktionsenzymstellen, bei denen die Insertion der cat-haltigen Restriktionsfragmente eine Inaktivierung der Riboflavinproduktion bei *B. subtilis* verursachte (**Fig. 4** und **Fig. 8**).
2. ORF1 überlappt eine Restriktionsenzymstelle(n), wo die Insertion der cat-haltigen Restriktionsfragmente keine Inaktivierung der Riboflavinproduktion bei einem rib⁺-*B. subtilis*-Stamm verursachte (Tabelle III und **Fig. 8**), noch eine Reduktion der Riboflavinproduktion in dereguliertem RoF^r-*B. subtilis*-Stamm RB52 verursachte.
3. ORF2 überlappt auch eine Restriktionsenzymstelle, EcoRV, wo die Insertion von cat-haltigen Restriktionsfragmenten keine Inaktivierung der Riboflavinproduktion in einem rib⁺-*B. subtilis*-Stamm verursachte (Tabelle III und **Fig. 8**). Eine solche Insertion verursachte jedoch eine nachweisbare Reduktion der Riboflavinproduktion bei dem deregulierten RoFr-*B. subtilis*-Stamm RB52, was darauf hindeutet, dass das mutierte ORF-2-Genprodukt teilweise bei der Riboflavinproduktion inaktiv war. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ORF2 ein rib-spezifisches Enzym codiert.
4. Zwei DNA-Sequenzen, die Bäumchenstrukturen bilden können, die auf rho-unabhängige Transkriptionsterminationsstellen hindeuten, wurden innerhalb der intercistronischen Spalten zwischen ORF1 und ORF2 und zwischen ORF5 und ORF6 gefunden (**Fig. 4** und **Fig. 9**). Die Entfernung von Strukturen zwischen ORF5 und ORF6 verbessert die Expression von Riboflavin. Die Strukturen verleihen lacZ-Fusionskonstrukten Riboflavinempfindlichkeit; sie können daher verwendet werden, um diese Empfindlichkeit irgendeinem anderen Gen zu vermitteln, mit dem sie am 5'-Ende stromaufwärts des Promotors fusioniert sind.
5. Eine DNA-Sequenz, TTGCGT-(17bp)-TATAAT, die dem Promotor ähnelt, der von der σ^A (vegetative Form) der *B. subtilis*-RNA-Polymerase erkannt wird, wurde ungefähr 290 bp stromaufwärts von ORF5 gefunden, und war in der gleichen Transkriptionsrichtung orientiert, wie ORF5 (**Fig. 4**). Eine Transkriptionsfu-

sion dieses Promotors (P_1 , auf einem BglIII-NcoI-Restriktionsfragment mit 1,1 kb) mit einem promotorlosen E.-coli-lacZ-Gen (P_1 -lacZ) zeigte eine von Riboflavin regulierte Expression von β -Galactosidaseaktivität in einem rib⁺, B.-subtilis-Stamm (62121) und eine konstitutive (unregulierte) Expression von β -Galactosidaseaktivität auf hohem Niveau in einem rib⁺, RoF^r-B.-subtilis-Stamm (RB52), nur wenn der Promoter in der gleichen Transkriptionsrichtung, wie das Gen, orientiert war, wie in Tabelle IV gezeigt. Die Primerextensionsanalyse wurde verwendet, um die Startstelle zu bestätigen. Transkriptions- und Northern-Analysen wurden verwendet, um zu zeigen, dass eine polycistronische RNA mit 4,2 kb das gesamte rib-Operon umfasst.

Tabelle IV

Durch Riboflavin regulierte Expression von P_1 -LacZ-Transkriptionsfusionen

Stamm (integriertes Plasmid)	β -Galactosidase-spezifische Aktivität (Miller-Einheiten)	
	+ Riboflavin (2 μ g/ml)	- Riboflavin
B. subtilis 62121 (P_1 -lacZ ^a)	1,3	4,2
B. subtilis RB52 (P_1 -lacZ ^a)	31	38
B. subtilis 62121 (P_1 -lacZ ^b)	< 0,1	< 0,1
B. subtilis 62121	< 0,1	< 0,1

^a P_1 und lacZ in der gleichen Richtung orientiert

^b P_1 und lacZ in entgegengesetzten Richtungen orientiert

[0131] Bezogen auf diese Ergebnisse ist dieser σ^A -Promotor, P_1 , ein primärer Promotor für die Transkription von ORF5, ORF4, ORF3, β -Riboflavinsynthasegen und ORF2.

6. Eine zweite DNA-Sequenz, TTGAAG-(17bp)-TACTAT, die einem Promotor ähnelt, der von σ^A (vegetative Form) von B.-subtilis-RNA-Polymerase erkannt wird, wurde innerhalb des 3'-Endes von ORF4 aufgefunden, ungefähr 295 bp stromaufwärts von ORF3 und in der gleichen Transkriptionsrichtung, wie ORF3, orientiert ([Fig. 4](#)). Die Integration in B. subtilis mit einem Campbell-artigen Rekombinationsereignis eines E.-coli-Plasmids, das diese Promotorsequenz auf einem 0,7-kb-Sall-BglIII-Restriktionsfragment enthielt, verursachte keine Inaktivierung der Riboflavinproduktion in B. subtilis, Ergebnisse, die darauf hindeuten, dass diese zweite Sequenz (P_2) Promotoraktivität hat und daher tatsächlich die Transkription (zusätzlich zu dem σ^A - P_1 -Promotor) von ORF3, der β -Untereinheit des Riboflavinsynthasegens und ORF2 kontrollieren kann. LacZ-Fusionen und Northern-Analyse bestätigten die Existenz dieses Promotors.

7. Eine dritte DNA-Sequenz, TTGAAT-(18bp)-TAAAAA, die möglicherweise dem Promotor ähnelt, der von σ^A (vegetative Form) der B.-subtilis-RNA-Polymerase erkannt wird, wurde innerhalb des intercistronischen Bereichs zwischen der β -Untereinheit des Riboflavinsynthasegens und ORF2 gefunden, ungefähr 83 bp stromaufwärts von ORF2 und in der gleichen Transkriptionsrichtung orientiert ([Fig. 4](#)). Dieser σ^A -Promotor, P_3 , kann auch die Transkription von ORF2 kontrollieren, zusätzlich zu P_1 und P_2 .

8. In vitro gekuppelte Transkriptions-/Translationsanalyse von S-30-Reaktionen der klonierten DNA bestätigten, dass ORF2, ORF3, ORF4 und ORF5 alle tatsächlich Proteine mit der aus den jeweiligen Sequenzen vorhergesagten Größe codierten.

9. Drei der fünf angenommenen enzymatischen Stufen bei der Riboflavinbiosynthese wurden spezifischen codierenden Regionen zugeordnet, indem die vorhergesagten Aminosäuresequenzen oder Molekulargewichte ihrer Produkte mit veröffentlichten Proteinsequenzen verglichen wurden, unter Verwendung von Gen-Bank[®] oder bekannten Proteingrößen.

a. Das möglicherweise von dem offenen Leserahmen zwischen ORF2 und ORF3 codierte Protein passt fast identisch zu der veröffentlichten Aminosäuresequenz der β -Untereinheit für das Riboflavinsynthaseenzym mit 154 Aminosäuren (Ludwig et al., J. Biol. Chem. 262: 1016, 1987). Es wurde nur eine unterschiedliche Aminosäure festgestellt: Lysein ersetzte Glycin an Rest 65. Es wird berichtet, dass dieses Enzym die Bildung von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin aus 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat ([Fig. 1](#), Strukturen 5 bzw. 4) und 3,4-Dihydroxybutanon-4-phosphat katalysierte.

b. Eine 39%ige Identität bei einer Überlappung mit 88 Aminosäuren wurde zwischen dem möglichen Produkt von ORF5 und Deoxycytidylatdeaminase festgestellt, einem Protein mit 188 Aminosäuren, das von dem E.-coli-Bakteriophagen T₂ codiert wird (Maley et al., J. Biol. Chem. 258: 8290, 1983). Basierend auf

diesem Ergebnis codiert ORF5 höchstwahrscheinlich die rib-spezifische Deaminase, die die Bildung von 5-Amino-6-(ribosylamino)-2,4-(1H,3H)pyrimidindion-5'-phosphat aus 2,5-Diamino-6-(ribosylamino)-4(3H)-pyrimidinon-5-phosphat katalysiert (Fig. 1, Strukturen 3 bzw. 2).

c. Das vorhergesagte Molekulargewicht des ORF-4-Genprodukts (26 000 Da) stimmte gut überein mit dem Molekulargewicht der α -Untereinheit der Riboflavinsynthase (23 000 Da; Bacher et al., J. Biol. Chem. 255: 632, 1980). Basierend auf diesem Ergebnis codiert ORF4 die α -Untereinheit der Riboflavinsynthase, die die letzte Stufe des Biosynthesewegs katalysiert: die Dismutation von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin zu Riboflavin (Fig. 1, Strukturen 5 bzw. 6) und 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion.

10. Die verbleibenden enzymatischen Stufen der Riboflavinsynthese wurden versuchsweise den codierenden Regionen zugeordnet, indem die Position der ORFs mit einer physikalischen Karte von rib-Mutationen in dem Operon ausgerichtet wurde (Morozov et al., Mol. Genet. Mik. Virusol. Nr. 7: 42 (1984)). Es wurde berichtet, dass Mutationen für defekte GTP-Cyclohydrolase in dem 0,5-kb-HindIII-Fragment kartiert wurden. Da ORF3 dieses Restriktionsfragment umfasst, wurde geschlossen, dass ORF3, zumindest teilweise, diese enzymatische Funktion codiert, die die Bildung von 2,5-Diamino-6-(ribosylamino)-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat aus GTP (Fig. 1, Strukturen 2 bzw. 1) katalysiert. Außerdem wurde berichtet, dass das Biosynthesegen, das eine rib-spezifische Reduktase codiert, vollständig in dem HindIII-Fragment mit ungefähr 1,8 kb enthalten war. Da dieses Fragment nur zwei vollständige codierende Regionen enthält, die β -Untereinheit des Riboflavinsynthasegens und ORF2, wird angenommen, dass ORF2 die Reduktase codiert, die die Bildung von 5-Amino-6-(ribitylamino)-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat aus 5-Amino-6-(ribosylamino)-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat (Fig. 1, Strukturen 4 bzw. 3) katalysiert.

[0132] Außerdem wurde eine ähnliche rho-unabhängige Transkriptionsterminationsstelle im scheinbaren Leader-Bereich des Operons nachgewiesen, stromabwärts des möglichen σ^A -P1-Promotors, aber direkt stromaufwärts der ersten codierenden Region des Operons, ORF5 (Fig. 4 und Fig. 9). Diese mögliche Terminatorstruktur kann an der Regulierung des rib-Operons durch einen Terminations-/Antiterminationsmechanismus beteiligt sein. Außerdem ist eine Roseoflavin-resistente (R_oF^R)-abhängige regulatorische Region auf einem Sall-BgIII-Restriktionsfragment von ORF3 mit 0,7 kb vorhanden.

Zuordnung der rib-ORFs zu Proteinprodukten

[0133] Eine Methode, um zu bestätigen, dass die rib-spezifischen ORFs Proteine codieren, besteht darin, die Größe und Anzahl von Proteinen, die aus der klonierten DNA synthetisiert werden, in einer in vitro gekuppelten S-30-Transkriptions-/Translationsreaktion unter Verwendung von pRF2 und der verschiedenen Derivate als Matrizen "sichtbar zu machen". Der S-30-Fraktionskit (New England Nuclear; verwendet nach der Anleitung des Herstellers) ist besonders wirksam, um B.-subtilis-Gene zu translatieren aufgrund der Gegenwart der starken Ribosomenbindungsstellen.

[0134] Bei Verwendung des klonierten 10-kb-EcoRI-Fragments von pRF2 oder pRF4 als Matrizen wurde erwartet, dass fünf mögliche rib-spezifische Proteine nachgewiesen werden können: β -Riboflavinsynthase, 14,7 kilodalton (kd) (Ludwig et al., J. Biol. Chem. 262: 1016, 1987) und die Proteine von ORF2, 13,6 kd; ORF3, 43,7 kd; ORF4, 23 kd; und ORF5, 39,7 kd. Es wurde auch erwartet, dass mindestens zwei weitere Proteine nachgewiesen werden können, die von ORF6 (11,6 kd) und ORF1 (mindestens 18,7 kd) codiert werden, ebenso wie irgendwelche weiteren Proteine, die von Genen codiert werden, die in den unsequenzierten Bereichen des klonierten DNA-Fragments mit 10 kb vorhanden sind. Außerdem wurden auch Vektor-assoziierte Proteine, einschließlich der bla- und cat-Antibiotica-Resistenzgenprodukte erwartet (das tet-Gen wird bei S-30-Reaktionen nicht stark exprimiert).

[0135] Unter Ausschluss der bla- und cat-spezifischen Proteine (32 kd bzw. 18 kd) und anderer Vektor-assoziiierter Proteine wurden insgesamt sechs größere ^{35}S -markierte Proteine nachgewiesen mit Molekulargewichten von 47 kd, 44 kd, 38 kd, 26 kd, 20 kd und 15 kd, auf einem 15%-SDS-Polyacrylamidgel für die S-30-Reaktionen mit pRF2 oder pRF4. Um diese Proteinprodukte den entsprechenden rib-spezifischen ORFs zuzuordnen, wurden S-30-Reaktionen wiederholt unter Verwendung verschiedener verfügbarer Deletionsderivate, cat-Insertionsderivate und subklonierter Fragmente der klonierten 10-kb-EcoRI-DNA (Fig. 10). Die Ergebnisse sind in Tabelle V gezeigt.

Tabelle V

Rib-spezifische Proteine, die bei S-30-Reaktionen beobachtet werden

Plasmid	47 000 Daltons (ORF3)	44 000 Daltons (ORF5)	26 000 Daltons (ORF4)	15 000 Daltons (ORF2)
pRF2	+	+	+	+
pRF4	+	+	+	+
pRF21	–	–	+	–
pRF5	–	–	–	+
pRF2 9	–	–	–	–
pRF12	+	–	+	+
pRF10	–	–	–	–
pRF38	–	–	–	–
pRF24/pRF20	–	+	+	+
pRF23	+	–	+	+

[0136] Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Proteinprodukte, ORF3 (47 kd); ORF5 (44 kd); ORF4 (26 kd) und ORF2 (15 kd) zugeordnet, wobei die Molekulargewichte mit den vorhergesagten Größen übereinstimmen.

[0137] Die Zuordnung von Produkten zu ORF2 und dem β -Riboflavinsynthasegen waren weniger schlüssig als die Zuordnungen zu den anderen ORFs. Da die S-30-Reaktion von pRF2 ein 15-kd-Protein erzeugte, das eng mit der vorhergesagten Größe der Proteine übereinstimmte, die von jedem der beiden Gene codiert wurde, wurde zuerst angenommen, dass diese Proteinbande tatsächlich beide Proteinarten enthielt. Die cat-Insertion in ORF2 im Plasmid pRF38 entfernte jedoch diese Proteinbande vollständig und ersetzte sie durch ein kleineres Protein mit 6 kd, das eng mit der vorhergesagten Größe für den trunkierten ORF2 übereinstimmte. Basierend auf diesen Ergebnissen scheint das 15-kd-Protein nur von ORF2 erzeugt zu werden. Es ist nicht klar, warum das β -Riboflavinsynthaseprotein auf den Gelen der S-30-Reaktionen nicht sichtbar wird. Insgesamt genommen bestätigten die Ergebnisse jedoch die Existenz von fünf rib-spezifischen codierenden Regionen: ORF5, ORF4, ORF3, ORF2 und dem β -Riboflavinsynthasegen.

[0138] Zusätzlich scheint ORF1 ein 38-kd-Protein zu codieren, während für ORF6 kein Produkt identifiziert wurde.

Regulatorische Mechanismen des rib-Operons

[0139] In *B. subtilis* wurde ein wiederkehrendes Muster der Gen-Organisation und Regulation für Biosynthesewege von verschiedenen Forschern beobachtet. Die Nucleotidsequenzen des Tryptophan-Biosynthesewegs (Renner et al., *Gene* 34: 169, 1984) und des de-novo-Purinnucleotidwegs (Ebbole und Zalkin, *J. Biol. Chem.* 262: 8274, 1987) von *B. subtilis* enthalten beide Cluster von überlappenden Genen, die als polycistronische Botschaft transkribiert werden und mindestens teilweise von einem neuen Transkriptionsterminations/Antiterminationsmechanismus reguliert werden, der ein Repressorprotein beinhaltet, das von einem Gen codiert werden kann, das nicht mit dem Biosynthese-Operon verbunden ist (Zalkin und Ebbole, *J. Biol. Chem.* 263: 1595, 1988). Da gefunden wurde, dass die Organisation der rib-Biosynthese- und Regulationsgene überraschend ähnlich ist denen der *B. subtilis*-trp- und pur-Wege, wurde hypothetisch angenommen, dass das rib-Operon zumindest teilweise in ähnlicher Weise reguliert werden könnte.

[0140] Kurz gesagt, schließen die Schlüsseleigenschaften des Transkriptionsterminations/Antiterminationsmodells (Shimotsu et al., *J. Bacteriol.* 166: 461, 1986) ein:

- (i) die Gegenwart einer langen 5'-Leader-Sequenz, die dem ersten Gen im Operon vorhergeht;
- (ii) die Gegenwart des RNA-Leaders von zwei oder mehr überlappenden Dyadensymmetrien, die das Potenzial haben, wechselweise sich ausschließende RNA-Bäumchen zu bilden, wobei eine Struktur als rho-unabhängiger Transkriptionsterminator dient und die andere als "Antiterminator" (Blockieren der Bildung des rho-unabhängigen Transkriptionsterminators);

(iii) unter repressiven Bedingungen bindet das Repressorprotein, das von dem Endprodukt des Stoffwechsels aktiviert wird, an naszierende mRNA an einer Stelle, die die Bildung des Antiterminators verhindert, was die Bildung des Terminators zulässt, der die Transkription beendet;

(iv) unter derepressiven Bedingungen, ist die Bindung des inaktivierten Repressors ausgeschlossen, was zur Bildung des Antiterminators führt, was ein Überlesen in den codierenden Bereich des Operons hinein verursacht.

[0141] Wie oben diskutiert, ist die wahrscheinlichste Stelle für den Start der Transkription im rib-Operon ein σ^A -Promotor, P_1 , der etwa 290 bp stromaufwärts des ersten Gens im Operon angeordnet ist. Eine vorläufige Analyse der RNA-Leader-Sequenz deutet darauf hin, dass sie die meisten, wenn nicht alle, der Strukturen enthält, die für die Regulation durch das Terminations/Antiterminationsmodell erforderlich sind. Innerhalb dieser Region wurde eine bäumchenartige Struktur gefolgt von einem Strang von Thyminen gefunden, der einem rho-unabhängigen Transkriptionsterminator ähnelt, ungefähr 50 bp stromaufwärts von ORF5; diese Sequenz hat das Potenzial, eine Haarnadelschleife mit einem ΔG von -26 kcal/mol ([Fig. 9](#)) zu bilden. Außerdem wurden verschiedene potenzielle bäumchenartige Strukturen mit ΔG s im Bereich von -13 bis -16 kcal/mol innerhalb des rib-5'-Leaders lokalisiert, die möglicherweise als Antiterminatorsequenz qualifiziert werden könnten.

[0142] Zusätzlich zu der primären Stelle für den Start der Transkription, die gewöhnlich stromaufwärts des ersten Gens im Operon angeordnet ist, existieren bei einigen Biosynthesewegen sekundäre Promotorstellen, die innerhalb der inneren Bereiche des Operons angeordnet sind. Die Möglichkeit dafür, dass eine zweite Promotorstelle innerhalb des rib-Locus vorliegt, wurde auch vorgeschlagen durch vorherige R-Schleife-Heteroduplex-Untersuchungen des rib-Operons (Osina et al., FEBS Letters 196: 75–78, 1986), die zwei oder mehr Stellen für den Start der mRNA-Synthese zeigen. Unsere vorherige Analyse der intercistronischen Spalten des rib-Operons wies keine solchen sekundären Promotorstellen nach. Als diese Analyse jedoch auf alle Sequenzen innerhalb des Operons ausgedehnt wurde, wurde ein weiterer σ^A -Promotor, P_2 , innerhalb des 3'-Endes von ORF4 aufgefunden, direkt stromabwärts der Sall-Restriktionsstelle ([Fig. 4](#)). Somit ist es möglich, dass die Expression von ORF2, ORF3 und der β -Untereinheit für Riboflavinsynthese unter der Kontrolle dieses zweiten Promotors steht. Außerdem wurde ein möglicher dritter σ^A -Promotor, P_3 , direkt stromaufwärts von ORF2 aufgefunden. Daher ist ORF2 möglicherweise auch unter der Kontrolle dieses weiteren Promotors.

[0143] Die Anordnung möglicher codierender Regionen, Promotoren und Transkriptionsterminationsstellen auf der DNA-Sequenz der rib-spezifischen Region mit 5,5 kb auf *B. subtilis* ist in Tabelle VI gezeigt.

Tabelle VI

Codierende Regionen, Promotor und Transkriptionsterminationsstellen auf dem *B. subtilis*-rib-Operon

		bp-Zahl ^a
Codierende Regionen	ORF6	364–678
	ORF5	1101–2183
	ORF4	2197–2841
	ORF3	2859–4052
	β -Riboflavinsynthasegen	4088–4549
	ORF2	4665–5036
	ORF1	5567–5057 ^b
σ^A -Promotoren	P_1	771–799
	P_2	2528–2556
	P_3	4545–4574
rho-unabhängige Terminationsstellen	Stromaufwärts des 5'-Promotors	708–748
	Innerhalb der 5'-Leader-RNA	1034–1067
	Am 3'-Ende des rib-Operons	5038–5090

^a von [Fig. 3](#)

^b codierende Region in entgegengesetzte Richtung orientiert

Beispiel 8: Konstruktion von Vektoren, die ein modifiziertes rib-Operon enthalten

[0144] Die obige funktionelle Analyse des rib-Operons von *Bacillus subtilis*, die zum ersten Mal die regulatorischen Regionen und offenen Leserahmen in der Nucleotidsequenz abgrenzt, lässt die Konstruktion neuer Vektoren zu, die zur Erhöhung der Ausbeute der Riboflavinproduktion nützlich sind. Die Kenntnis von der Anordnung der spezifischen Gene, die für die Riboflavinbiosynthese erforderlich sind, der Anordnung der Transkriptionskontrollregionen und anderer relevanter Regionen (z. B. RBS) auf diesen Genen lässt es zu, in diesen Regionen Veränderungen durchzuführen. Es folgen einige Beispiele für solche Manipulationen.

