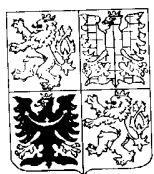


# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 29.06.1999

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 29.06.1998

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1998/9814006

(33) Země priority: GB

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 15.08.2001  
(Věstník č. 8/2001)

(86) PCT číslo: PCT/GB99/02044

(87) PCT číslo zveřejnění: WO00/00618

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4912

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

C 12 N 15/52

C 12 N 15/62

C 12 N 9/10

C 12 P 17/06

C 12 P 19/62

C 07 K 19/00

(71) Přihlašovatel:

BIOTICA TECHNOLOGY LIMITED, Cambridge, GB;

(72) Původce:

Leadlay Peter Francis, Cambridge, GB;

Staunton James, Cambridge, GB;

Cortes Jesus, Cambridge, GB;

McArthur Hamish Alastair Irvine, Gales Ferry, CT, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

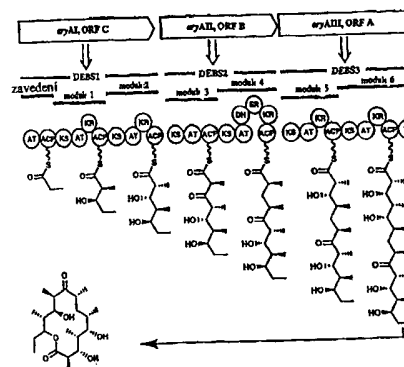
(54) Název přihlášky vynálezu:

**Polyketidy a jejich syntéza**

(57) Anotace:

Polyketid synthasa ("PKS") typu I je komplexní multienzym obsahující zaváděcí doménu navázanou na více prodlužovacích domén. První prodlužovací modul dostává acylovou počáteční jednotku od zaváděcí domény a každý prodlužovací modul přidává další ketidovou jednotku, která může být upravena (například redukcí). KSq doména, obsažená v některých PKS, má dekarboxylační aktivitu, například vytváří (substituované) acylové skupiny ze (substituovaných) malonylových skupin. CLF doména PKS typu II má podobnou aktivitu. Vložením zaváděcích modulů obsahujících takové domény do PKS běžně neobsahujících tyto domény je možné řídit použití počátečních jednotek.

Erythromycinová PKS



## Polyketidy a jejich syntéza

### Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobů a materiálů (včetně enzymových systémů, nukleových kyselin, vektorů a kultur) pro přípravu nových polyketidů, zejména makrolidů s 12-, 14- a 16-členným kruhem, rekombinantní syntézou a takto připravených nových polyketidů. Geny pro biosyntézu polyketidů nebo jejich části, které mohou být odvozeny z různých genových seskupení pro biosyntézu polyketidů, jsou upraveny tak, aby umožnily produkci specifických nových polyketidů, jako jsou 12-, 14- a 16-členné makrolidy předem definované struktury. Předkládaný vynález je zejména zaměřen na nahrazení genetického materiálu kódujícího přirozenou počáteční jednotku jinými geny pro přípravu makrolidů obsahujících přednostně acetatovou počáteční jednotku; nebo přednostně propionatovou jednotku; nebo přednostně neobvyklou počáteční jednotku; za minimalizace tvorby vedlejších produktů obsahujících jinou počáteční jednotku.

### Dosavadní stav techniky

Polyketidy jsou rozsáhlou a strukturálně diversifikovanou třídou přirozených sloučenin, do které patří mnoho sloučenin majících antibiotické nebo jiné farmakologické vlastnosti, jako je erythromycin, tetracykliny, rapamycin, avermectin, monensin, epothilony a FK506. Přesněji, polyketidy jsou hojně produkovány bakteriemi *Streptomyces* a jinými aktinomycetami. Jsou syntetizovány opakovanou postupnou kondenzací acylthioesterů způsobem podobným syntéze mastných kyselin. Větší strukturální diverzita existující mezi přirozenými polyketidy vzniká v důsledku výběru (obvykle) acetatu nebo propionatu jako počátečních nebo "prodlužovacích" jednotek; a

z různého stupně zpracování  $\beta$ -skupiny probíhajícího po každé kondenzaci. Příklady stupňů zpracování zahrnují redukci na  $\beta$ -hydroxyacyl-, redukci následovanou dehydratací na 2-enoyl-, a úplnou redukci na nasycený acylthioester. Stereochemický důsledek těchto stupňů zpracování je také specifický pro každý cyklus prodloužení řetězce.