Konstruktion eines Integrationsplasmids mit einem rib-Operon auf einem kleineren DNA-Fragment

[0145] Der integrierende Vektor, der verwendet wird, um den Riboflavin überproduzierenden Stamm RB50::[pRF8] zu konstruieren, enthält ein 10-kb-EcoRI-Fragment mit dem rib-Operon. Da das rib-Operon weniger als 6 kb DNA einzunehmen scheint, wurde ein neuer Integrationsvektor konstruiert (pRF40), der das rib-Operon auf einem kleineren DNA-Fragment enthält. Die kleinere Größe dieses Klons lässt eine höhere Amplifikation der rib-Gene zu, was zu höheren Ausbeuten an Riboflavin führt.

[0146] Bezugnehmend auf [Fig. 12](#) wurde pRF40 aus pRF36 konstruiert, das ein Plasmid ist, in dem das 0,8-kb-NcoI-Fragment von pRF2 durch ein cat-Gen ersetzt ist. Das rib-Operon ist in einem 6,5-kb-XbaI-EcoRI-Fragment enthalten. Dieses Fragment wurde isoliert und mit pUC19 ligiert (Panisch-Perron et al., *Gene* 33, 103, 1985; erhältlich von New England Biolabs, Boston, MA, USA und Bethesda Research Laboratories, Maryland, USA), der mit XbaI und EcoRI verdaut worden war. Die ligierte DNA wurde in DH5 α *E. coli* transformiert und auf LB-Platten plattiert, die 40 μ g/ml X-gal und 50 μ g/ml Ampicillin enthielten. Die Analyse der Miniprep-DNA, die aus weißen Kolonien präpariert wurde, deutete darauf hin, dass pRF39 das 6,5-kb-XbaI-EcoRI-Fragment enthielt.

[0147] pRF39 wurde mit EcoRI verdaut, mit CIAP versetzt und dann mit einem 1,6-kb-EcoRI-Fragment, das das cat-Gen enthielt, ligiert. Die ligierte DNA wurde dann in DH5 α *E. coli* transformiert und geeignete Kolonien wurden für das Plattieren auf LB + 10 μ g/ml Chloramphenicol ausgewählt; zwei Kolonien waren Chloramphenicol-resistent. Die Analyse von Miniprep-DNA, die aus diesen Kolonien präpariert wurde, bestätigte die Gegenwart des cat-Gens. Eines dieser Plasmide ist pRF40 ([Fig. 14](#)).

Konstruktion von Plasmiden, die bezüglich der Transkription modifiziertes rib-Operon enthalten

[0148] Wie oben beschrieben ist es nützlich, die Promotor- und Operatorregionen des Riboflavin-Operons durch Promotoren zu ersetzen, die eine konstitutive Expression der Riboflavinbiosynthesegene zulassen. Plasmide, die solche Konstrukte enthalten, können dann verwendet werden, um Bakterienstämme zu erzeugen, die erhöhte Anteile an Riboflavin erzeugen. Einige Beispiele, die die Erfindung nicht beschränken, werden unten bereitgestellt.

[0149] Bezugnehmend auf [Fig. 13](#) wurden der Riboflavinpromotor und die regulatorische Region entfernt und durch einen SPO1-Promotor ersetzt. Die BglII-Stelle, die sich an Position 1130 am Start von ORF3 befindet, wurde ausgenutzt. Oligonucleotide wurden synthetisiert (RB5 und RB6, siehe [Fig. 18](#)), die die DNA-Sequenz 5' von der BglII-Stelle (die ersten wenigen Aminosäuren von ORF5 und die SD-Sequenz) bis zu Position 1058 erzeugten. Die Rekonstruktion des 5'-Endes des Operons stoppte vor irgendeiner der vorgeschlagenen DNA-regulierenden Strukturen ([Fig. 13](#)). An ihren 5'-Enden enthielten die Oligonucleotide BamHI-, NsiI- und EcoRI-Restriktionsstellen, die den Austausch verschiedener Promotoren 5' zum rib-Operon zuließen. Wegen der verschiedenen Restriktionsstellen im rib-Operon war es notwendig, das Operon mit den neuen Promotoren in mehreren Stufen zu konstruieren, wie folgt.

[0150] Ein 1,4-kb-Sall-BglII-Fragment wurde aus pRF36 ([Fig. 13](#)) isoliert. Dieses Fragment wurde mit den zwei Oligonucleotiden und mit EcoRI-Sall-verdaulichem pUC19 ligiert. Die ligierte Mischung wurde dann in *E. coli*-DH5 α -Zellen transformiert und auf LB, das 50 μ g/ml Ampicillin und 40 μ g/ml X-gal enthielt, ausplattiert. Minipreps wurden aus weißen Ap^r-Kolonien hergestellt; ein Plasmid mit der gewünschten Struktur ist pRF46 ([Fig. 13](#)).

[0151] pRF46 wurde mit BamHI und Sall verdaut und das 1,4-kb-Fragment isoliert. Dieses Fragment wurde dann mit dem 400-bp-EcoRI-BamHI-Fragment von pNH202 (pUC8 mit dem SPO1-15-Promotor, Lee und Pero,

J. Mol. Biol., 152: 247–265, 1981) und pUC19, der mit Sall und EcoRI geschnitten worden war, ligiert. Die ligierte DNA wurde dann in DH5 α -E. coli transformiert, der dann auf LB + Ampicillin + X-gal plattiert wurde. Miniprep-DNA wurde aus weißen Kolonien erstellt und pRF48 hatte die gewünschte Struktur ([Fig. 13](#)).

[0152] pRF48 wurde mit EcoRI und Sall verdaut und das 1,8-kb-Fragment isoliert. Dieses Fragment wurde mit dem 4,0-kb-XbaI-Sall-Fragment (das den Rest des rib-Operons enthielt) aus pRF2 und mit XbaI, EcoRI geschnittenem pUC19 ligiert. Die ligierte Mischung wurde dann in E.-coli-DH5 α -Zellen transformiert, die auf LB + Ampicillin + X-gal plattiert wurden. Miniprep-DNA wurde aus weißen Kolonien hergestellt; pRF49 hatte die gewünschte Struktur und Überstände aus der Kultur, die dieses Plasmid enthielten, waren gelb, was auf eine Riboflavinproduktion deutet ([Fig. 13](#)).

[0153] Um das cat-Gen in pRF49 zu platzieren, um eine Selektion in *B. subtilis* zuzulassen, wurde das Plasmid mit XbaI verdaut und mit einem 1,3-kb-cat-haltigen XbaI-Fragment aus pEcc4 ligiert. Die ligierte DNA wurde in E.-coli-DH5-Zellen transformiert. Hunderte Ap^r-Kolonien entstanden und die Kolonien wurden auf Platten getüpfelt, die LB + 10 μ g/ml Chloramphenicol enthielten. Ungefähr 10% der Kolonien wuchsen auf den Chloramphenicolplatten, was auf die Gegenwart des cat-Gens deutet. Ein cat-haltiges Plasmid wird pRF50 genannt ([Fig. 14](#)).

[0154] Das obige Beispiel zeigt das Einsetzen eines neuen Promotors stromaufwärts von ORF5. Es wurde gefunden, dass es auch nützlich ist, einen Promotor nach P₂ zwischen ORF3 und ORF4 anzuordnen, um die Riboflavinproduktion weiter zu erhöhen. Ein Beispiel einer solchen Konstruktion folgt nun.

[0155] Bezugnehmend auf die [Fig. 14](#) und [Fig. 15](#) wurden die Restriktionsstellen, die der ORF4-ORF3-Schnittstelle benachbart sind, verwendet, um eine Kopie des SPO1-15-Promotors stromaufwärts von ORF3 anzuordnen. Die ClaI-Stelle an Position 2767 ist am Ende von ORF4 angeordnet und ist im rib-Operon einmalig vorhanden. Eine andere nützliche Restriktionsstelle in der Nähe des Beginns von ORF3 ist die DraI-Stelle an Position 2892. Es wurden Oligonucleotide synthetisiert, die die Sequenz der oben erwähnten DraI-Stelle nach dem Start von ORF3 erzeugen und eine einmalig vorhandene BamHI-Stelle vor dem Beginn von ORF3 einführen (Linker P2-A und P2-B, [Fig. 18](#)). Ein weiterer Satz von Oligonucleotiden erzeugte die Sequenz von der ClaI-Stelle nach dem Ende von ORF4 und erzeugte eine EcoRI-Stelle an dieser Stelle (Linker P2-CII und P2-DII, [Fig. 18](#)). Der SPO1-15-Promotor, der auf dem EcoRI-BamHI-Fragment angeordnet ist, wurde dann zwischen die BamHI- und EcoRI-Stellen gebracht, die durch die Oligonucleotide erzeugt wurden. Das gesamte Operon wurde mit diesem zusätzlichen SPO1-15-Promotor wie folgt zusammengesetzt.

[0156] Bezugnehmend auf [Fig. 15](#) wurde das 750-bp-Sall-BglII-Fragment, das die ORF4-ORF3-Funktion enthielt, in pIC20R subkloniert (Marsh et al., *Gene* 32, 481–485, 1984). Das entstehende Plasmid, pRF57, wurde dann mit DraI und BglII verdaut und das vorhergesagte 270-bp-DraI-BglII-Fragment wurde isoliert. Dieses Fragment und die Linker P2-A und P2-B wurden mit Sall und BglII geschnittenem pIC20R ligiert. Die Linker brachten die BamHI- und Sall-Stellen stromaufwärts des 5'-Endes von ORF3. (Die Sall-Stelle wurde der Einfachheit halber ausgewählt, da BglII und BamHI-Stellen kompatibel sind und später entfernt werden.) Die Ligation wurde in E.-coli-DH5 α -Zellen transformiert. Das Ausplattieren auf LB-Medium + Amp und X-gal führte zu weißen Kolonien; pRF58 hatte die gewünschte Struktur. Das 330-bp-BglII-Sall-Fragment aus pRF58 wurde isoliert und mit dem 3,3-kb-BglII-XbaI-Fragment, das das 3'-Ende des rib-Operons aus pRF36 enthielt ([Fig. 12](#)) und mit XbaI und Sall geschnittenem pUC19 ligiert. Die ligierte DNA wurde dann in E.-coli-DH5 α -Zellen transformiert, was weiße Kolonien erzeugte; pRF62 ([Fig. 15](#)) hatte die gewünschte Struktur. Der Einfachheit halber wurde das 3,6-kb-BamHI-XbaI-Fragment aus pRF62 isoliert und in mit BamHI-, XbaI-geschnittenem pUC19 subkloniert (pRF64, [Fig. 15](#)). Dieses Plasmid enthielt nun das 3,6-kb-3'-Ende des rib-Operons mit einer gentechnisch erzeugten BamHI-Stelle, die dem ORF3 vorangeht.

[0157] Um den SPO1-15-Promotor vor die 3'-Hälfte des rib-Operons, die die letzten drei offenen Leserahmen enthält, zu bringen, wurde pRF64 mit EcoRI und BamHI verdaut und in ein 400-bp-EcoRI-BamHI-Fragment, das den SPO1-15-Promotor enthielt, ligiert. Die ligierte DNA wurde in E.-coli-DH5-Zellen transformiert und Miniprep-DNA wurde hergestellt; pRF65 hatte die gewünschte Struktur.

[0158] Der SPO1-15-Promotor wurde dann gentechnisch bearbeitet, um die ClaI-Stelle stromaufwärts des Promotors zu bringen, um das Ende von ORF4 zu rekonstruieren. Das EcoRI-BamHI-Fragment aus pNH202, das den SPO1-15-Promotor enthielt, wurde mit den Linkern P2-CII und P2-DII und mit BamHI und ClaI verdautem pIC20R ligiert. Die ligierte DNA wurde dann in E.-coli-DH5 α -Zellen transformiert. Weiße Kolonien entstanden und Miniprep-Analysen zeigten, dass pRF63 die gewünschte Struktur hatte. Das 470-bp-ClaI-BamHI-Fragment wurde dann aus pRF63 isoliert und mit dem 2-kb-EcoRI-ClaI-Fragment von pRF49, das den

SPO1-15-Promotor enthielt, und dem 5'-Ende des rib-Operons und pRF64 ([Fig. 15](#)), der den SPO1-Promotor und das 3'-Ende des Operons enthielt, das mit EcoRI und BamHI verdaut worden war, ligiert. Die ligierte DNA wurde dann in *E.-coli*-DH5 α -Zellen transformiert. Miniprep-DNA wurde hergestellt; pRF66 hatte die gewünschte Struktur. Außerdem erzeugte *E. coli*, der pRF66 enthielt, geringe Mengen an Riboflavin auf LB-Medium + Ampicillin-Platten, was bestätigte, dass das Operon immer noch intakt war.

[0159] Die letzte Stufe bestand darin, das *cat*-Gen in die einmalig vorhandenen XbaI-Stellen von pRF66, wie oben beschrieben, zu ligieren. Das entstehende Plasmid, pRF69 ([Fig. 15](#)), enthielt das *cat*-Gen in der gleichen Richtung, wie das rib-Operon.

[0160] Um ein Plasmid zu konstruieren, das das gesamte Operon mit dem natürlichen oder Wildtyp-ribP₁-Promotor und den SPO1-15-Promotor nach ribP₂ enthielt, wurden das 6,3-kb-EcoRI-BamHI-Fragment von pRF64, das 2,75-kb-EcoRI-ClaI-Fragment von pRF36 und das 470-bp-ClaI-BamHI-Fragment von pRF63 ligiert und in *E.-coli*-DH5 α -Zellen transformiert. Etwa 50% der Ap^r-Kolonien waren gelb, was auf eine Riboflavinproduktion deutet. Miniprep-DNA wurde aus den gelben Kolonien hergestellt und pRF68 hatte die gewünschte Struktur ([Fig. 16](#)). Ein *cat*-Gen wurde pRF68 an der XbaI-Stelle, wie oben diskutiert, zugefügt, um pRF71 zu erzeugen ([Fig. 16](#)). Dieses Plasmid enthielt das *cat*-Gen in der gleichen Richtung, wie das rib-Operon.

[0161] Als weiteres Beispiel für die Konstruktion nützlicher Plasmide der Erfindung folgt nun ein Beispiel, bei dem ein oder mehrere Promotoren innerhalb des Riboflavin-Operons eingeführt werden können ohne vorherige Entfernung bestehender DNA-Sequenzen.

[0162] Als ein Beispiel wurde ein als Prototyp modifiziertes Operon in pRF78 konstruiert, das eine einzelne Kopie des SPO1-15-Promotors, die innerhalb einer 30-bp-Region, die nicht essentiell ist und zwischen ribP₁ und einer vermuteten rho-unabhängigen Transkriptionsterminationsstelle angeordnet ist ([Fig. 14](#)), inseriert ist, einen inaktivierten ribP₁-Promotor, um mögliche Transkriptionsinterferenzen des SPO1-15-Promotors zu verhindern, einen aktiven ribP₂-Promotor, die fünf Strukturgene, die rib-Biosynthesenzyme codieren, und ungefähr 1,5 kb flankierende DNA-Nucleotidsequenzen stromabwärts des Endes des Riboflavin-Operons enthält.

[0163] Bezugnehmend auf [Fig. 14](#) wurde zuerst das 1,7-kb-NcoI-PstI-Fragment von pRF2, ein Fragment, das die 5'-Promotorregion des rib-Operons und flankierende Regionen enthält, in mp19, einem Derivat des *E.-coli*-Bakteriophagenvektors M13 (United States Biochemical Catalog, 60–61, 1987; erhältlich von New England Biolabs, Massachusetts, USA) subkloniert. Ein rekombinanter Phage, M1.7, wurde gewonnen und eine Standard-DNA-Sequenzanalyse der Promotorregion zeigte eine spontane Mutation der -10-Region des ribP₁-Promotors, eine Veränderung von TA-zu-CT, die den Promotor inaktivieren kann. Einzelsträngige DNA wurde hergestellt und mit einem synthetisch erzeugten 55-bp-DNA-Oligomer (siehe [Fig. 17](#)), das eine Kombination von Restriktionsenzymstellen, 5'-EcoRI-SmaI-BamHI-3', flankiert an beiden Seiten von weiteren Sequenzen, die mit der DNA-Region stromaufwärts von ribP₁ homolog sind, reassoziert. Doppelsträngige DNA-Moleküle wurden synthetisiert unter Verwendung von Standardpunktmutagenese-(SDM)-Protokollen. Diese DNA-Moleküle wurden in den *E.-coli*-Wirt TG-1 (Amersham Corp., Illinois, USA) durch Transfektion eingeführt, um rekombinante Phagenplaques zu erzeugen. Es wurde gefunden, dass ein rekombinanter Phage die gewünschte modifizierte DNA-Sequenz enthielt, was mit Standard-DNA-Sequenzanalyse bestimmt wurde.

[0164] Die modifizierte rib-Promotorregion wurde dann wieder mit den rib-Strukturgenen des Operons verbunden unter Verwendung eines Paares von einzeln vorhandenen NsiI-Restriktionsenzymstellen 750 bp von der Flanke der ribP₁-Region und den umgebenden Sequenzen entfernt. Doppelsträngige DNA-Moleküle der Phagen-Rekombinante wurden hergestellt, mit NsiI verdaut, das 750-bp-Fragment isoliert und das Fragment mit dem dephosphorylierten 8,7-kb-NsiI-Fragment von pRF39 Δ R1 (ein Plasmid, das von pRF39, [Fig. 12](#), abgeleitet ist, das das Wildtyp-rib-Operon enthält) ligiert. Die ligierten DNA-Moleküle wurden in *E.-coli*-DH5 α -Zellen durch Transformation eingeführt, auf Ampicillinresistenz selektiert, was zur Gewinnung einer Ap^r-Kolonie führte, die das gewünschte rekombinante Plasmid, pRF75, enthielt.

[0165] Der SPO1-15-Promotor wurde als nächstes stromaufwärts von ribP₁ inseriert, indem pRF75 mit einer Kombination von EcoRI- und BamHI-Enzymen verdaut wurde, die geschnittene DNA in das gereinigte 400-bp-EcoRI-BamHI-SPO1-15-haltige Restriktionsfragment ligiert wurde und die ligierte DNA in *E.-coli*-DH5 α -Zellen durch Transformation eingeführt wurde, und auf Ampicillinresistenz selektiert wurde. Es wurde gefunden, dass eine Ap^r-Kolonie das rekombinante Plasmid, pRF77, aufgenommen hatte, das das gewünschte SPO1-15-modifizierte rib-Operon enthielt. Ein Chloramphenicol-Resistenzgen, *cat*, auf einem 1,6-kb-XbaI-Restriktionsfragment, wurde anschließend in pRF77 an der einzeln vorhandenen XbaI-Stelle eingeführt, was das Plasmid pRF78 erzeugte ([Fig. 14](#)).

[0166] Dieses Prototyp-Operon wurde weiter modifiziert, damit es einen aktiven ribP₁-Promotor und/oder eine zweite Kopie des SPO1-15-Promotors enthielt, die stromabwärts von ribP₂ innerhalb einer intercistronischen Region zwischen den rib-codierenden Regionen ORF3 und ORF4, wie oben beschrieben, eingeführt wurden. Z. B. wurde das Plasmid pRF88, das ein Derivat des modifizierten rib-Operons in pRF78 mit einem aktiven ribP₁-Promotor ([Fig. 14](#)) enthielt, konstruiert mit dem gleichen Verfahren, wie oben beschrieben, unter Verwendung eines rekombinanten Phagen, der den Wildtyp-ribP₁-Promotor enthielt. In anderen Beispielen wurde eine zweite Kopie des SPO1-15-Promotors, der stromabwärts von ribP₂ angeordnet war, in die bestehenden modifizierten rib-Operon-haltigen Plasmide pRF78 und pRF88 inseriert, indem das 2,0-kb-BglIII-Fragment jeder Plasmid-DNA entfernt wurde und das 2,4-kb-BglIII-Fragment von pRF66 inseriert wurde, was die Plasmide pRF81 bzw. pRF89 erzeugte ([Fig. 14](#)).

Konstruktion von Ade⁺-RB50-Stämmen

[0167] Es ist wichtig, Bakterienstämme zu verwenden, die es erfordern, dass so wenig Komponenten wie möglich einem Fermentationsmedium zugegeben werden müssen. Solche Stämme sind billiger zu fermentieren, um Riboflavin zu erzeugen. Hierzu wurden Adeninrevertanten, die amplifizierte modifizierte rib-Operons enthielten, konstruiert. Diese Revertanten mögen nicht wahre Revertanten von pur-60 sein, sondern Mutationen an einer anderen Stelle enthalten, die das Erfordernis für Adenin unterdrückt. Wie unten diskutiert, erzeugen sie etwa 25% mehr Riboflavin als nicht revertierte Stämme. Beispiele für solche Konstruktionen werden nun beschrieben.

[0168] Die Plasmide pRF8, pRF40, pRF50, pRF69, pRF71, pRF78, pRF81, pRF88 und pRF89 wurden jeweils in RB50 (ein RoF⁻-deregulierter B.-subtilis-Stamm) transformiert, wobei auf Chloramphenicol-Resistenz selektiert wurde (Cm^r). Eine resistente Kolonie wurde für jeden Stamm ausgewählt. Ade⁺-Revertanten jedes Stammes wurden isoliert, indem Bakterien in RMM1-Brühe, die 10 µg/ml Adenosin enthielt, gezüchtet wurden und Proben der Kulturen auf Minimalagarplatten ausplattiert wurden. Eine Kolonie jedes Ade⁺-Stammes wurde selektiert und die Vektor-DNA wurde amplifiziert, indem Kolonien selektiert wurden, die auf zunehmend höheren Gehalten von Chloramphenicol wuchsen bis zu einem maximalen Gehalt von 60 µg/ml.

Integration an einem zweiten Ort

[0169] Wie oben beschrieben ist es wichtig, ein gentechnisch erzeugtes rib-Operon in dem B.-subtilis-Chromosom zu amplifizieren, um hohe Titer an Riboflavin zu erhalten. Es ist auch wichtig, sicherzustellen, dass die Anzahl von DNA-Kopien des rib-Operons innerhalb eines Chromosoms nicht beschränkend für die Riboflavinproduktion ist. Eine weitere Amplifikation des rib-Operons kann erreicht werden, indem Kopien des rib-Operons an mehr als einer Stelle in dem B.-subtilis-Chromosom integriert und amplifiziert werden, um die Riboflavinausbeute weiter zu erhöhen. Ein Beispiel dafür, wie eine solche Zweitstellen-Integration erreicht werden kann, ist unten beschrieben.

[0170] Die oben beschriebenen Vektoren beruhten alle darauf, dass das cat-Gen die Integration an der Stelle des rib-Operons zuließ. Um die rib-Gene an einer zweiten Stelle zu inserieren, ist es bevorzugt, ein davon verschiedenes antibiotisches Resistenzgen zur Verwendung an dieser zweiten Stelle zu haben. Es kann z. B. eine Tetracyclinresistenz (tet) von B. subtilis verwendet werden (Perkins und Youngman, J. Bacteriol., 155: 607–615, 1983). Solche tet-Gene sind dem Fachmann auf diesem Gebiet wohl bekannt und für diese Personen leicht verfügbar. Bei einer solchen Konstruktion kann z. B. das Plasmid pRF78 ([Fig. 14](#)), das eine modifizierte Version des rib-Operons enthält, mit XbaI geschnitten werden und in ein 2,4-kb-XbaI-Fragment, das das tet-Gen enthält, ligiert werden. Das entstehende Plasmid enthält das tet-Gen an der XbaI-Stelle und wird mit pRF85 bezeichnet.

[0171] Ein Stamm, bei dem das gesamte rib-Operon deletiert wurde und bei dem ein tet-Gen an einer zweiten Stelle integriert wurde, ist erforderlich, um die Integration von pRF85 an dieser Stelle zu verursachen. Eine solche Stelle ist das bpr-Gen, das die Bacillopeptidase F codiert, eine kleinere, nicht essentielle, extrazelluläre Protease. Ein E.-coli-Plasmid, das das bpr-Gen enthält, pKT2 (Sloma et al., J. Bacteriol., 172: 1470–1477, 1990) wurde mit EcoRV verdaut. Diese EcoRV-Stelle befindet sich in der codierenden Region von bpr. Die DNA wurde dann mit einem 2,4-kb-EcoRI-Fragment ligiert, das das tet-Gen enthielt, das gebluntet war. Das entstehende Plasmid (das das tet-Gen an der EcoRV-Stelle von bpr enthielt) wurde als pKT2-tet bezeichnet. Diese DNA wurde mit EcoRI linearisiert und dann in RB52 transformiert, einem Stamm, der bezüglich der Riboflavinsynthese dereguliert ist. Tet^r-Kolonien entstanden und eine dieser Kolonien wurde als RB54 bezeichnet. Das an bpr integrierte tet-Gen dient als homologe Sequenz für die Integration von pRF85.

[0172] Um sicherzustellen, dass das klonierte Riboflavin-Operon von pRF85 an der zweiten chromosomalen Stelle inseriert wird, die das Tetracyclin-Resistenzgen enthält, wurde eine Region, die das ursprüngliche Riboflavin-Operon und flankierende DNA enthielt, die der in pRF85 enthaltenen gleich, aus dem Chromosom von RB54 mit in-vitro-Methoden entfernt. Kurz gesagt, beinhaltet dies, dass zuerst ein rekombinantes E.-coli-Plasmid erzeugt wird, bei dem das klonierte Riboflavin-Operon und die flankierenden Regionen zwischen den NcoI- und XbaI-Restriktionsstellen entfernt sind und durch ein Chloramphenicol-Resistenzgen, cat, ersetzt sind, das in B.-subtilis-Bakterien exprimiert wird. Dieses Plasmid wird dann verwendet, um das chromosomale Riboflavin-Operon zu deletieren, indem RB54 mit linearisierten Plasmidmolekülen transformiert wird und auf Chloramphenicol-resistente (Cm^r)-Bakterien selektiert wird. Cm^r-Bakterien entstehen durch ein rekombinantes Ereignis (Ersatz des Markers), das die Wildtyp-rib-Gene durch die deletierte Kopie, die das cat-Gen enthält, ersetzt.

[0173] Genauer wurde Plasmid pRF34 (siehe Beispiel 6) verwendet, um ein E.-coli-Plasmid zu erzeugen, das eine in vitro erzeugte Riboflavin-Operon-Deletion enthält. Dieses Plasmid stammt von pRF2, bei dem das Riboflavin-Operon an jedem Ende von zwei einmalig vorhandenen XbaI-Stellen flankiert wird (eine Stelle ist stromaufwärts des 5'-Endes des rib-Operons neben dem deletierten 0,8-kb-NcoI-Fragment angeordnet und die zweite Stelle ist ungefähr 1,6 kb stromabwärts des Endes des Operons angeordnet) und ein cat-Gen außerhalb dieser Region inseriert ist. Indem pRF34 mit XbaI verdaut wird und die geschnittenen DNA-Moleküle bei verdünnten DNA-Konzentrationen ligiert werden, wurde ein rekombinantes Plasmid, pRF82, gewonnen, bei dem eine 7,2-kb-Region, die das Riboflavin-Operon enthält, entfernt wurde und im Wesentlichen durch das cat-Gen ersetzt wurde. Das Plasmid pRF82 wurde durch Restriktionsenzymverdau linearisiert und die geschnittene DNA wurde verwendet, um das Chromosomen-Riboflavin-Operon RB54 durch DNA-Transformation zu entfernen, wobei Cm^r-Bakterien selektiert wurden, was zu einem Ersatz des Markers führte. Cm^r-Kolonien wurden auf Riboflavin-Auxotrophie gescreent und eine Rib⁻-Cm^r-Kolonie, RB55, wurde für die weitere Untersuchung gewonnen.

[0174] Das Plasmid pRF85 wurde in den Stamm RB55 transformiert, wobei auf Rib⁺ selektiert wurde. Ein Rib⁺-Transformant wurde ausgewählt und mit RB58 bezeichnet. Bei diesem Stamm ist das rib-Operon bei bpr durch homologe Rekombination zwischen den tet^r-Genen in dem Plasmid und dem Chromosom integriert. Chromosomale DNA aus RB58 wurde hergestellt und kann verwendet werden, um RB50::[pRF69] zu transformieren, wobei auf Tet^r selektiert wird. Bei diesen resistenten Kolonien ist dann das modifizierte rib-Operon an der Stelle des rib-Operons und bei bpr integriert. Das bei rib integrierte rib-Operon wird amplifiziert, indem auf Kolonien selektiert wird, die in Gegenwart erhöhter Gehalte an Chloramphenicol wachsen, wie oben beschrieben, und die zweite Kopie des rib-Operons wird amplifiziert, indem Kolonien selektiert werden, die auf wachsenden Anteilen von Tetracyclin wachsen.

Beispiel 9: Fermentative Produktion von Riboflavin

[0175] Die Auswertung von Riboflavin überproduzierenden Stämmen wurde in Chemap-14-l-Gefäßen bei durch Kohlenstoff begrenzten Fed-Batch-Fermentationen durchgeführt, wobei der Riboflavingehalt mit HPLC gemessen wurde. Da Enzyme, die von den Genen für die Riboflavinsynthese codiert werden, geschwindigkeitsbeschränkend sind, wurden die rib-Gene, die amplifiziert wurden, mit hoher Kopienzahl aufrechterhalten durch Einschluss von 60 µg/ml Chloramphenicol in das Inoculum, nicht aber den Fermenter.

[0176] Eine Kultur von B. subtilis RB50::[pRF69] wurde auf Tryptose-Blutagarbase (TBAB Difco, die 60 µg/ml Chloramphenicol (CAM) enthielt, gezüchtet. Die Kolonien wurden in 300-ml-Kolben mit Strombrechern überführt, die 25 ml Riboflavin-Minimalmedium (RMM; mit Natriumglutamat 2,0 g/l, Casaminoäuren (Difco) 0,2 g/l, Hefeextrakt (Difco) 0,2 g/l, KH₂PO₄ 6,0 g/l, K₂HPO₄ 14,0 g/l, (NH₄)₂SO₄ 2,0 g/l, Natriumcitrat 1,0 g/l, MgSO₄·7 H₂O 0,2 g/l, Adenosin 0,05 g/l, Glucose 15,0 g/l, pH 7,0) mit 60 µg/ml CAM enthielt. Die beimpften Kolben wurden unter Schütteln mit 250 Upm bei 37°C inkubiert. Nach 8 Stunden wurde steriles Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15% zugegeben und Aliquots mit 1 ml wurden bei -80°C aufbewahrt.

[0177] Um eine Fermentation zu starten, wurde ein gefrorenes Gläschen mit RB50::[pRF69] bei 37°C aufgetaut und in einen 300-ml-Kolben mit Strombrechern mit 25 ml RMM und 60 µg/ml CAM überführt und mit 250 Upm bei 37°C geschüttelt. Nach 8 Stunden wurden 6 ml der wachsenden Kultur verwendet, um 300 ml Fermentationsmedium (siehe Tabelle VII unten) in einem 2-l-Transferkolben zu beimpfen. Ein solcher Kolben enthielt 300 ml Fermentationsmedium, dem 90 ml einer Mischung aus 15% Glucose und 30% Maltose zugegeben worden waren. Chloramphenicol wurde auf eine Endkonzentration von 60 µg/ml zugegeben. Nach 12-stündiger Inkubation mit 200 Upm auf einem Schüttler mit einem Umlaufdurchmesser von 2" bei 37°C wurde der Inhalt der Kolben in 7 l Fermentationsmedium in einem 14-l-Fermentationsgefäß überführt.

[0178] Während der Fermentation wurde die Brühe kontinuierlich bezüglich des pH und des gelösten Sauerstoffs (DO_2) überwacht. Das Abgas wurde kontinuierlich mit Quadropol-Massenspektrometrie und Kohlendioxidentwicklung (CER) überwacht und die Sauerstoffaufnahme-Raten wurden aufgezeichnet.

[0179] Ein Vergleich verschiedener Fermentationen zeigte die Reproduzierbarkeit der Kontrollsysteme. Das Anfangskohlenhydrat war bei der Fermentation mit $\text{RB50}::[\text{pRF8}]_{60}$ nach 4 Stunden Wachstum verbraucht, was einen Anstieg des pH und einen Abfall der CER verursachte. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Kohlenhydratzuführung gestartet und das logarithmische Wachstum wieder aufgenommen, bis DO_2 nach 6 Stunden limitierend wurde. Die Rate der Kohlenhydratzuführung wurde mit Computer kontrolliert, um die DO_2 zwischen 10 und 20% Sättigung während der verbleibenden Fermentationszeit zu halten.

[0180] Überschüssiges Kohlenhydrat im Fermenter führt zu einer Sauerstoffanreicherung und verminderten Riboflavinproduktion. Die Sauerstoff-Transferbeschränkungen bestimmen die Dauer des logarithmischen Wachstums, die endgültige Zelldichte und die Riboflavin-Produktionsrate. Um die Sauerstoff-Transferate zu erhöhen, wurden Chemap-Fermenter mit 1000 Upm mit einem Kopfdruck von 0,6 atm betrieben.

[0181] Die Ergänzung der Kohlenhydratbeschickung mit Hefeextrakt führt zu einem Anstieg der Riboflavinproduktion verglichen mit Medien ohne Ergänzung ([Fig. 11](#), offene bzw. leere Quadrate: RBF-14; Tabelle VII). Wegen der hohen Kosten wurde die Menge an Hefeextrakt jedoch systematisch reduziert, indem sie durch weniger teure anorganische Inhaltsstoffe ersetzt wurde. Der Ersatz von Natriumhydroxid durch Ammoniumhydroxid bei der pH-Kontrolle lässt eine Reduktion an Hefeextrakt in der Beschickung zu und führte zu einem Anstieg sowohl der Zellmasse als auch des Riboflavintiters ([Fig. 11](#), geschlossene bzw. vollflächige Quadrate: RBF-22; Tabelle VII). Die Fermentationszeiten waren auch geringer. Bei anderen Fermentationen wurde außerdem der Hefeextrakt vollständig aus der Beschickung entfernt und durch eine Kombination anorganischer Salze von Ammonium und Phosphat ersetzt, was zu einem weiteren Anstieg der Riboflavinproduktion und einer Reduktion der Verfahrenszeit führte ([Fig. 11](#), leere Kreise: RBF-23; Tabelle VII).

[0182] Der ursprüngliche $\text{RB50}::[\text{pRF8}]_{60}$ war auxotroph bezüglich Adenin wegen der pur-60-Mutation. Als Versuche durchgeführt wurden, um die minimale Menge an Adenosin, die für den Stamm erforderlich ist, zu bestimmen, um die Hemmung der frühen Biosyntheseenzyme, die an dem Stoffwechselweg beteiligt sind, zu minimieren, was zu dem Riboflavinvorläufer IMP führt ([Fig. 2](#)), wurde gefunden, dass $\text{RB50}::[\text{pRF8}]_{60}$ (und allgemein RB50 -Stämme mit einem rib-Operon, das innerhalb ihres Chromosoms amplifiziert ist) in Bezug auf den Adenosinbedarf instabil ist und prototrophe Revertanten (Ade^+) mit ziemlich großer Häufigkeit erzeugt wurden. In Schüttelkolben schienen die Ade^+ -Revertanten zu wachsen und Riboflavin mindestens so gut wie der $\text{RB50}::[\text{pRF8}]_{60}$ -Stamm zu erzeugen. Als die Fermenter ausgewertet wurden, erforderte der Revertant $\text{RB50}::[\text{pRF8}]_{60}$ -(Ade^+) kein Adenosin in der Medienrezeptur. Was noch wichtiger ist, der Revertant wuchs in einer schnelleren Rate und erzeugte 25% mehr Riboflavin als der Elternstamm in weniger Zeit. Ein Titer von 5,4 g/l Riboflavin wurde in 49 Stunden erzeugt ([Fig. 11](#), vollflächige Kreise: RBF-29; Tabelle VII). Bei weiteren Fermentationen wurde außerdem Hy Soy T aus der Anfangscharge oder dem Anfangsmedium entfernt und durch Maiseinweichwasser ersetzt, was zu einem weiteren Anstieg der Riboflavinproduktion auf 6,3 g/l in 48 Stunden führte (RBF-42, Tabelle VII).

[0183] Unter diesen Fermentationsbedingungen wurde ein signifikanter Anstieg der Riboflavinproduktion gezeigt unter Verwendung von Bakterienstämmen, die gentechnisch erzeugte Riboflavin-Operon-DNA enthielten. Stämme, die das Wildtyp-Riboflavin-Operon auf einem 6,5-kb-EcoRI-XbaI-Restriktionsfragment enthielten, $\text{RB50}::[\text{pRF40}]_{60}$ (Ade^+), erzeugten 7,4 g/l Riboflavin in 48 Stunden. Außerdem erzeugten Stämme, die ein bezüglich der Transkription modifiziertes rib-Operon enthielten, wobei der ribP_1 -Promotor und die regulatorische Region durch den konstitutiven SPO1-15-Promotor ersetzt waren, $\text{RB50}::[\text{pRF50}]_{60}$ (Ade^+), 9,0 g/l Riboflavin in 48 Stunden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Modifikation des Riboflavin-Operons durch Entfernung der regulatorischen Regionen und/oder die Einführung von stärkeren, konstitutiven exogenen Promotoren zum Anstieg des Riboflavintiters führt.

Tabelle VII

Fermentationskomponenten und -bedingungen

Komponente	RBF-14	RBF-22	RBF-23	RBF-29	RBF-42
Anfangsbeschickung (g/l)					
Glucose	10,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Maiseinweichwasser	--	--	--	--	10,00
Hy Soy T	15,00	15,00	15,00	10,00	--
Natriumglutamat	--	--	--	5,00	5,00
Amberex 500	15,00	15,00	20,00	20,00	20,00
KH ₂ PO ₄	5,00	5,00	7,50	7,50	7,50
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	0,5	0,5	1,50	1,50	1,50
MnSO ₄	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Adenosin	0,05	0,05	0,05	--	--
MAZU DF37C	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
FeCl ₃	--	--	0,025	0,02	0,02
CaCl ₂	--	--	0,50	0,50	0,50
ZnSO ₄	--	--	0,0005	--	--
CuCl ₂	--	--	0,0013	--	--
CoCl ₂	--	--	0,0013	--	--
Nährstoffbeschickung (g/l)					
Amberex 500	160,00	120,00	--	--	--
NH ₄ Cl	--	--	7,50	7,50	7,50
(NH ₄) ₂ SO ₄	--	--	7,50	7,50	7,50
KH ₂ PO ₄	--	--	15,00	15,00	15,50
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	--	--	2,50	2,50	2,50
DL-70-Sirup (als DS)	600,00	600,00	600,00	660,00	600, 00
pH-Kontrollbereich					
6,6	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄	H ₂ S	H ₂ SO ₄ O ₄
6,5	NaOH	NH ₄ OH	NH ₄ OH	NH ₄ OH	NH ₃
Komponente	RBF-14	RBF-22	RBF-23	RBF-29	RBF-42
Bedingungen					
Luft (vvm)	1,0	1,5	1,5–2,0	1,5	1,50
Upm	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0
Temperatur (°C)	37,0	37,0	37,0	37,0	37,0
Druck (bar)	0,5	0,5	0,5–0,75	0,6	0,6
Riboflavin (g/l)	3,4 (64 h)	4,1 (56 h)	4,3 (53 h)	5,4 (49 h)	6,3 (48 h)
Trockengewicht (g/l)	33,6	36,0	36,8	n. b.	44,6

[0184] Die Kinetik der Riboflavinproduktion bei den verschiedenen Fermentationen wurde analysiert unter Verwendung des Luedeking-Piret-Modells. In allen Fällen nahm die spezifische Produktivität vom Abschluß der exponentiellen Wachstumsphase zum Ende der Fermentation hin ab. Es war auch klar, dass die Riboflavinproduktion unter den verwendeten Fermentationsbedingungen in Beziehung stand zum Wachstum.

[0185] Es wurde gefunden, dass die Ausbeute an Riboflavin erhöht werden kann, indem die Fermentationskomponenten und -bedingungen verändert werden. Die Ausbeute an Riboflavin kann im Vergleich zu den oben beschriebenen Bedingungen erhöht werden durch Verwendung solcher Fermentationskomponenten und -bedingungen, die in Tabelle VIII gezeigt sind.

Tabelle VIII

Anfangscharge	(g/l)
Hefeextrakt	20
Glucose	25
KH_2PO_4	7,5
$\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,0
MnSO_4	0,05
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025
Mazu DF37C	2,5
Maiseinweichwasser	10
Natriumglutamat	5
Beschickungsmedium (3 l insgesamt verwendet)	
Glucose	583,3
Natriumcitrat	6,67
KH_2PO_4	15
Bernsteinsäure	1,67
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,67

[0186] Kurz gesagt ist bei einer solchen Fermentation das Ausgangsmaterial 6,65 l Batch-Medium und 0,35 l bakterielles (RB50::[pRF50]₆₀Ade⁺) Inoculum. Der Sauerstoffgehalt wurde mit einer Chemap-polarographischen Elektrode für gelösten Sauerstoff überwacht. Der Gehalt an gelöstem Sauerstoff wurde auf 15% ± 5% gehalten mit Hilfe einer durch Computer gesteuerten Zugabe zu dem Beschickungsmedium. Die Gesamtbeschickung, die zugegeben wurde, ist etwa 3,0 l in 48 bis 56 Stunden. Der Fermentations-pH wird auf 6,5 ± 0,1 gehalten (unter Verwendung von 1 n H_2SO_4 und NH_3 -Gas) und der Fermenterdruck wird auf 0,6 bar gehalten und die Luftströmung auf 10,5 l/min. Unter diesen Bedingungen erzeugte der Stamm RB50::[pRF50]₆₀Ade⁺ 11,0 g/l Riboflavin in 48 Stunden, was eine Verbesserung der Produktion von ungefähr 20% bedeutet, verglichen mit den vorherigen Fermentationsbedingungen. Schließlich wurde ein weiterer Anstieg der Riboflavinproduktion gezeigt unter Verwendung der bakteriellen Stämme RB50::[pRF69]₆₀Ade⁺, die ein bezüglich der Transkription modifiziertes Riboflavin-Operon mit zwei SPO1-15-Promotoren enthalten, wobei eines ribP₁ und die regulatorischen Sequenzen ersetzt und ein zweites zwischen ORF3 und ORF4 inseriert ist. Dieser Stamm erzeugte 13,0 bis 14,0 g/l Riboflavin in 48 Stunden und 15 g/l in 56 Stunden, was zeigt, dass eine erhöhte Transkription des Riboflavin-Operons unter Verwendung von zwei starken exogenen Promotoren die Produktionsmenge an Riboflavin erhöht.

Hinterlegung der Mikroorganismen

[0187] Plasmid pRF69 wurde bei der American Type Culture Collection am 6. Juni 1990 gemäß Budapester Vertrag hinterlegt und erhielt die Hinterlegungsnummer ATCC 68338.

[0188] E.-coli-Stamm DH5, der das Plasmid pRF50 enthält, wurde bei der American Type Culture Collection am 30. Mai 1990 gemäß Budapester Vertrag hinterlegt und erhielt die Hinterlegungsnummer ATCC 68332.

[0189] E.-coli-Stamm DH5 α , der das Plasmid pRF78 enthält, wurde bei der American Type Culture Collection am 30. Mai 1990 gemäß Budapester Vertrag hinterlegt und erhielt die Hinterlegungsnummer ATCC 68333 und Bacillus subtilis Stamm RB58 wurde auch bei der American Type Culture Collection am 30. Mai 1990 gemäß Budapester Vertrag hinterlegt und erhielt die Hinterlegungsnummer ATCC 55053.

[0190] *Bacillus subtilis* Stamm RB50 wurde am 23. Mai 1989 bei der Agricultural Research Culture Collection (NRRL), Peoria, Illinois, gemäß Budapester Vertrag über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren hinterlegt und erhielt die Hinterlegungsnummer B 18502.

Patentansprüche

1. Rekombinantes Bakterium, das mit einem Vektor transformiert wurde, der erstens eine von Bakterien oder Hefen stammende Nukleinsäuresequenz umfaßt, die für ein oder mehrere Proteine der Riboflavin-Biosynthese kodieren, und der zweitens ein oder mehrere Transkriptionselemente umfaßt, die nicht natürlich angeordnet sind, sondern nun transkriptionell mit dieser Nukleinsäuresequenz verbunden sind, wobei eine Mehrzahl von Kopien dieser Nukleinsäuresequenz einschließlich der Transkriptionselemente an einer oder mehreren Stellen innerhalb seines Chromosoms eingeführt wurde, und diese Nukleinsäuresequenz einschließlich der Transkriptionselemente vererbbar ist und von dem Bakterium so exprimiert werden kann, daß die Riboflavin-Biosynthese des Bakteriums relativ zu der des Bakteriums ohne eine Mehrzahl derartiger Nukleinsäuresequenzen einschließlich der Transkriptionselemente ansteigt.

2. Rekombinantes Bakterium nach Anspruch 1, wobei die von Bakterien stammende Nukleinsäuresequenz von *Bacillus*, insbesondere von *Bacillus subtilis* oder *E. coli*, abgeleitet ist.

3. Rekombinantes Bakterium nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Nukleinsäuresequenz für wenigstens fünf Proteine der Riboflavin-Biosynthese kodiert.

4. Rekombinantes Bakterium nach einem der Ansprüche 1 bis 3, das ein oder zwei derartige Transkriptionselemente umfaßt.

5. Rekombinantes Bakterium nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Transkriptionselement ein Promotor ist.

6. Rekombinantes Bakterium nach Anspruch 5, wobei der Promotor ein Promotor ist, der ausgewählt ist aus einem Promotor natürlicherweise assoziiert mit einem Gen von SPO1 Bacteriophage, einem Promotor natürlicherweise assoziiert mit *veg*, *amy* und *apr*, und anderen transkriptionsregulierenden Elementen, die durch das Genprodukt von *sacQ* aktiviert werden.