Biosyntéza polyketidů je zahájena skupinou enzymů vytvářejících řetězec známých jako polyketid-synthasy. U aktinomycet byly popsány dvě třídy polyketid-synthas (PKS). Jedna třída, označovaná jako PKS typu I, představovaná PKS pro makrolidy erythromycin, oleandomycin, avermectin a rapamycin, se skládá z různé sady nebo "modulu" enzymů pro každý cyklus prodloužení řetězce polyketidu. Pro příklad viz obr. 1 (Cortés, J. et al., Nature (1990) 348: 176-178; Donadio, S. et al., Science (1991) 2523: 675-679; Swan, D.G. et al., Mol. Gen. Genet. (1994) 242: 358-362; MacNeil, D.J. et al., Gene (1992) 115: 119-125; Schwecke, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92: 7839-7843).

Termín "prodlužovací modul", jak je zde použit, označuje sadu sousedících domén, od domény  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthasy ("AKS") do další proteinové domény acylového nosiče ("ACP") domény, která provádí jeden cyklus prodloužení polyketidového řetězce. Termín "zaváděcí modul" označuje jakoukoliv skupinu sousedících domén, která provádí zavedení počáteční jednotky na PKS a tak způsobuje její dostupnost pro KS doménu prvního prodlužovacího modulu. Délka tvořeného polyketidu byla pozměněna, v případě biosyntézy erythromycinu, specifickým přesunem enzymové domény PKS produkující erythromycin, která obsahuje řetězec mající thioesterasovou/cyklasovou aktivitu, pomocí technik genového inženýrství (Cortés et al. Science

(1995) 268:1487-1489; Kao, C.M. et al. J. Am. Chem. Soc. (1995) 117:9105-9106).

Bylo popsáno, že delece DNA kódující část ketoreduktasové domény v modulu 5 PKS produkující erythromycin (též známé jako 6-deoxyerythronolid B synthasa, DEBS) provedená ve čtecím rámci vede ke tvorbě erythromycinových analogů 5,6-dideoxy-3- $\alpha$ -mycarosyl-5-oxoerythronolidu, 5,6-dideoxy-5-oxoerythronolidu B a 5,6-dideoxy,6 $\beta$ -epoxy-5-oxoerythronolidu B (Donadio, S. et al. Science (1991: 252:675-679). Podobně, alterace aktivních zbytků v enoylreduktasové doméně modulu 4 v DEBS, pomocí genetického upravení příslušné DNA kódující PKS a jejího vložení do *Saccharopolyspora erythraea*, vede k produkci 6,7-anhydroerythromycinu C (Donadio, S. et al. Proc Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:7119-7123) .

Mezinárodní patentová přihláška č. WO 93/13663 popisuje další typy genetických úprav DEBS genů, které vedou k produkci pozměněných polyketidů. Nicméně, mnoho z těchto pokusů se ukázalo jako neproduktivní (Hutchinson, C. R. and Fujii, I., Annu. Rev. Microbiol. (1995), 49: 201-238, na str. 231). Byla popsána kompletní DNA sekvence genů ze *Streptomyces hygroscopicus* kódující modulární typ I PKS řídící syntézu makrocyklického imunosupresivního polyketidu rapamycinu (Schwecke, T. et al., (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7839-7843). DNA sekvence je uložena v EMBL/Genbank Database pod přírůstkovým číslem X86780.