7. Rekombinantes Bakterium nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Nukleinsäuresequenz einschließlich der Transkriptionselemente an ein oder zwei Stellen innerhalb des Chromosoms eingeführt worden ist.

8. Rekombinantes Bakterium nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Bakterium bezüglich der Riboflavingen-Expression dereguliert ist.

9. Rekombinantes Bakterium nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Bakterium ein *E. coli*- oder *Bacillus*-Stamm, insbesondere ein *Bacillus subtilis*-Stamm ist.

10. Verfahren zur Herstellung von Riboflavin, gekennzeichnet durch Anzucht eines rekombinanten Bakteriums nach einem der Ansprüche 1 bis 9 unter geeigneten Anzuchtbedingungen.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die geeigneten Anzuchtbedingungen gekennzeichnet sind durch Begrenzung der Verfügbarkeit eines Bestandteils des Anzuchtmediums derart, daß für die Anzucht des rekombinanten Bakteriums aerobe Bedingungen aufrechterhalten werden.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der Bestandteil ausgewählt ist aus einer Kohlenstoffquelle, einer Stickstoffquelle oder einem Bestandteil, der für das rekombinante Bakterium erforderlich ist.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei der Bestandteil Glucose oder eine Carbonsäure ist.

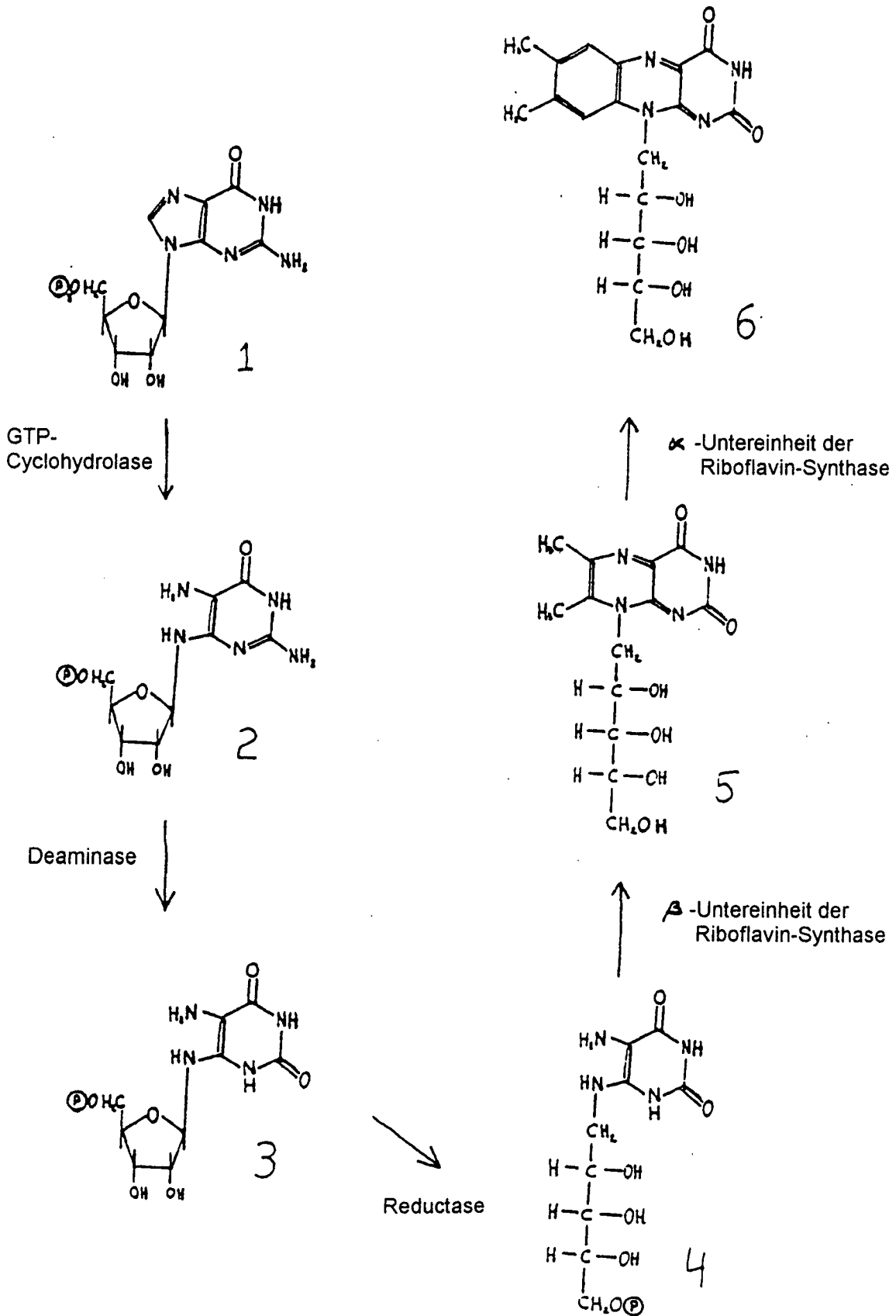
14. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der begrenzende Schritt die begrenzende Hinzufügung des Bestandteils zu einem Nährmedium umfaßt.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der Bestandteil Glucose oder eine Carbonsäure ist.

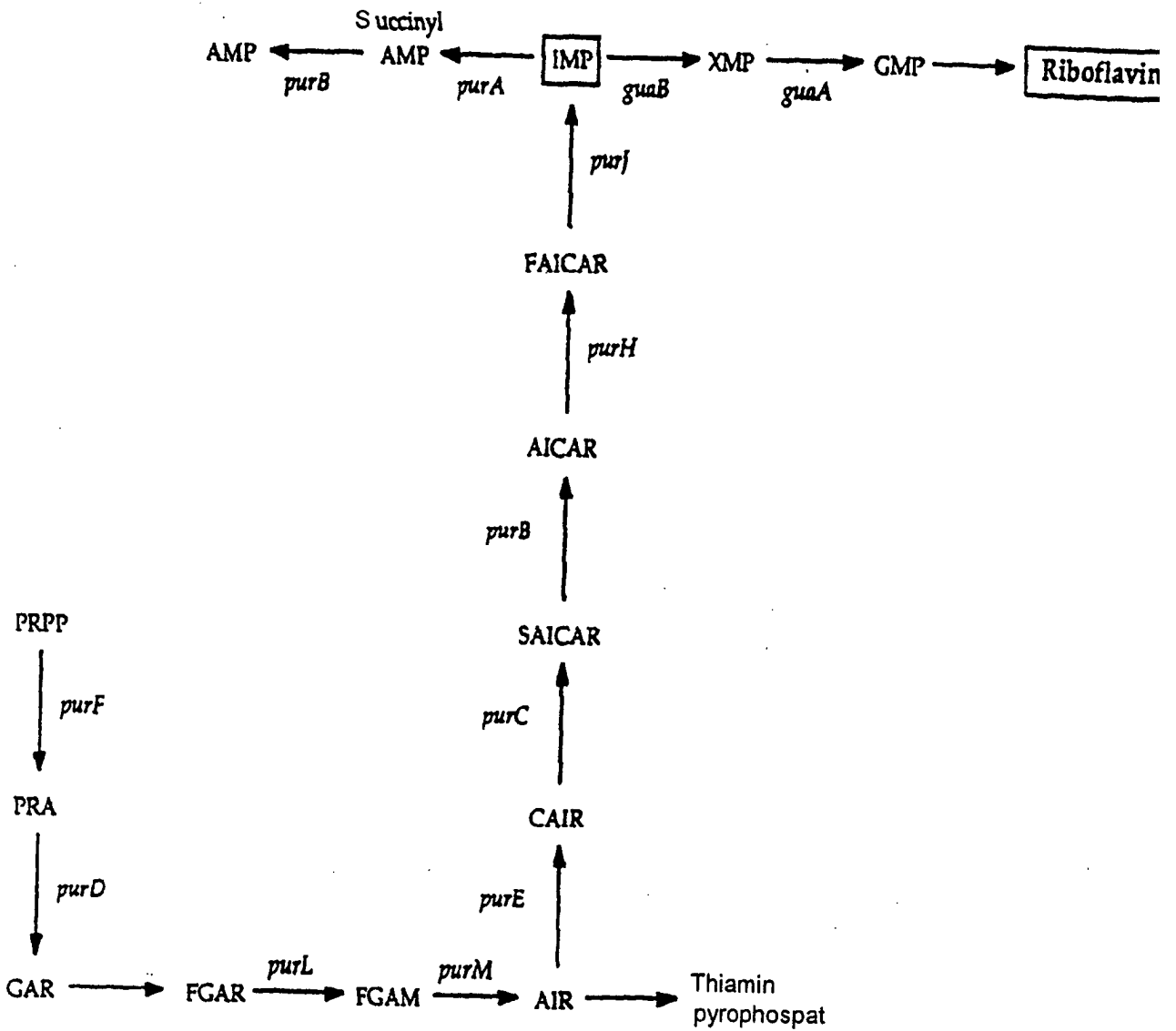
Es folgen 36 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1



FIGUR 2.



PPSANTHNXM	8XBND0B0S0S0B0N	M B	HSS0B0KN	KE M	
SLACIANNBA	1HALBP1STCSESSL	A G	ATESSBAA	SA N	RM
TELCNQFLAE	N0MA0NNAY0ACAAA	E L	EYCAA0EE	PR L	SA
1111211111	121411111111JJ3	3 1	311JJ213	21 1	AE
/	/	/	/	/	12

M13 POLYLINER SEQUENZ

CTGCAGGTCGACTCTAGAGGATGCCCCATGGACAGCCGTAACGGCCTTGGCCCTTTCACGAAAAACAAATTGCGGGTAGCTCAAAGTTTGTCTTCTACC
 GACGTCAGCTGAGATCTCCTAGGGGTACCTGTCCGCATTGCCGAACCGGAGAAGTGCTTTTTGTTAACGCCCATGCAGTTTCAAACAAAAGATGG

100

l q v d s r g s p m d s r n g l g l f t k k q i a g t s k f v f y p
 e r s t l e d p p w t a v t a l a s s r k n k l r v r q s l f s t
 a g r l . r i p h g q p . r p w p l h e k t n c g y v k v c f l p
 c t s e l p d g m s l r l p r p r k v f f c i a p v d f n t k .
 q l d v r s s g g h v a t v a k a e e r f f l n r t r . l k n e v
 a p r s . l i g w p c g y r g q g r . s f v f q p y c l t q k r g

M	HFH	BN D	F AB	B F	F
S	ISH	IB P	N LB	B N	O
E	NPA	NO M	U UV	V U	K
I	P11	11 1	H 11	1 H	1

CGTTAACGAAATGCCAAAACAAATTAGGATCAAGCAGCTTCCCATTGGGGCTGCTTTTTTATATCTTTTTACGGTCATCCCGTAAAAACAGAACAT
 GCAAATTGCTTTACGCGTTTTGTTAATCCTAGTTCGTGGAAGGGTAACCCCGACGAAAAAATATAGAAAAATGCCAGTAGGGGATTTTTGTCTTGTA

200

f n e m r k t n . d q a a s h w g c f f y i f f t v i p . k q n i
 r l t k c a k q i r i k q l p i g a a f f i s f l r s s p k n r t .
 v . r n a q n k l g s s s f p l g l l f l y l f y g h p l k t e h
 g n l s i r l v f . s . a a e w q p q k k . i k k v e m g . f c f m
 r k v f h a f e i l l i l c s g m p s e k k i d k k r d d s l f l v
 t . r f a c f l n p d l l k g n p s s k k y r k . p . g r f v s c

H	NA	S AN
N	SV	F SS
F	IA	A EE
3	13	N 11

AAATTCGTATATCTATAGAAAAAGAAATTTTTGCAGAAATGTGAACATATTCGGTATGCATCGTTATTAATAATTTACGAGAATTTACGGTTTTTT
 TTTAAGCATATAGATATCTTTCTTTAAAAAGCTTTACACTTTGTATAAGGGCAATACGTAGCAATATAAATTAAATGCTCTTAAATGCCAAAAA

300

n s y i y r k e i f a e m . n i f p l c i v i l l i y e n l r f f
 i r i s i e k k f l q k c e t y a r y a s l y . . f t r i y g f l
 k f v y l . k r n f c r n v k h i p v m h r y l n n l r e f t v f y
 f e y l . l f s i k a s i h f m n g n h a t i n i i . s f k r n k
 y i r i d i s f f n k c f h s v y e r . a d n y . y n v l i . p k k
 l n t y r y f l f k q l f t f c i g t i c r . i l l k r s n v t k

FIGUR 3A

M	M	M H	BM DT	M
S	A	SP	IB PA	S
E	E	EH	NO NO	E ORF 6
I	3	11	11 11	1 TRANSLATIONS STOP

YTAAATCAGGATTATCTGATATAAAAGAAGGTGACAAGATTAAGGETTACTTCAGCAATCAAAGCGGATCGACGGTTAATCAAGTTGCAAAAGTGAA

 AATTTAGTCCTAAATAGACTATATTTCTTCCACTGTTCTAATTCCGAATGAAGTCGTTTAGTTTCGCCTAGCTGCCAATTAGTTCCAACGTTTTCACCTT

l n q d l s d i k e g d k i k a y f s k s k r i d g . s r l q k . m
 . i r l y l i . k k v t r l r l t s a n q s g s t v n q g c k s e
 k s g f i . y k r r . q d . g l l q q i k a d r r l i k v a k v n

 n f . s k d s i f s p s l i l a . k l l d f r i s p . d l n c f h
 . i l l i . r f y f f t v l n l s v e a f . l p d v t l . p q l l s
 i l d p n i q y l l l h c s . p k s . c i l a s r r n i l t a f t f

M H	BM DT	H	R MD	BM D
SP	IB PA	P	S SR	IB P
EH	NO NO	H	A EA	NO N
11	11 11	1	1 11	11 1

THD-UNABHÄNGIGER TRANSCRIPTIONS TERMINATOR
 PI PROMOTOR

TGATTAATAAAACATCACCTTCGGATCGAAGGGTGATGTTTTGTTTTCTCAAATTGTAAGTTATTTTCATTGCGTACTTTAAAAAGGATCGCTATAATA

 ACTAATTTTTGTAGTGGAAAGCCTAGCTTCCCACTACAAAACAAAAGAGTTTAAACATTCAAATAAAGTAAGCATGAAATTTTTCTAGCGGATATTAT

i k k h h l s d r r v m f c f s q i v s l f h c v l . k g s l . .
 . l k n i t f r i e g . c f v f l k l . v y f i a y f k k d r y n n
 d . k t s p f g s k g d v l f f s n c k f i s l r t l k r i a i i

 i i l f c . r e s r l t i n q k e . i t l k n . q t s . f p d s y y
 h n f f m v k r i s p h h k t k r l n y t . k m a y k l f s r . l
 s . f v d g k p d f p a t k n k e f q l n i e n r v k f l l a i i

E	CH	BNM
C	FP	ASA
O	RA	NPE
D	22	223

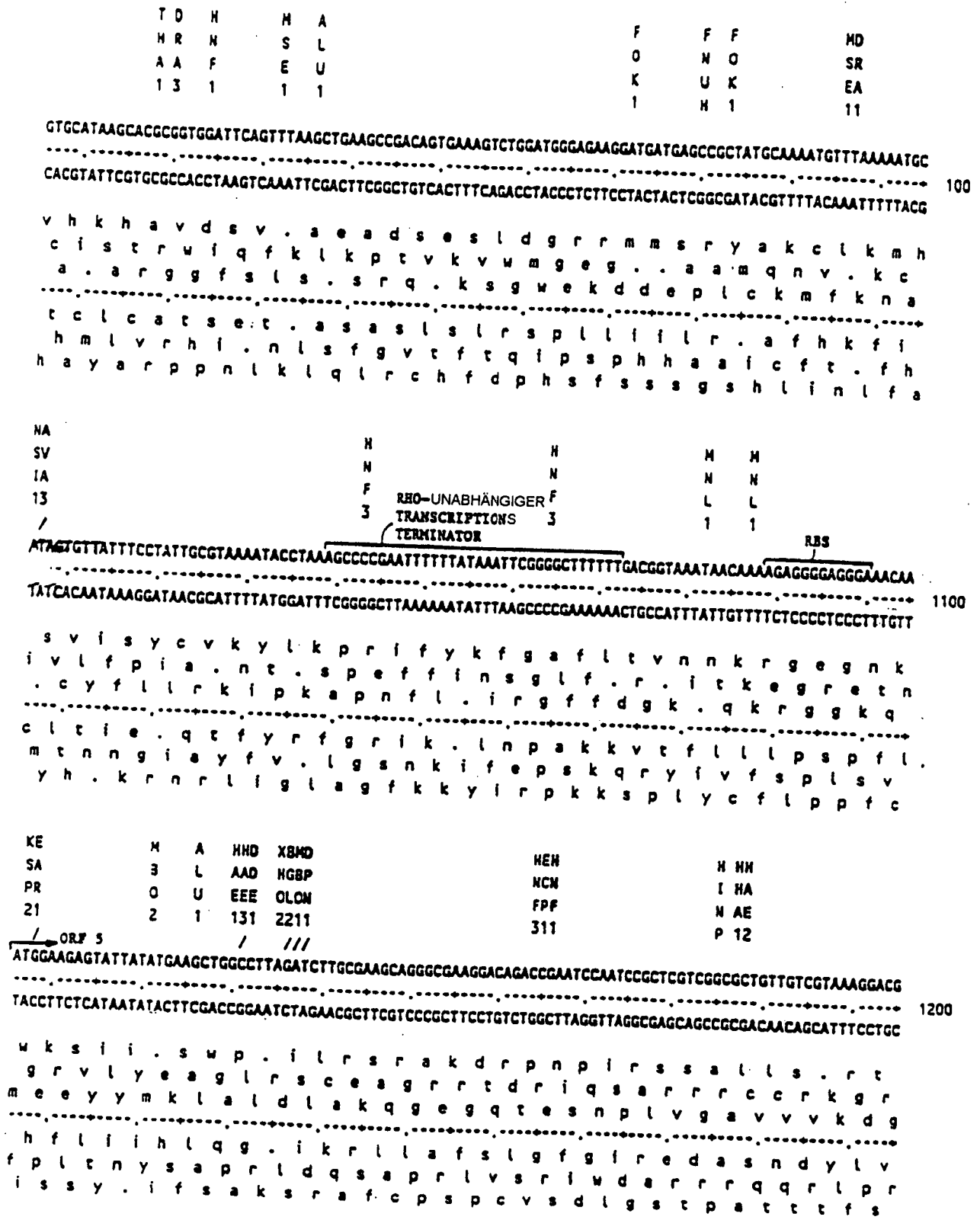
ACCAATAAGGACAAATGAATAAAGATTGTATCCTTCGGGGCAGGGTGGAAATCCCGACCGGGGTAGTAAAGCACATTTGCTTTAGAGCCCGTGACCCGT

 TGGTTATTCCTGTTTACTTATTTCTAACATAGGAAGCCCGTCCACCTTTAGGCGTGGCCGCATCATTTCGTGTAACGAAATCTCGGGCACTGGGCA

p i r t n e . r l y p s g q g g n p d r r . . s t f a l e p v t r
 q . g q m n k d c i l r g r v e i p t g g s k a h l l . s p . p v
 t n k d k . i k i v s f g a g w k s r p a v v k h l c f r a r d p c

 g i l v f s y l n y g e p c p p f g s r r y y l v n a k s g t v r
 l w y p c i f l s q i r r p l t s i g v p p l l a c k s . l g h g t
 v l l s l h i f i e d k p a p h f d r g a t t f c m q k l a r s g

FIGUR 3C



FIGUR 3D

BNANHBHN MD	A	HNF	N	NB	B	MHN	NN	BN
AAHLABHI SR	L	PLD	L	DS	S	NGS	SL	AL
NRAAEEAN EA	U	HAK	A	ET	T	LIP	PA	NA
1126211P 11	1	131	3	1X	X	1A2	H3	14

GACAAATTGTCGGAATGGGCGCCCATTTAAAATATGGTGAAGCTCATGCAGAAGTTCATGCCATCCATATGGCTGGAGCACATGCAGAGGGTGGCCGACAT
 CTGTTTAAACAGCCTTACCCCGGGTAAATTTTATACCACTTCGAGTACGTCTTCAAGTACGGTAGGTATACCGACCTCGTGTACGTCTCCACGGCTGTA

1300

d k l s e w a p i . n m v k l m q k f m p s i w l e h m q r v p t f
 t n c r n g r p f k i w . s s c r s s c h p y g w s t c r g c r h
 q i v g m g a h l k y g e a h a e v h a i h m a g a h a e g a d i
 s l n d s h a g m . f i t f s m c f n m g d m h s s e m c l t g v
 v f q r f p r g n l i h h l e h l l e h w g y p q l v h l p h r c
 p c i t p i p a w k f y p s a . a s t . a m w i a p a c a s p a s m

MBM	T	F	B	N	
ASA	A	N	B	L	XMM
EAE	O	U	V	A	HBA
213	1	H	1	3	CCM

211

TTACGTTACACTCGAACCTGCAGCCATTACGGAAAAACACCGCCATGTGCAGAATTGATTATCAACTCTGGTATCAAAGAGTGTTCGTGGCGATGAGA
 AATGCAATGTGAGCTTGGCAGCTCGGTAATGCCTTTTGTGGCGGTACACGTCTTAACATAAGTTGAGACCATAGTTTTCTCACAAGCACCGCTACTCT

1400

t l h s n r a a i t e k h r h v q n . l s t l v s k e c s w r . e
 l r y t r t v q p l r k n t a m e r i d y q l w y q k s v r g d e r
 y v t l e p c s h y g k t p p c a e l l i n s g i k r v f v a m r
 n v n c e f r a a m v s f c r w t c f q n d v r t d f s h e h r h s .
 k r . v r v t c g n r f f v a m h l i s . . s q y . f l t r p s s
 . t v s s g h l w . p f v g g h a s n i l l e p i l l t n t a i l

O BM	M KE	SM D	M N	AM	F	E AS	S E	EASH
P IA	N SA	IB P	B L	LN	O	C PC	F C	CPCN
N NM	L PR	NO N	O A	UL	K	R YR	A R	PYRL
1 11	1 21	11 1	2 3	11	1	2 11	N 2	1111

GATCCTAATCCGCTTGTGGCTGGAAGAGGATCAGCATGATGAAAGAAGCTGGCATTGAGGTAAGGGAAGGCATCCTGGCAGACCAGGGGGAGAGGCTGA
 CTAGGATTAGGGCAACACCGACCTTCTCCCTAGTCGTACTACTTCTTCGACCGTAACTCCATTCCCTTCCGTAGGACCGTCTGGTCCGCTCTCCGACT

1500

i l l i r l w l e e g s a . . k k l a l r . g k a s w q t r r r g .
 s . s a c g w k r d q h d e r s w h . g k g r h p g r p g g e a e
 d p n p l v a g r g i s m m k e a g i e v r e g i l a d q a e r l n
 i r i r k h s s p d a h h f f s a n l y p f a d q c v l r l p q
 l d . d a q p q f l s . c s s l l q c q p l p l c g p l g p p s a s
 s g l g s t a p l p i l m i f s a p m s t l s p m r a s w a s l s

FIGUR 3E

X	M	SHH	SS	RHM	B	F	F	B	A	H	M
M	N	TAA	PP	SAA	B	N	N	G	L	G	A
N	L	UEE	LL	AEE	V	U	U	L	U	E	E
1	1	113	11	123	1	H	H	1	1	2	3

ATGAAAAATTTCTGCACCTTATGAGGACAGGCCTTCGGTACGTCACGCTAAAAGCGGCTGCCAGCCTTGACGGCAAGATAGETACCAGCACGGGTGACAG
 TACTTTTTAAAGACGCTGAAATACTCCTGTCCGGAAGGCATGCAGTGGGATTTCCCGACGGTGGAACTGCCGTTCTATCGATGGTGGTCCCACTGTC

150

m k n f c e l . g q a f r t s r . k r l p a l t a r . l p a r v t a
 . k i s a l y e d r p s v r h a k s g c q p . r q d s y q h g . q
 e k f l h f m r t g l p y v t l k a a a s l d g k i a t s t g d s
 i f f k q v k h p c a k r v d r . f r s g a k v a l y s g e r t v
 h f i e a s . s s l g e t r . a l l p q w g q r c s l . w c p h c
 f s f n r c k l l v p r g y t v s f a a a l r s p l i a v l v p s l

T	HBMDMBM	AFS	ED	F
T	P1BPN8A	LNF	SD	0
H	MNONLVE	WJA	PE	K
2	1111112	NHN	11	1

CAAATGGATCAGCTCAGAGGCTGCAAGACAGGATGCTCAGCAATACAGGAAAACACACCAAGCATTITAGTCGGAGTTGGCAGTGAAAGCCGACAA
 GTTACCTAGTGCAGTCTCCGACGTTCTGTCTCCTACGAGTGGTATGTCTTTTGTGGTTTCGTAAMATCAGCCTCAACCGTGTCACTTTCGGCTGTTA

1700

n g s r q r l q d r m l s n t g k h t k a f . s e l a q . k p t i
 q m d h v r g c k t g c s a i q e n t p k h f a r s w h s e s r q s
 k w i t s e a a r q d a q q y r k t h q s l l v g v g t v k a d n
 a f p d r . l s c s l i s l l v p f c v l a n . d s n a c h f g v i
 c i s . t l p q l v p h e a i c s f v g f c k l r l q c l s l r c
 l h i v d s a e l c s a . c y l f v c w l m k t p t p v t f a s l

AM	P	B	H	M	CH	R	THH	HD	H	M
LS	S	S	N	A	FP	S	ANN	SD	G	B
UE	T	P	F	E	RA	A	QLF	TE	A	O
11	1	1	3	3	22	1	111	21	1	1

CCGAGCTTAACCTGCAGACTGCCGAATGTAACAAAACAGCCGGTTCGGGTCACTTGATACCGTACTCTCGATTCTCAGGACGCTAAAGTGATTGGC
 GGCTCGAATTGGACGCTCGACGGCTTACATTGTTTTGTCCGCCAAGCCAGTATGAACTATGGCATGAGAGCTAAGGACTCCTCGGATTTCACTAAACGC

1800

r a . p a d e r m . q n s r f g s y l i p y s r f l r t l k . f a
 e l n l q t a e c n k t a g s g h t . y r e l d s . g r . s d l r
 p s l t c r l p n v t k q p v r v i l d t v l s i p e d a k v i c d
 r a . g a s q r i y c f l r n p d y k l g y e r n r l v s f h n a
 d s s l r c v a s h l l v a p e p . v q y r v r s e q p r . l s k r
 g l k v q l s g f t v f c g t r t m s s v t s e i g s s a l t i q

FIGUR 3F

D	H HH	N	THHM	A
P	I HA	L	HIHM	L
N	N AE	A	ANAL	U
I	P 12	3	1P11	I

ATCAAATAGCGCCGACATGGATTTTTACGACGGCAGCGCCAGACGAGGAAAAGAAAAACGGCTTTCAGCTTTCGGAGTGAACATATTTACACTTGAAAC
 TAGTTTATCGCGGCTGTACCTAAAAATGCTGCCGTGCCGCTCTGCTCCTTTCTTTTTTGCCGAAAGTCGAAAGCCTCACTTGTATAAATGTGAACCTTG

i k . r r h g f l r r h a q t r k r k n g f q l s e . t y l h l k p
 s n s a d m d f y d g t r r r g k e k t a f s f r s e h i y t . n
 q i a p t w i f t t a r a d e e k k k r l s a f g v n i f t l e t
 i l y r r c p n k r r c a c v l f l f f p k . s e s h v y k e k f
 d f l a s m s k . s p v r l r p f s f v e k l k r l s c i . v q f
 s . i a g v h i k v v a r a s s s f f f r s e a k p t f m n v s s v

H HB	XMD	BM	M	MNS	PNA	HA
I HS	HBP	IA	8	BLF	VSL	IL
N AM	OON	NE	0	OAA	UPU	NU
P 11	Z11	11	2	Z3N	ZB1	31

CGAGCGCATTCAAATTCCTGATGTTTTGAAGATCCTAGCGGAAGAGGCATCATGTCCGGTATGTGGAAGCGGTTTCAGCTGTTACGGAAGCTTTGTC
 GCTCCGTAAGTTTAAGGACTACAAAACCTTCTAGGATCGCCTTCTCCGTAGTACAGCCACATACACCTTCCGCCAAGTCGACAAGTGGCTTCGAAACAG

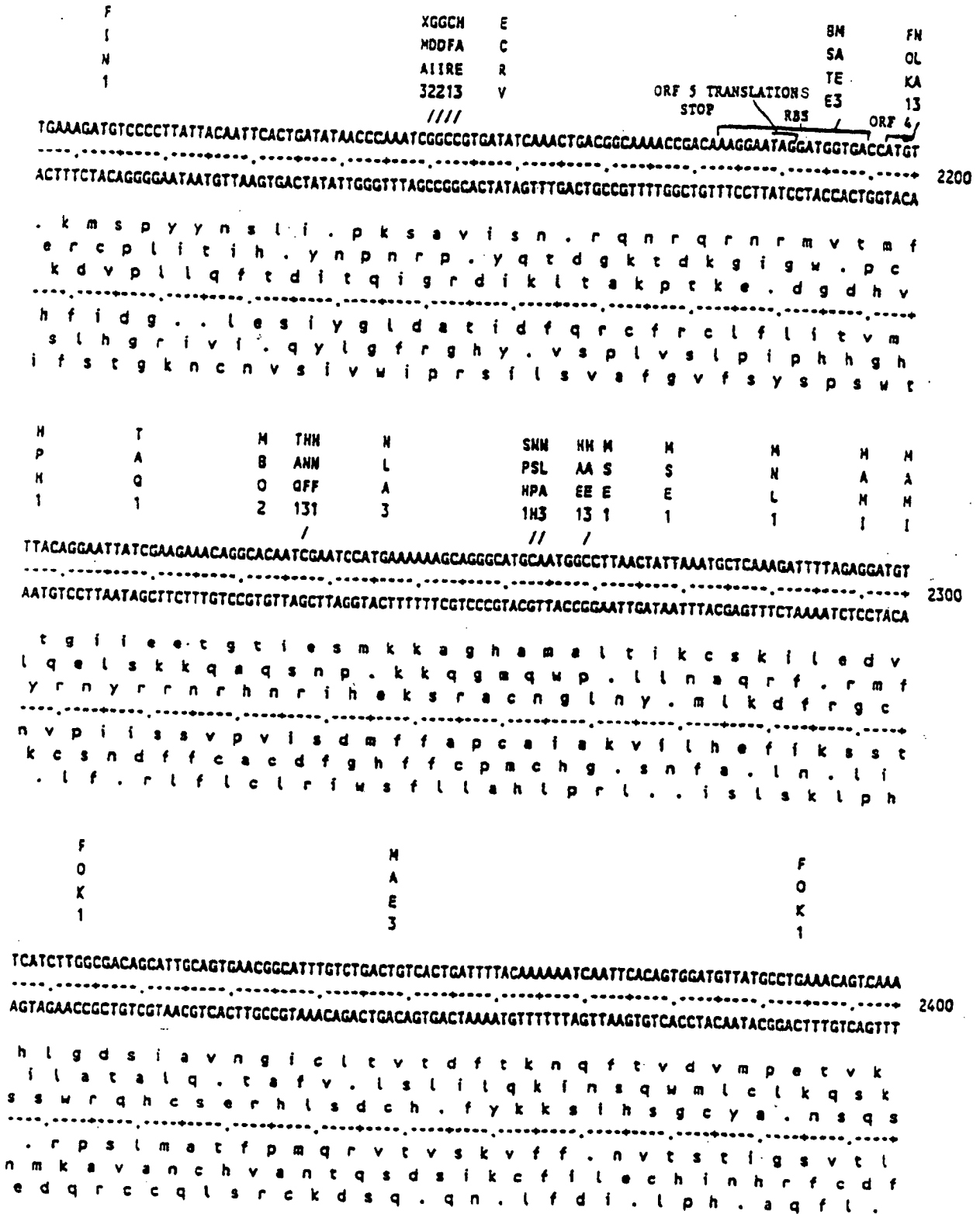
s a f k f l m f . r s . r k k a s c r e m w k a v q l f t e a l s
 r a h s n s . c f e d p s g r r h h v g v c g r r f s c s r k l c q
 e r i q i p d v l k i l a e e g i m s v y v e g g s a v h g s f v
 g l a n l n r i n q l d . r f f a d h r h i h f a c . s n v s a k d
 r a c e f e q h k s s g l p l l c . t p t h p l r n l q e r f s q
 s r m . i g s c k f i r a s s p m m d t y t s p p e a t . p l k t

M	M	SNN	AM	H	X	H
8	N	PSL	LS	P	M	P
0	L	HPA	UE	A	N	H
2	I	1H3	11	2	1	1

AAAGAAGGCTGTTTTCAAGAAATCATCTTCTATTTTCCCGCTAAACTAATCGGAGGAACGCATGCTCCAGCTTAATCTCCGGTGAAGGTTTTCAATCAA
 TTTCTCCGACAAAAGTTCTTTAGTAGAAGATAAAACGGGGATTGATTAGCCTCCTTCCGTACGAGGTCGAATTAGAGGCCACTTCCAAAAGTTAGTT

k k a v f k k s s i l p l n . s e e r m l p a . s p v k v f n q
 r r l f s r n h l l f c p . t n r r n a c s q l n l r . r f s i n
 k e g c f q e i l f y f a p k l i g g t h a p s l i s g e g f q s m
 f f a t k l f d d e i k g r f . d s s r m s g a . d g t f t k l .
 l l s n e l f . r r n q g . v l r l f a h e w s l r r h l n e i l
 l s p q k . s i m k . k a g l s i p p v c a g l k i e p s p k . d

FIGUR 3G



FIGUR 3H

A	MM								
L	AA								
U	EE								
1	23								
		H							
		S							
		E							
		1							
			F	XGGCKM	HH				
			N	MDDFAN	AA				
			U	ATIREL	EE				
			H	322131	13				
				////	/				

GCTACGTCACGTAATGATTTAACAAAAGGAAGCAAAGTAAATCTGCAAAGAGCGATGGCGGCAACGGCCGTTTCGGAGGCCATTTGGTCTCAGGCCATG
 CGATGCAGTGACTTACTAAATTGTTTTCTTCGTTTCATTTAGACCTTTCTCGCTACCGCCGTTTGGCGGCAAGCCTCCGGTAAGCAGAGTCCGGTAC

2500

a r s l n d l t k g s k v n l e r a m a a n g r f g g h f v s g h v
 l r h . m i . q k e a k . i w k e r w r q t a v s e a i s s q a m
 y v t e . f n k r k q s k s g k s d g g k r p f r r p f r l r p c
 a v d s f s k v f p l l t f r s l a i a a f p r k p p w k t e p w
 s r . q i l . c f s a f y i q f s r h r e v a t e s a m e d . a m
 l . t v s h n l l l f c l l d p f l s p p l r g n r l g n r r l g h

AHT									
CIA									
CNQ									
121									
/									
	H	KE	SM	MD	AAN	H E			
	N	SA	PB	SR	VSL	S C			MD
	F	PR	OO	EA	AUA	E O			SR
	3	21	12	11	214	1 D			EA
									11

TCGACGGAACTCGCGAAATCACACGAATTGAAGAGAAAAGCAAGCAGTTTACTATGATTTAAAAATGGACCCGTCATTAACAAAAACATTGGTTTTAAA
 AGCTGCCTTGACCCCTTAGTGTGCTTAAGTCTCTTTTCGTTGCGTCAAATGATACTAAATTTTACCTGGGCAGTAATTGTTTTGTAACCAAAATTT

2600

d g t a e i t r i e e k s n a v y y d l k m d p s l t k t l v l k
 s t e l r k s h e l k r k a t q f t e m i . k w t r h . q k h w f . r
 r r n c g n h t n . r e k q r s l l . f k n g p v i n k n i g f k
 t s p v a s i v r i s s f l l a t . . s k f f s g d n v f v n t k f
 d v s s r f d e s n f l f a v c n v l i . f h v r . . c f c q n .
 r r f q p f . v f q l s f c r l k s h n l f p g t m l l f m p k l

SM D									
13 P									
NO W									
11 1									
	A	FM	HH	B	H	MM D	M	MD	MD
	L	OS	NA	B	A	BB P	S	BP	BP
	U	KE	FE	V	E	OG N	E	ON	ON
	1	11	33	2	3	21 1	1	11	11

GGGATCAATTACTGTGGATGGCGTGAGCTTAACCATATTCGGCCTGACACAAGACAGTGACGATCTCCTTAATACCGCATACGATCAGCGAAACGATC
 CCCTAGTTAATGACACCTACCGCACTCGAATTGGTATAAGCCCGACTGTCTTCTGTGTCAGTACGAGCAATTATGGCGTATGCTAGTCGCTTGTCTAG

2700

g s i t v d g v s l t i f g l t e d t v t i s l i p h t i s e c i
 d q l l w m a . a . p y s a . q k t q . r s p . y r i r s a k r s
 g i n y c g w r e l n h i r p d r r h s d d l l n t a y d q r n d l
 p d i v t s p t l k v m n p r v s s v t v i e k i g e v l l s v i
 l s . n s h i a h a . g y e a q c f v c h r d g . y r m r d a f r d
 p i l . q p h r s s l w i r g s l l e t s s r r l v a y s . r f s

FIGUR 3I

M DP	TH	B	M D	CT	E
B PV	AM	S	B P	LA	C
O NU	QF	M	O N	AG	P
1 11	13	1	1 1	11	1

TTTTCAGAAAAACCGATCGGCTCTAAAGTGAATATCGAATGCCATATGATCGGAAAATATATGTATCGATTTTGCATAAAGCCAATGAAAATAAGACCC

 AAAAGTCTTTTTGCTAGCCGAGATTTCACTTATAGCTTACGCTATACTAGCCTTTTATATACATAGCTAAAAACGTATTTCCGGTACTTTTATTCTGGG 2800

f s e k t i g s k v n i e c d m i g k y m y r f l h k a n e n k t q
 f q k k r s a l k . i s n a i . s e n i c i d f c i k p m k i r p
 f r k n d r l . s e y r m r y d r k i y v s i f a . s q . k . d p

 k e s f v i p e l t f i s h s i i p f y i y r n k c l a l s f l v
 k . f f r d a r f h i d f a i h d s f i h i s k q m f g i f i l g
 r k l f f s r s . l s y r i r y s r f i y t d i k a y l w h f y s g

T	AM	M	F	MNM	M	MD H
T	FS	N	O	BSL	8	SR G
H	LE	L	K	OPA	0	EA A
2	21	1	1	2H3	2	11 1

AACAAACCATTACAAAAGCCTTCTTAAGCGAAAACGGCTTTAGAGAGGAAGATTGCGATGTTTCATCCGATAGAAGAAGCACTGGACGCTTAAAAAAA

 TTGTTTGGTAATGTTTTCGGAAGAATTGCGCTTTGCCGAAAATCTCTCCTCTAAACGTACAAAGTAGGCTATCTTCTTCGTGACCTGCCAAATTTTFTT 2900

q t i t k a f l s e n g f . r g r f a c f i r . k k h w t l . k k
 n k p l q k p s . a k t a f r e e d l h v s s d r r s t g r f k k r
 t n h y k s l l k r k r l l e r k i c m f h p l e e a l d a l k k

 w c v m v f a k k l s f p k . l p l n a h k m r y f f c q v s . f f
 l l g n c f g e . a f v a k l s s s k c t e d s l l l l v p r k l f
 v f w . l l r r l r f r s k s l f i q m n . g i s s a s s a k f f

B	M	B	SNN	H	M
B	B	S	PSL	P	S
V	O	M	HPA	A	E
2	2	2	1H3	2	1

GGCGAAGTCATCATEGTTGTAGATGATGAAGACAGAGAAAATGAAGGAGACTTTGTGGCTCTTGGCCGAGCATGCAACGCCGGAAGTCATTAACTTTATGG

 CCGCTTCAGTAGTAGCAACATCTACTACTTCTGTCTTTTACTTCTCTGAAACACCGAGAACGGCTCGTACGTTGCGGCCCTTCAGTAATTCAAATACC 3000

a k s s s l . m m k t e k m k e t l w l l p s m q r r k s l t l w
 r s h h r c r . . r q r k . r r l c g s c r a c n a g s h . l y g
 g e v i i v d d e d r e n e g d f v a l a e h a t p e v i n f m a

 a f d d d n y i i f v s f i f s v k h s k g l m c r r f d n v k h
 l r l . . r q l h h l c l f h l l s q p e q r a h l a p l . . s . p
 p s t m m t t s s s s l s f s p s k t a r a s c a v g s t m l k l

FIGUR 3J

M N	MD	FM D	M H M D	P H H
N L	BP	N M D	B P B P	L P N
L A	ON	U L E	O H O N	E H F
1 3	1 1	H 1 1	2 1 1 1	1 1 1

CGACACATGGGAGAGGACTGATCTGCACGCCGCTCAGTGAGGAAATCGCAGACAGGCTTGATCTTCACCCCTATGGTTGAGCATAATACAGACTCTCACCA

 GCTGTGTACCCTCTCCTGACTAGACGTCGGCGGAGTCACCTCCTTTAGCGTCTGTCCGAACTAGAAGTGGGATACCAACTCGTATTATGTCTCAGAGTGGT

3101

r h m g e d . s a r r s v r k s q t g l i f t l w l s i i q t l t t
 d t w e r t d l h a a q . g n r r q a . s s p y g . a . y r l s p
 t h g r g l i c t p l s e e i a d r l d l h p m v e h n t d s h h

 r c m p s s q d a r r e t l f d c v p k i k v r h n l m i c v r v
 s v h s l v s r c a a . h p f r l c a q d e g . p q a y y l s e g
 a v c p l p s i q v g s l s s i a s l s s r . g i t s c l v s e . w

E	B	M HEHH	XBMD	T
C	B	B ICHA	HGBP	T
P	V	O N4AE	OLON	H
1	2	2 P712	2211	2

///

CACTGCATTACCGTAAGCATAGACCATCGTGAACGAAGACAGGTATCAGCGCTCAAGAAAGATCTTTTACCGTTCAAGCATTGCTGGACAGCAAATCC

 GTGACGTAATGGCATTGGTATCTGGTAGCACITTTGCTTCTGTCCATAGTCGGCAGTTCCTTTCTAGAAAATGGCAAGTTCGTAACGACCTGTCGTTTAGG

3200

l h l p . a . t i v k r r q v s a l k k d l l p f k h c w t a n p
 h c i y r k h r p s . n e d r y q r r k i f y r s s i a g q q i r
 t a f t v s i d h r e c k t g i s a q e r s f t v q a l l d s k s

 v s c k g y a y v m t f r l c t d a s l f s r k g n l c q q v a f g
 c q m . r l c l g d h f s s l y . r e l f f k . r e l m a p c c i
 v a n v t l m s w r s v f v p i l e . s l d k v t . a n s s l l d

H	BHSSB	H	M	KH HTABH	AAF	EMD
G	SPCES	S	N	SI HNSBA	LLN	CBP
A	AAIRCA	P	L	PM AAUVE	UUU	ION
1	J2111J	2	1	1P 11113	M1H	511

///

//

//

GTGCCATCTGATTTTCAGCGTCCGGGGCACATTTTCCACTGATTCGAAAAAAGGAGGTGTCCTGAAAAGCGGGCCATACAGAAGCTGCTGTTCATC

 CACGGTAGACTAAAAGTCGCAGGCCCGGTGTA AAAAGGTGACTAACGCTTTTTCCTCCACAGGACTTTTCGGCCCGGTATGTCTTCGACGACAACCTAG

3300

c h l i f s v r g t f f h . l r k k e v s . k a r a i q k l l l i
 a i . f s a s g a h f s t d c e k r r c p e k r g p y r s c c . s
 / p s d f q r p g h i f p l i a k k g g v l k s a g h t e a a v d l

 h w r i k l t r p v n k w q n r f f s t d q f a r a m c f s s n i
 a m q n e a d p a c k e v s q s f l l h g s f r p g y l l q q d
 t g d s k . r g p c m k g s i a f f p p t r f l a p w v s a a t s

FIGUR 3K

HA	BXMD	EHAS	NCHN	A					
IL	IHBP	CGPC	LFPA	H	B	M	D	A	SHBM
NU	NOON	RAYR	ARAE	A	B	B	D	L	SGAS
31	1211	2111	4221	2	V	0	E	U	TINP
	/	/	/		2	2	1	1	1A22

TTGCTGAAGCTTGGCGATCTCCAGGAGCCGGCTCATTGTGAAATTATGAATGAAGACCGAAGCATGGCGAGAGTGCCCTGAGCTCATTGAAATTGCCAA

 AACGACTTCGAACGCCTAGAGGTCCTCGGCCGAGTAAACACTTTAATACTTACTTCTGCCTTGCTACCGCTCTCAGGACTCGAGTAACCTTAACGGCTT

3400

l l k l a d l q e p a s f v k l . m k t e r w r e c l s s l k l r k
 c . s l r i s r r r h l . n y e . r r n d g e s a . a h . n c e
 a e a c g s p g a g v i c e i m n e d g t m a r v p e l l e i a k

 k s f s a s r w a g a d n c f n h i f v s r h r s h r l e n f n r
 q q l k r i e l l r r . k h f . s h l r f s p s l a q a . q f q s
 r a s a q p d g p a p t m q s i i f s s p v i a l t g s s m s i a f