Druhá třída PKS, označovaná jako PKS typu II, je představována synthasami pro aromatické sloučeniny. PKS typu II obsahují pouze jednu sadu enzymatických aktivit pro prodloužení řetězce a tyto jsou znovu využívány podle potřeby v opakovaných cyklech (Bibb, M. J. et al. EMBO J. (1989)

8:2727-2736; Sherman, D. H. et al. EMBO J. (1989) 8:2717-2725; Fernandez-Moreno, M.A. et al. J. Biol. Chem. (1992) 267:19278-19290). "Prodlužovací" jednotky pro PKS typu II jsou obvykle acetátové jednotky a přítomnost specifických cykláz určuje přednostní dráhu pro cyklizaci dokončeného řetězce na aromatickou sloučeninu (Hutchinson, C. R. and Fujii, I. Annu. Rev. Microbiol. (1995) 49:201-238). Hybridní polyketidy byly získány vložением klonů DNA obsahujících gen pro PKS II. typu do jiného kmene obsahujícího jiné genové seskupení PKS typu II, například vložением DNA odvozené od genového seskupení pro actinorhodin, modře pigmentovaný polyketid ze *Streptomyces coelicolor*, do anthrachinonový polyketid-produkujícího kmene *Streptomyces galileus* (Bartel, P. L. et al. J. Bacteriol. (1990), 172: 4816-4826).

Minimální počet domén nutných pro prodloužení řetězce na PKS II. typu, při její expresi v *Streptomyces coelicolor* hostitelské buňce ("minimální PKS") byl definován například v Mezinárodní patentové přihlášce č. WO 95/08548, která popisuje, že tato PKS musí obsahovat následující tři polypeptidy, které jsou produkty act I genů: nejprve KS; potom polypeptid označený CLF s celkovou podobností aminokyselinové sekvence s KS, ale ve kterém je aktivní zbytek KS, konkrétně cysteinový zbytek, substituován buď glutaminovým zbytkem, nebo v případě PKS pro pigment spor, jako je produkt whiE genu (Chater, K.F. and Davis, N.K., Mol. Microbiol. (1990) 4: 1679-1691), zbytkem kyseliny glutamové (obr. 2); a nakonec ACP. CLF byla uvedena například v Mezinárodní patentové přihlášce č. WO 95/08548 jako faktor, který určuje délku polyketidového řetězce produkovaného minimální PKS. Nicméně, bylo zjištěno (Shen B. et al., J. AM. Chem. Soc. (1995) 117: 6811-6821), že když je CLF pro oktaketid actinorhodin použita místo CLF pro deketid tetracenomycin v hostitelské buňce *Streptomyces*

glaucescens, není polyketidový produkt alterován z dekaketidu na oktaketid, takže přesná úloha CLF zůstává nejasná. Byla navrženo alternativní názvosloví, ve kterém je KS označován jako KS $\alpha$  a CLF je označován jako KS $\beta$ , aby byly brány v úvahu tyto znalosti (Meurer, G. et al., Chemistry and Biology (1997), 4: 433-443). Mechanismus, kterým jsou acetátové počáteční jednotky a acetátové prodlužovací jednotky dodávány na PKS typu II není znám, ale předpokládá se, že malonyl-CoA:ACP acyltransferasa synthasy mastných kyselin hostitelské buňky může splňovat některé funkce pro PKS typu II (Revill, W. P. et al., J. Bacteriol. (1995) 177: 3946-3952).