M SH	BMD	M	H	M	T	B	H	F
S FP	CBP	S	N	A	A	B	L	N
E AH	LON	E	F	E	Q	V	N	U
1 N1	111	1	1	3	1	1	2	H
	/	/						

AAAGCATCAATAAAAATGATCACCATTAAAGGATTTGATTCATACCGTTACAATCTGCAACACTTGTCCAGCGTGAAGTTGACATTACGCTGCCTACT

 TTTCCGTAGTAAATTTTACTAGTGGTAATTCCTAAACTAAGTTATGGCAATGTTAGACTGTTGTGAACAGCTCGCACTTCAACTGTAATGCCAGCGATGA

3500

s i n . k . s p l r i . f n t v t i . q h l s s v k l t l r c l l
 k a s i k n d h h . g f d s i p l q s d n t c r a . s . h y a a y .
 k h q l k m i t i k d l i q y r y n l e t l v e r e v d i t l p t

 f l m l . f h d g n l i q n l v t v i q c c k d l t f n v n r q r s
 f a d i l l s . w . p n s e i g n c d s l v q r a h l q c . a a .
 f c . n f i i v m l s k i . y r . l r v v s t s r s t s m v s g v

F M	M	NW	HCH
I S	N	SL	GFP
N E	L	PA	ERA
1 1	1	H3	222
		/	

GATTTTGGGACATTTAAGGTTTATGGATACACAAATGAGGTAGATGCAAAAGAGCATGTCCCATTTGTGATGGGAGATGTGCCGTTCCGAGAAGAACCCGG

 CTA AAAACCCGTGAAATTCCAAATACCTATGTGTTTACTCCATCTACCTTTTCTCGTACAGCGTAAACACTACCTCTACAGGCAAGCCCTCTTCTTGGCC

3600

i l g h l r f m d t q m r . m e k s m s h l . w e m c r s e k n r
 f w d i . g l w i h k . g r w k r a c r i c d g r c a v r r r t g
 d f g t f k v y g y t n e v d g k e h v a f v m g d v p f g e e p v

 i k p e k l n i s v c i l y i s f l m d c k h h s i h r e s f f r
 q n q s m . p k h i c l h p l h f l e h r m q s p l h a t r l l v p
 s k p v n l e . p y v f s t s p f s c t a n t i p s t g n p s s g

FIGUR 3L

M AA HNS	B	B M MA	H	B	RAA	F PNAF	FBTKHH	F
B VS PCC	S	S A AF	P	B	SVS	N VSLN	NBNSHI	N
O AU AIR	M	M E EL	H	V	RAU	U UPLU	UVAPAN	U
2 21 211	1	2 3 23	1	1	221	H 2B1H	H1111P	H
/ /		/			//	///	/	

TATTGGTCCGGGTGCATTGAGAATGTCTCACAGGTGACGTTGTTGGCTCTCATCGCTGTGATTGGGGACCGCAGCTGCACCCCGCGCTGAACCAAATTGC

3700

ATAACCAGGCCACGTAAGTCTTACAGAGTGTCCACTGCACAAACCGAGAGTAGCCACACTAAGCCCTGGCGTCCGCGTCCGGCCGACTTGGTTAAGG

y v s g c i q n v s q v t c l a l i a v f a d r s c t p r . t k l p
i g p g a f r m s h r . r v w l s s l . l r t a a a r r a e p n c
l v r v h s e e l t g d v f g s h r c d c g p q l h a a l n q i a
y q d p h m . f t e c t v h k a r m a t i a s r l q v g r q v l n
i p g p a n l t d . l h r t q s e d s h n r v a a a r r a a g f q
t n t r t c e s h r v p s t n p e . r q s q p g c s c a a s f w i a

H00S88	HN	R	HH	M	MS	M	HA	HA
ASSESS	GS	S	I	H	SF	S	IL	IL
EAACAA	IP	A	NA	L	EA	E	NU	NU
3111JJ	A2	1	P1	1	IN	1	31	31
////	/							

CGCAGAAGCCCGTGGAGTGGTGGTACTTGGCCCAAGGAGGACCGGATCCGTTAATCAATAAATTAAGCTTATAAGCTTCAGGAACAAGGCTAT

3800

GGGTCTTCCGGCACCTCAGGAGCATGAAGCGGTTCTTCTGCTCCGTAGCCAAATTAGTTATTAATTTTGAATATTCCAAGTCCGTTGTTCCGATA

q k a v e c s c t c a k k d e a s v . s i n . k l i s f r n k a m
r r r p w s a p v l a p r r r t r h r f n q . i k s l . a s g t r l .
a e g r g v l l y l r q e g r g i g l i n k l k a y k l q e q g y
g c f a t s h e q v q a l f s s a d t . d i f . f s i l k l f l a i
r l l g h l a g t s a g l l v l c r n l . y i l l k y a e p v l s
a s p r p t s r y k r w s p r p m p k i l l n f a . l s . s c p .

H	B	HH	H	M	HBXND	SHM	T	BSB	BHM	H
H	G	I	HA	N	B	PIHBP	H	SES	SPM	I
L	L	MAE	F	O	ANCOO	AIP	A	ACA	PAL	N
1	1	P12	1	2	21211	NA2	1	J1J	221	3
					/					

GACACCGTAGAAGCCAATGAGCGGCTTGGATTCTTGGCGGATCTTCCCAACTATGGCATCGGAGCACAAATTTAGCCGACCTCGGTGTCGGGAATATGA

3900

CTGTGGCATCTTCCGTTACTCCGGCAACCTAAGAAGCGCTAGAGCGTTGATACCGTAGCCTCGTGTAAATGCGGTGGAGCCACAGGCCTTATACT

c p . k p m r r l d s c r i f a t m a s e h k f y a t s v s g i .
h r r s q . g a w i l a g s s q l w h r s t n f t r p r c p e y e
d t v e a n e a t g f l p d l r n y g i g a q i l r d l g v r n m k
v g y f g i l r k s e q r i k a v i a d s c l n . a v e t d p i h
h c r l l w h p a q i r a p d e c s h c r l v f k v r g r h g s y s
s v t s a l s a s p n k g s r r l . p m p a e i k r s r p t r f i

FIGUR 3M

MD	N	A	NE AS HH	B	F	S	S
BD	L	C	LC PC IH	B	N	Q	F
OE	A	C	AR YR NA	V	U	O	A
21	3	1	42 11 P 1	1	H	I	N

GCTCAGACATGGCGTAGACACAAATGACATTGATGTGGCTTGGGTTCCAGGGCCATTGAAATACCGTTTGTGCGAAAAAATGGCGGAAACAAAAA

 CGAGTCTGTACCGCATCTGTGTTACTGTAACACACCCGAACCCAAAGGTCGGCGTAAACTTTATGGCAACGACCGCTTTTTTACCGCCTTTGTTTTT 430

a q t w r r h k . h . c g l g s r r i . n t v c c e k n g g n k k i
 l r h g v d t n d i d v a w v p g a f e i p f a a k k m a e t k k
 s d m a . t q m t l m w l g f q a h l k y r l l r k k w r k q k n

 a . v h r l c l h c q h p k p e l r m q f v t q q s f f p p f l f
 s l c p t s v f s m s t a q t g p a n s i g n a a f f i a s v f f
 q e s m a y v c i v n i h s p n w a c k f y r k s r f f h r f c f f

NM	HN	E	B	AF	THH S F
SN	IH	C	B	LN	HIN F N
PL	NA	O	V	UU	ANA A U
21	P 1	D	1	1H	1P1 N H

TATGATGCTATTATCACATTGGGCACTGTGCATCAGAGGCCAAGCACACATTACGATTATGCTGCAATGAAGCTGCAAAAAGGCATCGCGCAAGCAGCAA

 ATACTACGATAATAGTAAACCCGTGACAGTAGTCTCCGCGTTGCTGTGTAATGCTAATACAGACGTTACTTCGACGTTTTCCGTAGCGCGTTCGTCGTT 4400

. c y y h i g h c h q r r n d t l r l c l q . s c k r h r a s s k
 y d a i i t l g t v i r g a t t h y d y v c n e a a k g i a q a a n
 m m l l s h w a l s s e a q r h i t i m s a m k l q k a s r k q q

 i h h . . . m p c q . . l r l s v n r n h r c h l q l l c r a l l l .
 y s a i i v n p v t m l p a v v c . s . t q l s a a f p m a c a a
 i i s n d c q a s d d s a c r c m v i i d a i f s c f a d r l c c

B	R	M	T	T	CHN
B	S	A	A	A	FPA
V	A	E	Q	Q	RAE
1	1	3	1	1	221

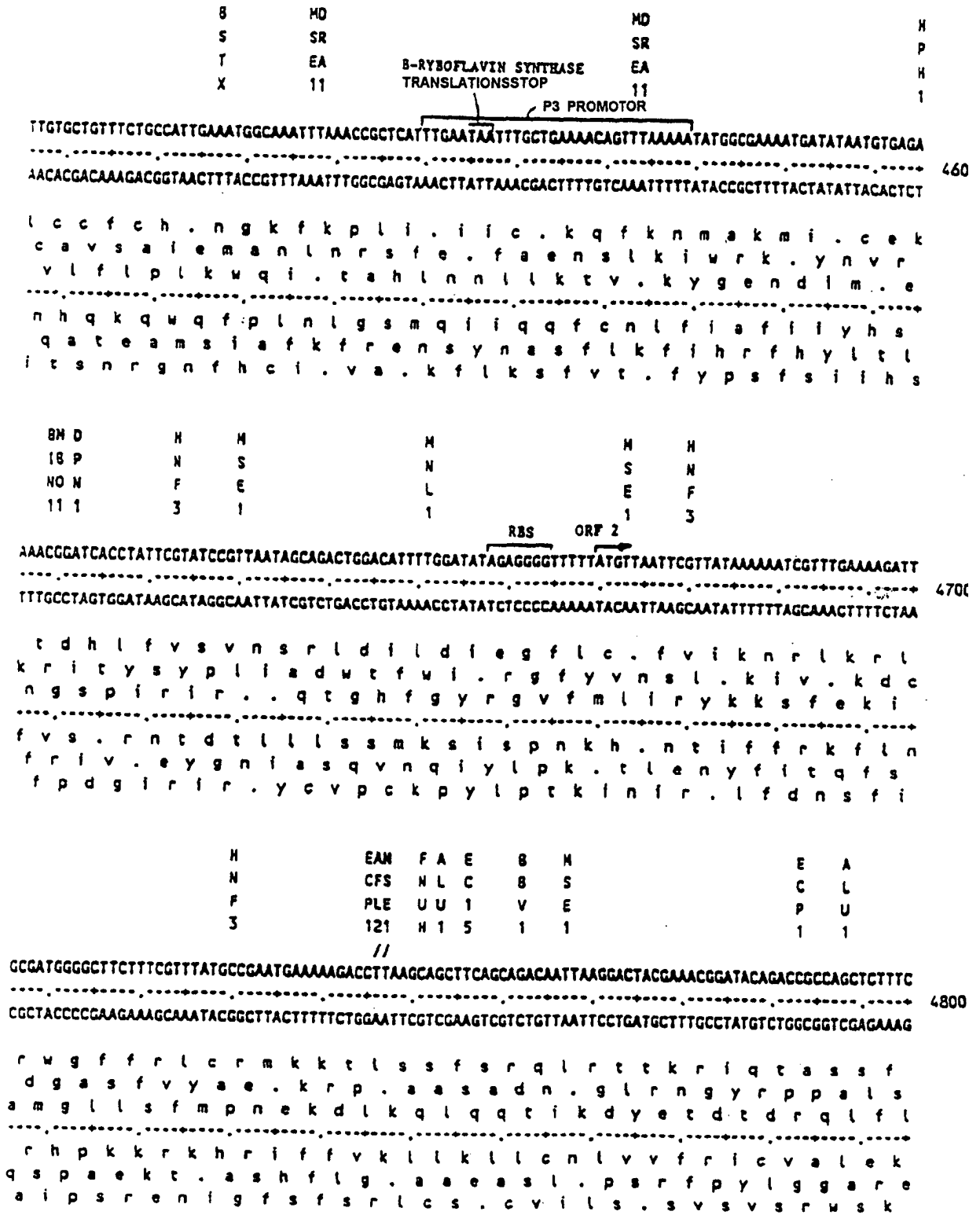
ACACTACTGGTGTACCTGTCATCTTTGGAATTGTAACAACCTGAAACATCGAACAGGCTATCGAGCGTGCCGGCACAAAAGCGGCAACAAAGGTGTAGA

 TGTGATGACCACATGGACAGTAGAAACCTTAACATTGTTGACTTTGTAGCTTGTCCGATAGCTCGCACGCCCGTGTTCGCCCCGTGTTTCCACATCT 4500

h y w c t c h l w n c n n . k h r t g y r a c r h k s g q q r c r
 c t g v p v i f g i v t c e n i e q a i e r a g t k a g n k g v d
 c l l v y l s l e l . q l k t s n r l s s v p a q k r a t k v . i

 c . q h v q . r q f q l l q f c r v p . r a h r c l l p c c l h l
 f v v p t g t m k p i t v v s f m s c a i s r a p v f a p l l p e s
 v s s t y r d d k s n y c s f v d f l s d l t g a c f r a v f t y

FIGUR 30



FIGUR 3P

M	M	E	H	T	P	M	H	D	X	M	D	H
N	N	C	N	A	L	N	M	D	H	B	P	I
L	L	R	F	Q	E	L	F	E	O	O	N	A
1	1	V	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1

TTTGCAAAGAGGACGAGGATATCGTCCGAGCAATCGGAGTCGAAAAAAGGATTCTGAGGTTGAGATCCGGCATATCAGTGTGAATCCTTCTCATCGCCA
 AAACCTTCTCCTGCTCTATAGCAGCCTCGTTAGCCTCAGCTTTTTCTTAAGACTCCAACCTAGGCGGTATAGTCACACTTAGGAAGAGTAGCGGT

f g k r r i s s e q s e s k k r i l r l r s g i s v . i l l i a l
 l e r g r g y r r s n r s r k k g f . g . d p a y q c e s f s s p
 w k e d e d i v g a i g v e k k d s e v e i r h i s v n p s h r h
 k p f l v l i d d s c d s d f f l i r l n l d p m d t h i r r m a
 k s l p r p y r r l l r l r f f p n q p q s g a y . h s d k e d g
 r q f s s s s i t p a i p e s f f s e s t s i r c i l t f g e . r w

M	S	MD	F	SR	N	M	A	AT	M
N	F	SR	O	CS	L	S	L	SA	A
F	A	EA	K	AA	A	E	U	UG	E
1	N	11	1	11	4	1	1	21	2

TCAAGGAATCGGAAAACAGATGATGGATGCTTTAAAGCATTATTCAAACCGCAAGTACTGGTTCCAAATGAATTAACCGAGAGCTTTTTCGAACGTTGT
 AGTTCCTTAGCCTTTGTCTACTACCTACGAAATTCGTAATAAGTTTTGCGTTCATGACCAAGGTTTACTTAATTGCGTCTCGAAAAAGCTTGCAACA

k e s e n r . w m l . s i y s k r k y w f q m n . r r a f s n v v
 s r n r k t d d g c f k a f i q n a s t g s k . i n a e l f r t l s
 q g i g k q m m d a l k h l f k t q v l v p n e l t q s f f e r c
 m l s d s f l h h i s . l m . e f r l y q n w i f . r l a k e f t t
 d l f r f v s s p h k l a n i . f a l v p e l h i l a s s k r v n
 . p i p f c i i s a k f c k n l v c t s t g f s n v c l k k s r q

E	BM D	HM	A	BM D	A B E	MB
C	IB P	NS	L	CBP	L S C	AS
1	NO M	LE	W	LOW	W M O	EA
5	11 1	ORF 2 TRANSLATIONS STOP	11	N 111	N 2 B RHO- UNABHÄNGIGER TRANSCRIPTIONS TERMINATOR	21

CAAGGTCAGCAGGATCAAGACATTTATACAATAATTAAGCAGAGGCTGTGATCAGTCTCTGCTTTTTTTCTGCGTCTATTCTTTTTTACGTTCCAGG
 GTTCCAGTCGCTAGTCTGTAAAGTATGTTATTAATTCGTCTCCGACACTAGTCAGAGACGAAAAAAGACGCAAGATAAAGAAAAAGTGCAAGTGC

k v s r i k t f h t i i k q r l . s v s a f f s a f y f f f e f t
 r s a g s r h f i q . l s r g c d q s l l f f l r s i s f s r s r
 q g q q d q d i s y n n . a e a v i s l c f f f c v l f l f h v h g
 l t l l i l l v n . v i l l c l s h d t e a k k e a n . k k k v n v
 d l d a p d l c k m c y n l l p q s . d r s k k r r e i e k e r e r
 . p . c s . s m e y l l . a s a t i l r q k k k k q t r n r k . t .

FIGUR 3Q

AM A	FMD B		S T		DB A	HN	F	SNA		B	THH
HA A	OB P I		P A		OB P	GS	N	NLC		S	ABN
AE T	KON N		O O		EV L	IP	U	AAC		H	QOF
22 2	111 1		1 1		11 1	A2	H	131		1	113

GATGACGTCAGTCCGATCCCGCAAACGGTGTGTGCGATAAGAAATATGTTGCTGAGTGCACCTGGGGCTGCCCCCATGTATACTTTTTTTCCTGCATTCC
 CTACTGCAGTCAGGCTAGGGCGTTTGGCCACAAACAGCTATTCTTTATACAACGACTCAGGTGACCCGACGGGGGTACATATGAAAAAAAAGGACGTAAGC

5200

d d v s p i p q t v f v d k k y v a e c t g l p p c i l f f p a f d
 m t s v r s r k r c l s i r n m l l s a l g c p h v y f f l h s
 . r q s d p a n g v e r . e i c c . v h w a a p m y t f f s c i r
 s s t l g i g c v t n t s l f y t a s h v p s g g h i s k k g a n
 i v d t r d r l r h k d i l f i n s l a s p q g w t y k k k r c e
 p h r . d s g a f p t q r y s i h q q t c q a a g m y v k k e q m r

OB	SNM	3	M		B	ST	T
PI	PSL	S	N		S	PA	A
YN	HPA	R	L		M	OO	O
1 1	1H3	:	1		2	11	1

ATCCTGCATGCTTCTCCAGTTTCTCATCTTTGATTGGCAGTATAATGCTTTTATAGGCAGACGGTTTCCATTGTTTCGTAACCATTGCATAAGTT
 TAGGACGTACGAAGGAGGTCAAAGAGTAGAACTAACCGTCATATTACGAAAATATCCGTCTCTGCCAAAGCTAAACAAGCATTGGCTAACGTATTCAA

5300

p a c f l q f l i f d w q y n a f i g r d g f d l f v n r l h k f
 i l h a s s s f s s l i g s i m l l . a e t v s i c s . t d c i s s
 s c m l p p v s h l . l a v . c f y r q r r f r f v r k p i a . v
 s g a h k r w n r m k s q c y l a k i p l s p k s k n t f r n c l n
 i r c a e e l k e d k i p l i i s k y a a v t e i q e y v s q m l
 d q m s g g t e . r q n a t y h k . l c l r n r n t r l g i a y t

GCH	BNMO	H D	TB	NSH	S H	BH	M	F	BSBNSH
DFA	CLBP	B D	AB	CCP	F N	SP	B	O	SESCCP
IRE	LAON	O E	OV	IRA	A F	PA	O	K	ACAIRA
213	1311	2 1	12	112	N 1	22	2	1	J1J112

CGAGCAAACGGCCATGATCAAGCCCTAAGTCTTCGACTGCCCGGTGTCTGCTTGAAGAATCCGGATGCTGTTGCCCATCAGTCTTTTTGCCCGGGTGT
 GCTCGTTTGCCGGTACTAGTTCGGGATTCAGAAAGTACGGGGCCACAAGACGAAGTCTTAGGCCTACGACAAGCGGTAGTCAGAAAAACGGGGCCGACA

5400

e q t a m i k p . v f d e p v f c l k n p d a v r h q s f c p g c
 s k r p . s s p k s s t a r c s a . r i r m l f a i s l f a p a v
 r a n g h d q a l s l r l p g v l l e e s g c c s p s v f l p r l y
 s c v a m i l g . t k s q g t n q k f f g s a t r w . d k q g p q
 e l l r g h d l g l d e v a r h e a q l i r f s n a m l r k a g a t
 r a f p w s . a r l r r s g p t r s s s d p h q e g d t k k g r s

FIGUR 3R

A
L
U
1

M 3XMD M S
8 IHBP B S
0 NOON O P
2 1211 2 1

ATTCTGCCTTCTGTGATGATATAAAGCCACTGCAAGCTGAATAAAGCCACCCAATAGCGTTTTCGTTTCTTTGGCGGATCTTCCTTCCAATATTCTTCT
.....
TAAGACGGGAAGACACTACTATATTTCCGGTCACGTTCCACTTATTTCCGGTGGGTTATCGCAAAGCAAAGAAACCGCCTAGAAGGAAGGTTATAAGAAGA

550

ilpsvmi.shcklnkahnpiatfslwrlflpiff.
fcll.ykatas.ikptq.rfrffggsfqs
safcd dikplqae.sppnsvfvladlpsnill
irgetiilylwqlsflawgianenrqrirkrgink
nqrrhhylavalqifgvwyrkrkkppdekwyee
yeakkqssi fgs casylggl ltktekasrgelirr

S NB
S LS HA
P AM IL
1 31 A NU
3 31

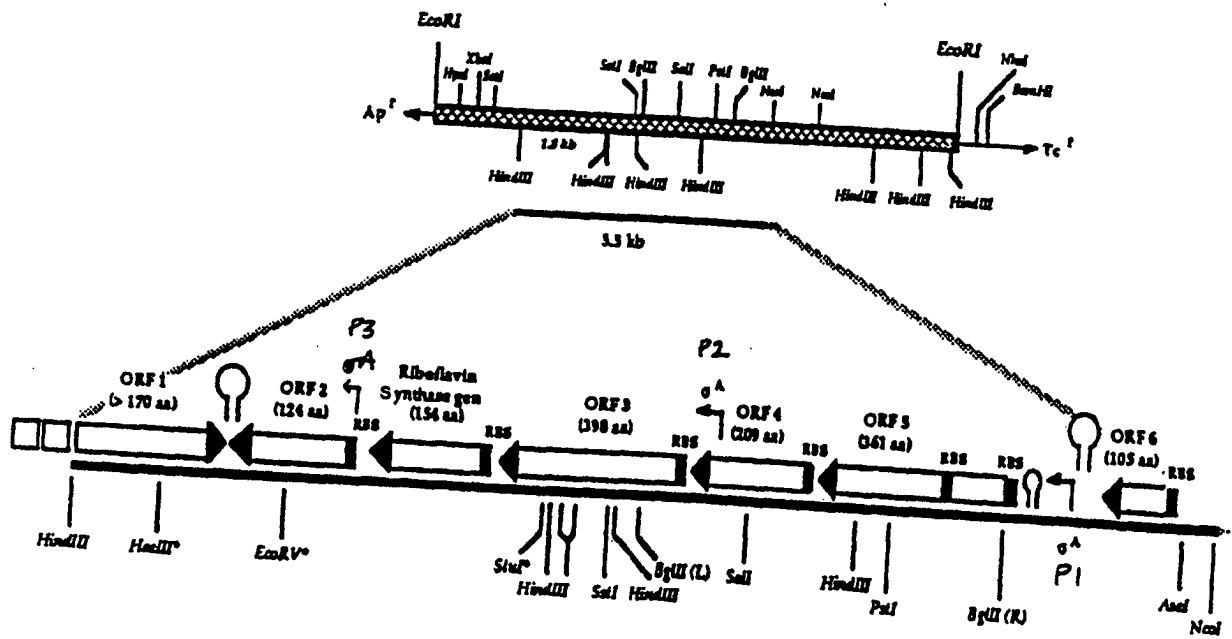
AATATTTTCATGGCATTCAAATAATCCCGTGTGGCATGAAACTCAACGAGATAATCTATATAAGCTT
.....
TTATAAAGTACCGTAAGTTTTATTAGGGCACAGCGTACTTTGAGTTGCTCTATTAGATATATTGCAA

5567

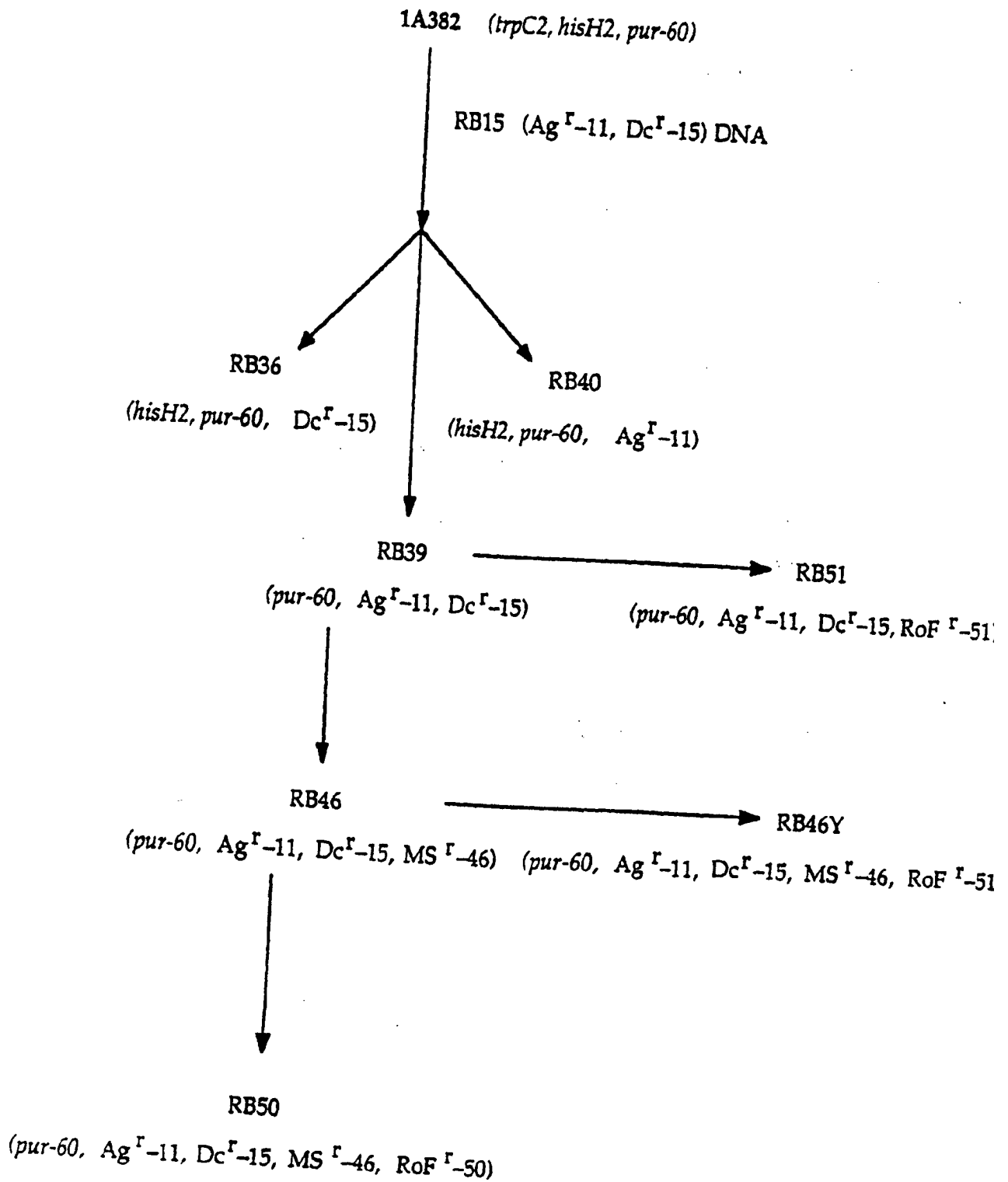
yfmakkipcrmklnaiiyisf
niswhsk.srva.nstr.sias
ifhgiqnnpvshetqrdnlykl
.....
ykmanliighrmfslsli.flk
liehcefydrtahfevlydiyaq
in.pm.flgtdcsv.rstrylsa

FIGUR 3S

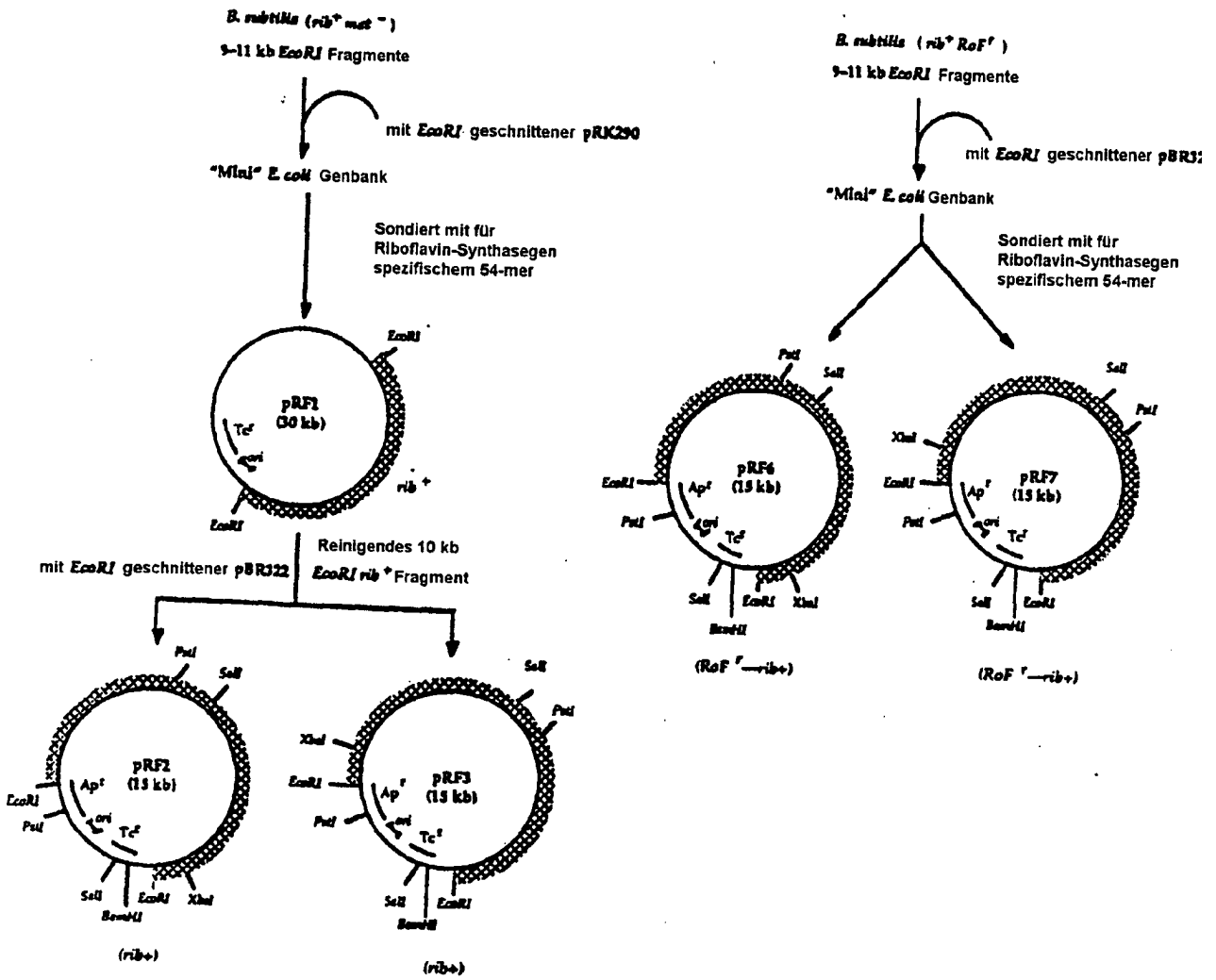
FIGUR 4.



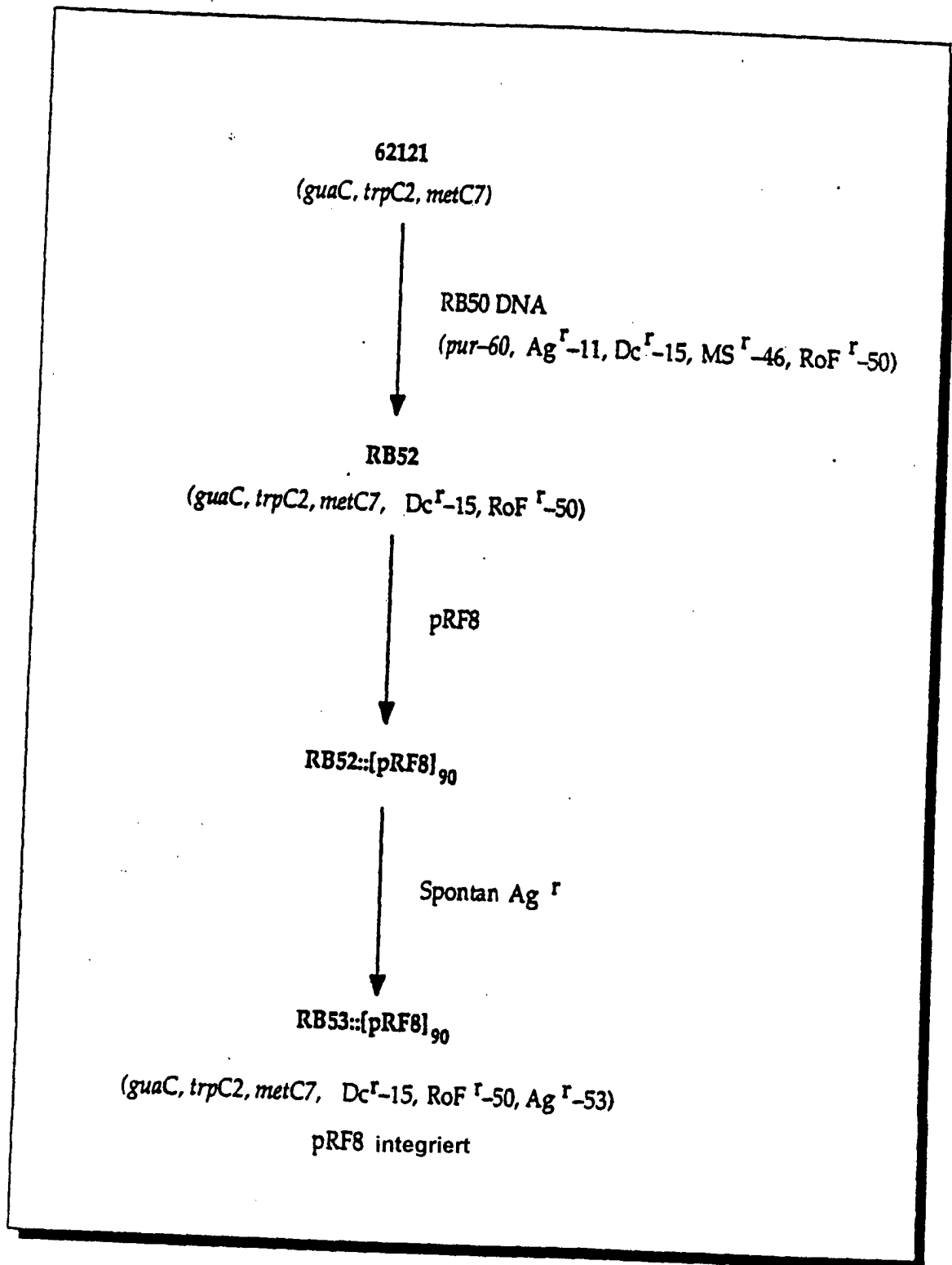
FIGUR 5.



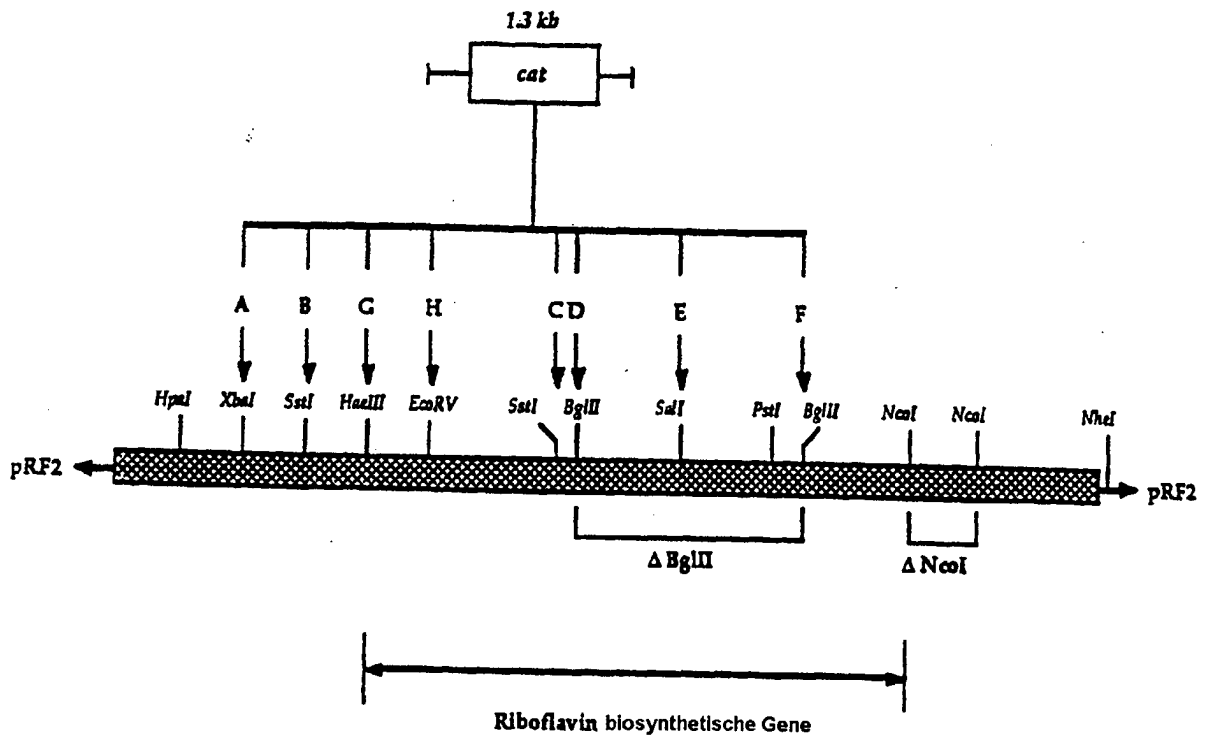
FIGUR 6.



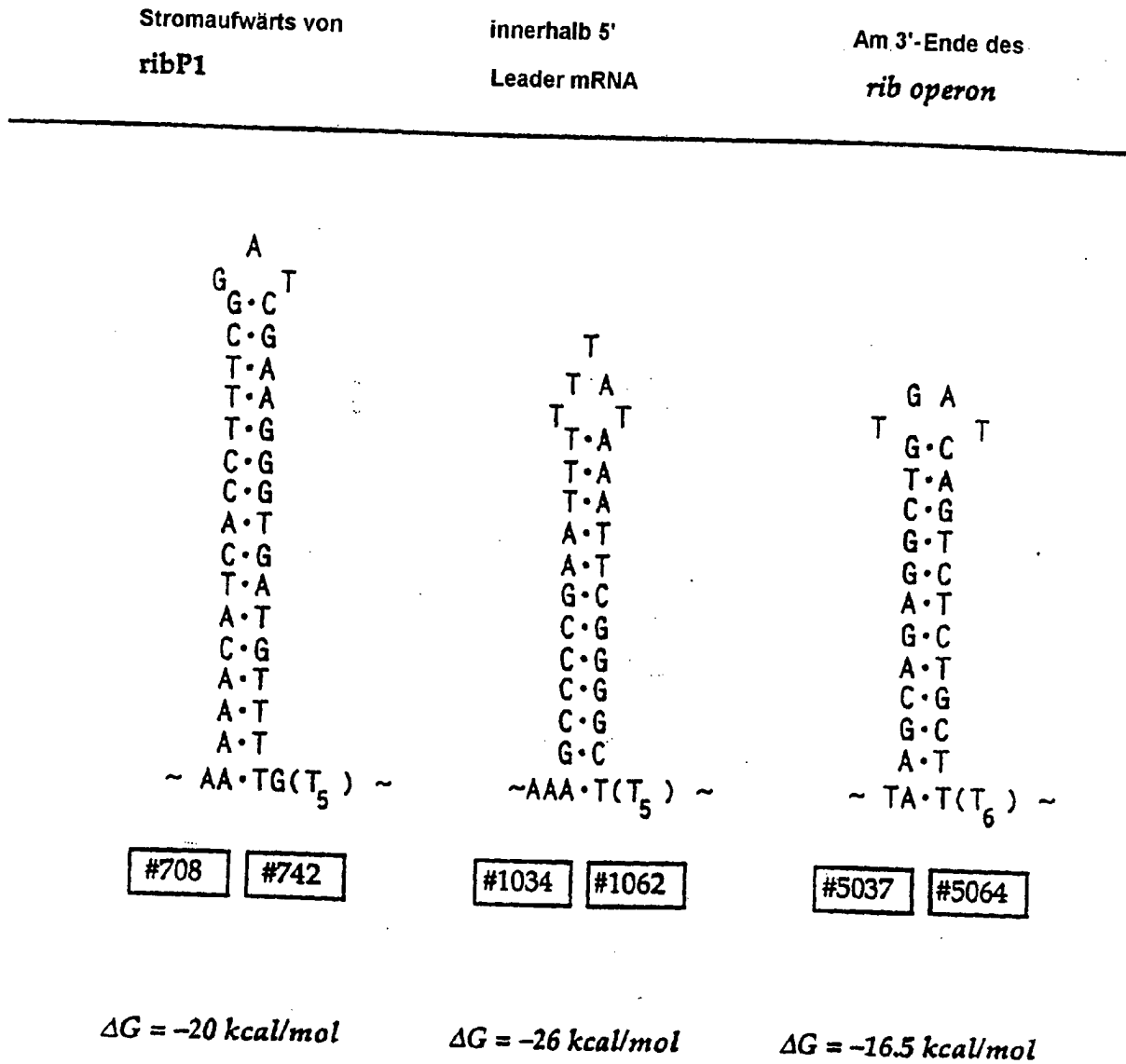
FIGUR 7.



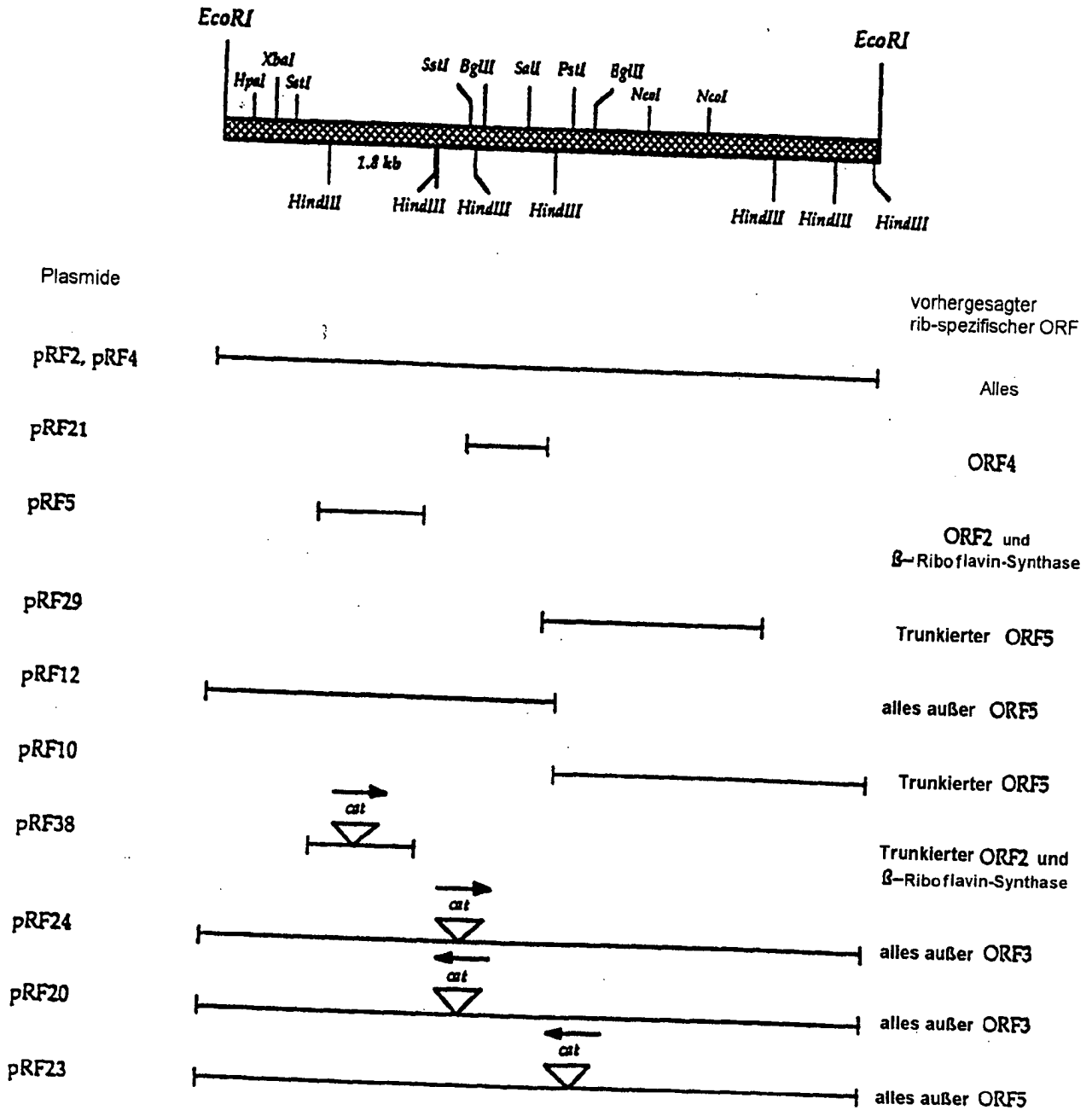
FIGUR 8.