Mezinárodní patentová přihláška č. WO 95/08548 popisuje nahrazení PKS genů pro actinorhodin heterologní DNA z jiného seskupení PKS genů pro získání hybridních polyketidů. Stejná Mezinárodní patentová přihláška WO 95/08548 popisuje přípravu kmene *Streptomyces coelicolor*, který v podstatě neobsahuje přirozené genové seskupení pro actinorhodin, ve kterém je použit plasmidový vektor pRM5 odvozený od vektoru SCP2\* s nízkým počtem kopií izolovaného od *Streptomyces coelicolor* (Bibb, M.J. and Hopwood, D.A., J. Gen. Microbiol. (1981) 126: 427), ve kterém může být DNA kódující heterologní PKS exprimována pod kontrolou divergentního actI/actIII promotorového regionu genového seskupení pro actinorhodin (Fernandez-Moreno, M.A. et al., J. Biol. Chem. (1992) 267: 19278-19290). Plasmid pRM5 také obsahuje DNA z genového seskupení pro biosyntézu actinorhodinu kódující gen pro specifický aktivátorový protein, ActII-orf4. ActII-orf4 protein je nutný pro transkripci genů umístěných pod kontrolu actI/actII dvousměrného promotoru a aktivuje expresi genu během přechodu z růstu do stacionární fáze ve vegetativním myceliu (Hallam, S.E. et al., Gene (1988) 74: 305-320).

Je dobře známo, že seskupení typu II v *Streptomyces* jsou aktivována aktivátorovými geny specifickými pro určitou metabolickou dráhu (Narva, K. E. and Feitelson, J. S. J. Bacteriol. (1990) 172:326-333; Stutzman-Engwall, K. J. et al. J. Bacteriol. (1992) 174:144-154; Fernandez-Moreno, M.A. et al. Cell (1991) 66:769-780; Takano, E. et al. Mol. Microbiol. (1992) 6:2797-2804; Takano, E. et al. Mol Microbiol. (1992) 7:837-845). Produkt DnrI genu doplňuje mutaci v actII-orf4 genu of *S. coelicolor*, což naznačuje, že DnrI a ActII-orf4 proteiny působí na podobné cíle. Byl popsán gen (srmR) (EP 0 524 832 A2), který je umístěn poblíž genového seskupení pro PKS II. typu pro makrolidový polyketid spiramycin. Tento gen specificky aktivuje produkci makrolidového antibiotika spiramycinu, ale nebyly objeveny žádné další příklady takového genu. Také nebyly popsány žádné homology ActII-orf4/DnrI/RedD rodiny aktivátorů, které by působily na geny pro PKS II. typu.

Ačkoliv bylo identifikováno velké množství terapeuticky významných polyketidů, přetrvává potřeba pro získání nových polyketidů, které mají lepší vlastnosti nebo které mají zcela novou biologickou aktivitu. Komplex polyketidů produkovaný PKS I. typu je zejména významný v tom, že zahrnuje sloučeniny se známou použitelností jako antihelmintika, insekticidy, imunosupresiva, antimykotika nebo antibiotika. Vzhledem ke komplexnosti jejich struktury nemohou být takové nové polyketidy snadno získány chemickou syntézou ani chemickou modifikací známých polyketidů.

Existuje také potřeba vývoje spolehlivých a specifických způsobů pro použití jednotlivých modulů v praxi tak, aby všechny, nebo značná část, hybridních PKS genů, které jsou připraveny, byly funkční a produkovaly požadované polyketidové produkty.

Mezinárodní patentová přihláška č. PCT/GB97/01819 popisuje, že PKS genový soubor (konkrétně typu I) kóduje zaváděcí modul, po kterém následuje alespoň jeden prodlužovací modul. Obr. 1 ukazuje organizaci DEBS genů. První otevřený čtecí rámeček kóduje první multi-enzym nebo kazetu (DEBS 1), která se skládá ze tří modulů: zaváděcího modulu (ery-zaváděcí modul) a dvou prodlužovacích modulů (modul 1 a modul 2). Zaváděcí modul obsahuje acyltransferasu a proteinový nosič pro acyl. Toto může být srovnáno s obr. 1 WO 93/13663 (viz výše). Tento obr. ukazuje ORF1, který se skládá z pouze dvou modulů, z nichž první je jak zaváděcí modul, tak první prodlužovací modul.