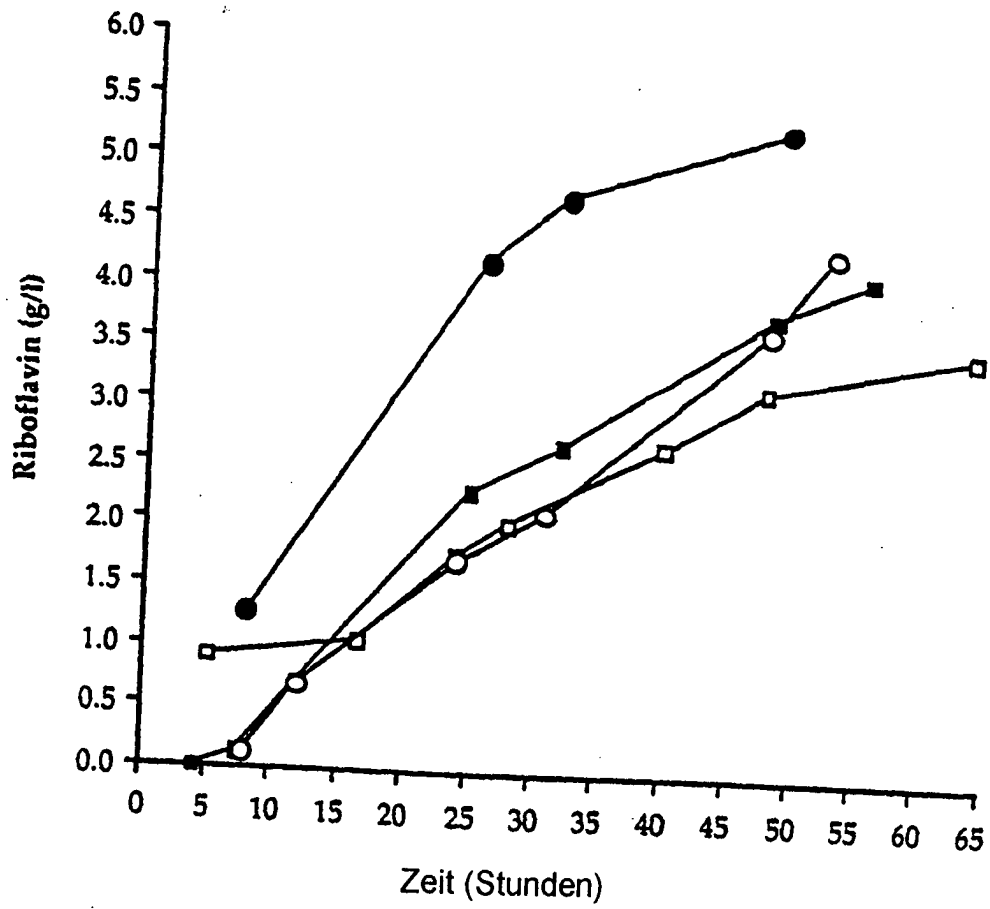
FIGUR 9.



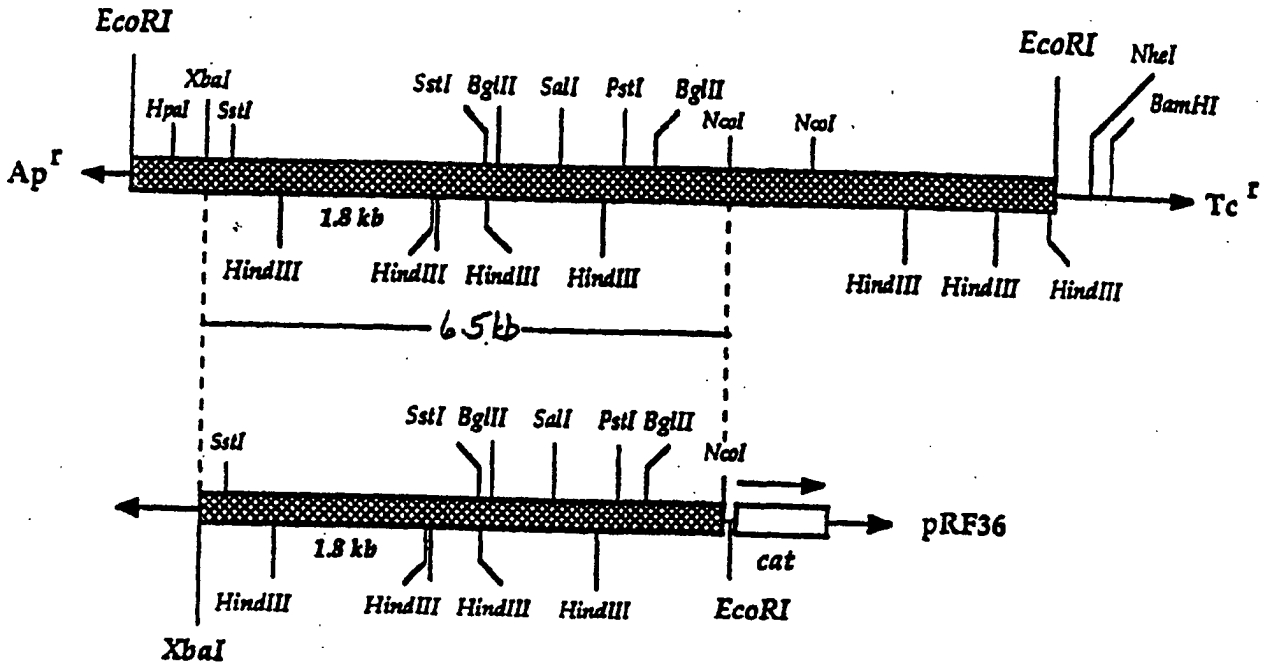
FIGUR 10.



FIGUR 11.



FIGUR 12.



Isoliere *XbaI-EcoRI* Fragmente

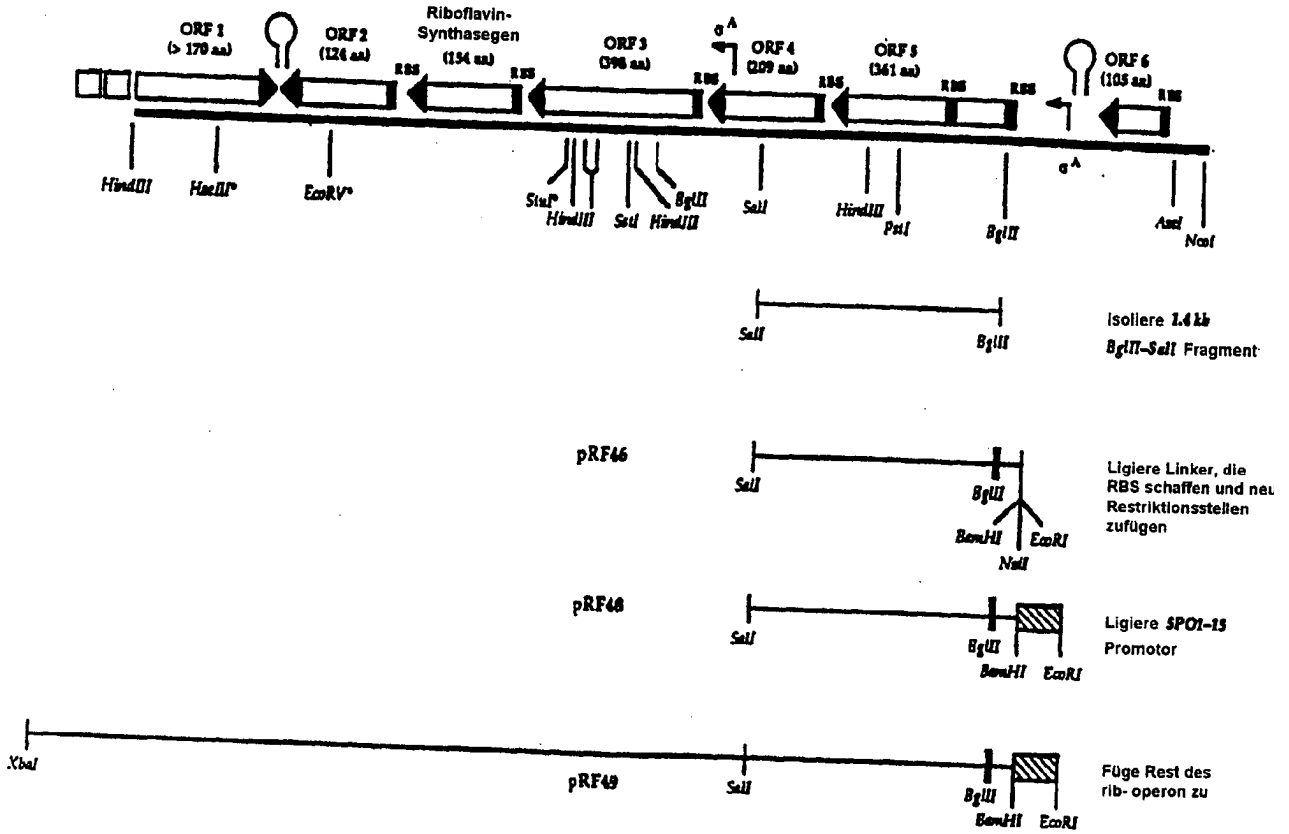
Ligiere mit pUC19

pRF39

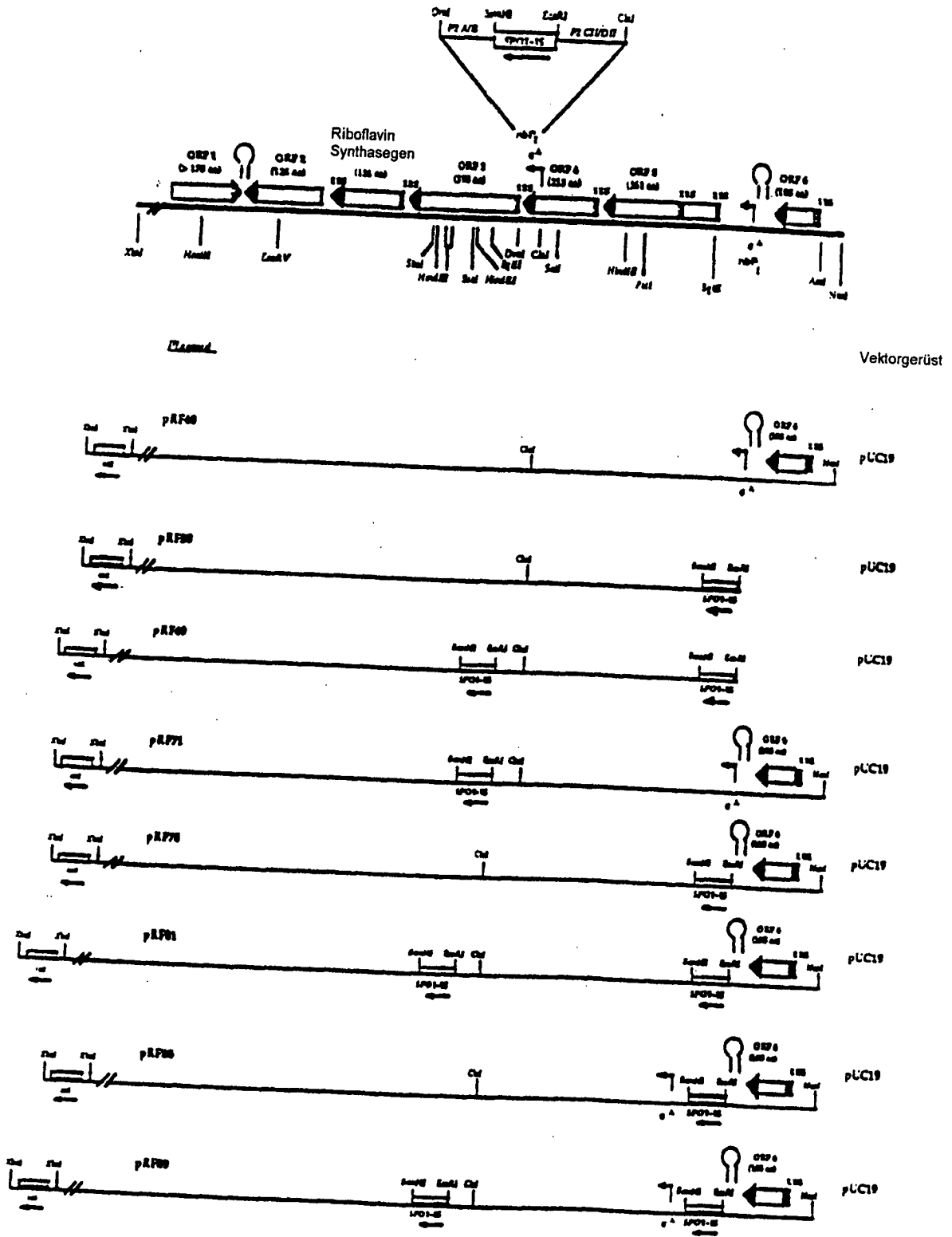
Füge *cat* - Gen am *EcoRI* - Ort an

pRF40

FIGUR 13.



FIGUR 14.



FIGUR 15.

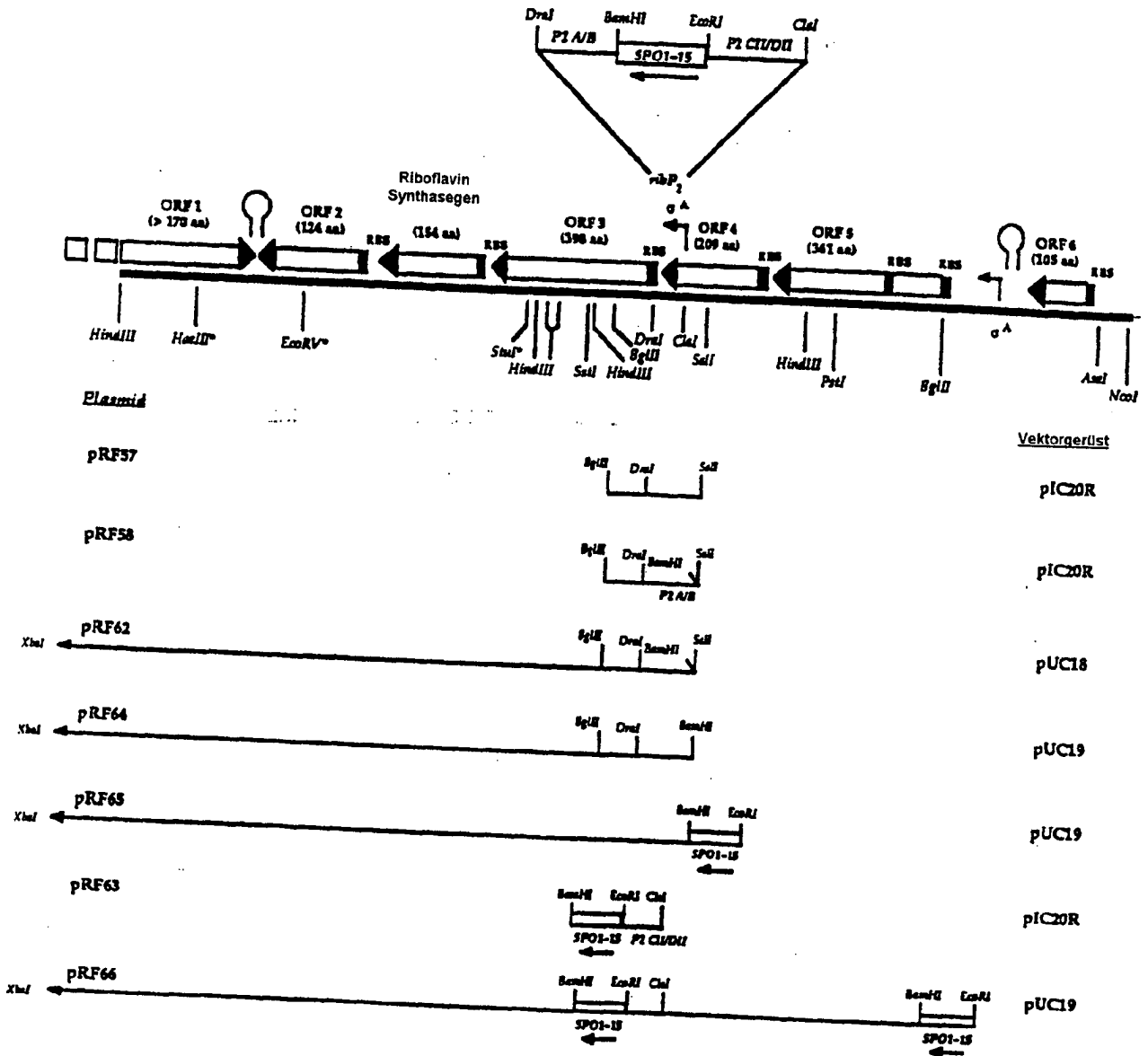


FIG. 16

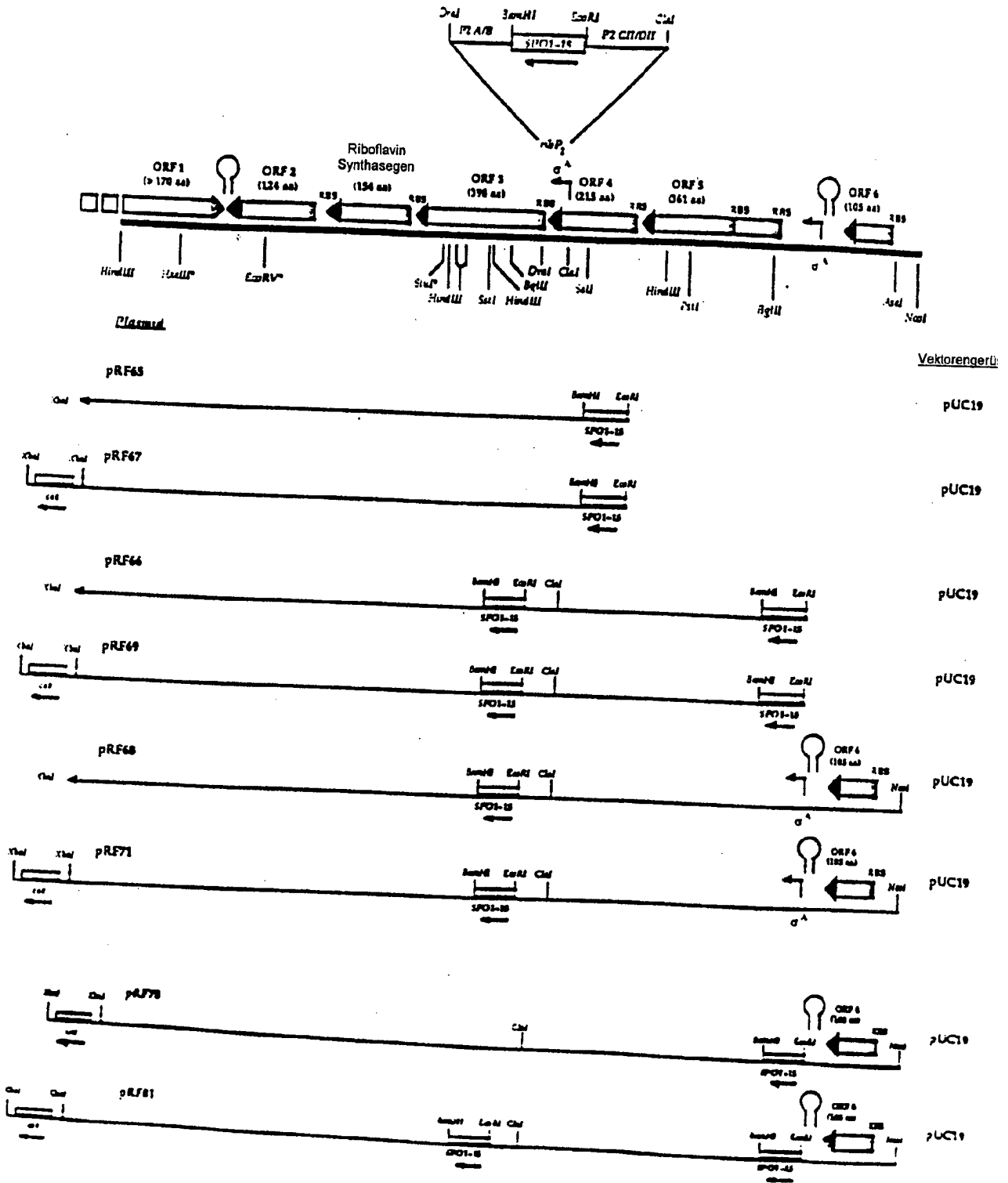
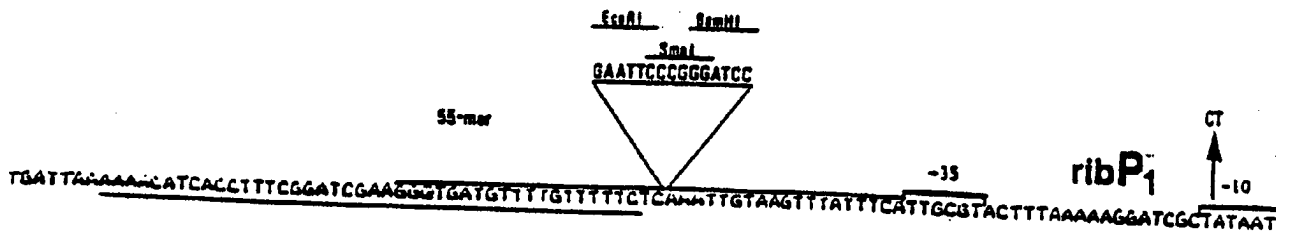


FIG. 17



FIGUR 18

RB-5

AATTCATGCATGGATCCGACGGTAAATAAC
AAAAGAGGGGAGGGAAACAAATGGAAGAGT
ATTATATGAAGCTGGCCTTA

RB-6

GATCTAAGGCCAGCTTCATATAATACTCTT
CCATTTGTTTCCCTCCCCTCTTTTGTTATT
TACCGTCGGATCCATGCATG

P2-A

TCGACGGATCCTTTTAGAGAGGAAGATTG
CATGTTTCATCCGATAGAAGAAGCACTGGA
CGCTTT

P2-B

AAAGCGTCCAGTGCTTCTTCTATCGGATGA
AACATGCAAATCTTCCTCTCTAAAAGGATC
CG

P2-CII

CGATTTTTGCATAAAGCCAATGAAAATAAG
ACCCAACAAACCATTACAAAAGCCTTCTTA
AGCGAAAACGGCTTTTAG

P2-DII

AATTCTAAAAGCCGTTTTCGCTTAAGAAGG
CTTTTGTAATGGTTTGTTGGGTCTTATTTT
CATTGGCTTTATGCAAAAAT