PCT/GB97/01819 popisuje obecně produkci hybridního PKS genového souboru obsahujícího zaváděcí modul a alespoň jeden prodlužovací modul. PCT/GB97/01819 také popisuje (viz též Marsden, A.F.A. et al., Science (1998), 279: 199-202) konstrukci hybridního PKS genového souboru pomocí přenosu zaváděcího modulu se širší specificitou pro polyketid syntasu produkující avermectin do první multienzymové složky (DEBS 1) pro erythromycinovou PKS místo normálního zaváděcího modulu. Některé nové polyketidy mohou být připraveny za použití hybridního PKS genového souboru, jak je popsáno například v projednávané Mezinárodní patentové přihlášce č. PCT/GB97/01810. Mezinárodní patentová přihláška č. PCT/GB97/01819 dále popisuje přípravu hybridního PKS genového souboru pomocí přenosu zaváděcího modulu pro polyketid syntasu produkující rapamycin do první multienzymové složky (DEBS 1) pro erythromycinovou PKS místo normálního zaváděcího modulu. Zaváděcí modul rapamycinové PKS se liší od zaváděcích modulů DEBS a avermektinové PKS v tom, že obsahuje doménu CoA ligasy, enoylreduktasovou ("ER") doménu a ACP, takže vhodné organické kyseliny včetně přirozené počáteční jednotky

kyseliny 3,4-dihydrocyklohexankarboxylové mohou být aktivovány in situ na zaváděcí doméně PKS, a s nebo bez redukce ER doménou přenesenou na ACP pro intramolekulové zavedení KS prodlužovacího modulu 1 (Schwecke, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995), 92: 7839-7843).

Byly popsány DNA sekvence pro několik seskupení PKS genů typu I, které řídí produkci 16-členných makrolidových polyketidů, včetně tylosinové PKS ze *Streptomyces fradiase* (EP 0 791 655 A2), niddamycinové PKS ze *Streptomyces caelestis* (Kavakas, S.J. et al., J. Bacteriol. (1998), 179: 7515-7522) a spiramycinové PKS ze *Streptomyces ambofaciens* (EP 0791 655 A2). Všechny tyto genové sekvence mají společné to, že obsahují zaváděcí modul PKS odlišný od zaváděcího modulu DEBS a avermektinové PKS v tom, že se skládá z domény napodobující KS domény prodlužovacích modulů, AT domény a ACP (obr. 3). Další N-koncová doména podobná KS byla označena KSq, protože se liší od prodlužovacích KS specifickým nahrazením aktivních cysteinových zbytků nutných pro aktivitu  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthasy glutaminem (Q je v jednopísmenném kodu aminokyselin). Funkce KSq domény je neznámá (Kavakas, S.J. et al., J. Bacteriol. (1998), 179: 7515-7522), ale její přítomnost v těchto PKS pro 16-členné makrolidy je překvapivá, protože počátečními jednotkami tylosinu, niddamycinu a spiramycinu se zdají být propionat, acetat a acetat, v příslušném pořadí, to znamená, že se jedná o stejný typ počátečních jednotek jako v DEBS. AT sousedící s KSq doménou zde označována jako ATq doména.

Když byl celý zaváděcí modul tylosinové PKS použit pro nahrazení analogického zaváděcího modulu ve spiramycinové PKS *S. ambofaciens* (Kuhstoss et al., Gene (1996), 183: 231-236), změnil se charakter počáteční jednotky z acetatu na propionat.

Protože úloha KSq domény není známá, nebyl proveden žádný objev odhalující význam KSq domény ani možné použití těchto zaváděcích modulů obsahujících KSq v určení počátečních jednotek polyketidových produktů, ani při produkci makrolidů ve velkém rozsahu. Interpretace tohoto výsledku byla: "Proto předpokládáme, že zde uvedené pokusy silně podporují hypotézu, že AT domény v PKS systémech typu I vybírají vhodný substrát v každém stupni syntézy" (Kuhstoss et al., Gene (1996), 183: 231-236, na str. 235). Tito autoři popisují analogii s CLF proteinem v systémech PKS typu II a uvádějí, že poslední uvedený protein se účastní určování délky řetězce. Uvádějí: "KSq může mít podobnou funkci, ačkoliv není jasné, jak by taková funkce mohla být nezbytná pro syntézu těchto 16-členných polyketidů, když není nutná pro syntézu jiných komplexních polyketidů, jako je 6-DEB nebo rapamycin. V každém případě je nepravděpodobné, že by se KSq účastnila výběru substrátu v každém stupni syntézy". (Kuhstoss et al., Gene (1996), 183: 231-236).

Bylo prokázáno, že když je genetické inženýrství použito pro odstranění zaváděcího modulu DEBS, tak vzniklý zkrácený DEBS v *Sacch. erythraea* stále produkuje nízké hladiny erythromycinů obsahujících propionatovou počáteční jednotku (Pereda, A. et al., Microbiology (1995) 144: 543-553). Stejná práce uvádí, že když je v tomto zkráceném DEBS AT specifická pro methylmalonyl-CoA prodlužovacího modulu 1 nahrazena AT-specifickou pro malonyl CoA z prodlužovacího modulu rapamycinové PKS, tak jsou výsledným produktem také erythromyciny v nízké koncentraci, které obsahují propionatové počáteční jednotky, což ukazuje, že počáteční jednotky nevznikají dekarboxylací (methyl)malonylových skupin zavedených na enzym AT modulu 1, ale přímou acylací KS prodlužovacího modulu 1 propionyl-CoA. Toto je v protikladu

k předchozím pracím, využívajícím částečně přečištěný DEBS1+TE, zkrácenou biomodulární PKS odvozenou od DEBS (Kao, C.M. et al., J. Am. Chem. Soc. (1995) 117: 9105-9106) a funkčního ekvivalentu k DEBS1+TE (Brown, M.J.B. et al., J. Soc. Chem. Commun. (1995), 1517-1518; Cortés, J. et al., Science (1991), 2523: 675-679), které uvádějí, že mezi zdroje počátečních jednotek pro DEBS patří methylnalonatové jednotky, které jsou zavedeny na modul 1 a které jsou dekarboxylovány KS modulu 1 (Pieper, R. et al., Biochemistry (1997), 36: 1846-1851). Nyní bylo zjištěno, že když je DEBS1-TE protein plně přečištěn z extraktu rekombinantní *Sacch. erythraea*, nemá žádnou takovou specifickou dekarboxylasovou aktivitu (Weissmann, K. et al., (1998), Biochemistry 37: 11012-11017), což dále potvrzuje to, že počáteční jednotky ve skutečnosti nevznikají dekarboxylací prodlužovacích jednotek provedenou KS prodlužovacího modulu 1.

Nyní je známo, že DEBS zaváděcí modul má o něco větší specificitu než propionat samotný, a že acetátové počáteční jednotky jsou použity jak *in vitro*, tak *in vivo*, když je PKS obsahující tento zaváděcí modul částí PKS, která je exprimována buď v *Sacch. erythraea* přirozeném hostiteli pro produkci erythromycinu (viz například Cortés, J. et al., Science (1995), 268: 1487-1489), nebo v heterologním hostiteli, jako je *S. coelicolor* (Kao, C.M. et al. J. Am. Chem. Soc. (1994), 116: 11612-11613; Brown, M.J.B. et al., J. Soc. Chem. Commun. (1995), 1517-1519). Pokusy *in vitro* využívající přečištěný DEBS1-TE prokázaly, že propionyl-CoA a acetyl-CoA jsou alternativními substráty, které účinně nahrazují propionátové a acetátové jednotky, v příslušném pořadí, v zaváděcím modulu (Wiessmann, K.E.H. et al., Chemistry and Biology (1995) 2: 583-589; Pieper, R. et al., J. Am. Chem. Soc. (1995), 117: 11373-11374). Výsledek soutěže

mezi acetatovými a propionatovými počátečními jednotkami je ovlivněn příslušnými intracelulárními koncentracemi propionyl-CoA a acetyl-CoA převládajícími v použité hostitelské buňce (viz například Kao, C.M. et al., *Science* (1994), 265: 509-512; Pereda, A. et al., *Microbiology* (1995), 144: 543-553). Toto je také potvrzeno úrovní exprese PKS hostitele, jak je popsána v projednávané Mezinárodní patentové přihlášce č. PCT/GB97/01819, která uvádí, že když je rekombinantní DEBS nebo jiná hybridní PKS obsahující DEBS zaváděcí modul nadměrně exprimována v *Sacch. erythraea*, tak jsou produkty obvykle směsí, jejichž složky se liší pouze přítomností acetatových nebo propionatových počátečních jednotek.

Existuje potřeba vývoje spolehlivých způsobů pro vyloučení tvorby směsí polyketidů obsahujících jak acetatové, tak propionatové počáteční jednotky, a pro umožnění specifických inkorporací neobvyklých počátečních jednotek. Nyní bylo překvapivě zjištěno, že úloha zaváděcích domén v PKS pro 16-členné makrolidy tylosin, niddamycin a spiramycin je odlišná od úlohy zaváděcích domén v avermektinové PKS a DEBS. Bylo zjištěno, že KSq doména tylosinové PKS a asociovaná AT doména, která je zde označována jako ATq, jsou společně odpovědné za vysoce specifickou produkci propionatových počátečních jednotek, protože ATq je specifická pro zavedení methylmalonyl-CoA a ne propionyl-CoA, jak se předpokládalo dříve; a KSq je odpovědná za vysoce specifickou dekarboxylaci methylmalonatové jednotky navázané na enzym za vzniku propionatové jednotky navázané na ACP doménu zaváděcího modulu a vhodně umístěnou tak, aby mohla být přenesena do KS prodlužovacího modulu 1 pro iniciaci prodlužování řetězce. Podobně jsou ATq spiramycinové a nidamycinové PKS a sousední KSq odpovědné za specifické zavedení malonatových jednotek místo acetatových jednotek, jak se předpokládalo dříve, a za

jejich specifickou dekarboxylaci vedoucí ke vzniku acetatových počátečních jednotek pro prodlužování polyketidového řetězce.

Nyní bylo také zjištěno, že nejen PKS pro výše uvedené 16-členné makrolidy, ale také PKS pro některé 14-členné makrolidy, konkrétně oleandomycinová PKS od *Streptomyces antibioticus* (obr. 4), a také PKS pro některé polyetherové ionoforové polyketidy, konkrétně domnělá monensinová PKS ze *Streptomyces cinnamomensis* (obr. 4), obsahují zaváděcí doménu obsahující KSq doménu, ATq doménu a ACP. Na obr. 4 je uvedeno uspořádání sekvence KSq domén a sousedních ATq domén, které byly identifikovány, a jsou uvedeny konzervované glutaminové (Q) zbytky aktivního místa v KSq doménách a argininový zbytek, který je konzervovaný ve všech prodlužovacích AT doménách a také zcela konzervovaný v ATq doménách. Tento zbytek je charakteristicky jiný než arginin v AT doménách zaváděcích modulů DEBS nebo avermektinové PKS, kde je substrátem pro AT nekarboxylovaný ester acyl-CoA (Haydock, S.F. et al., FEBS Letters, (1995), 374: 246-248). Zkratka ATq je zde použita pouze pro odlišení AT domén přítomných bezprostředně na C-konci KSq od prodlužovacích AT a nemá žádný jiný význam.

#### Podstata vynálezu

V jednom aspektu vynález poskytuje PKS multienzym nebo jeho část, nebo nukleovou kyselinu (obvykle DNA) kódující tento multienzym, kde uvedený multienzym nebo jeho část obsahuje zaváděcí modul a více prodlužovacích modulů, kde:

(a) zaváděcí modul je upraven tak, aby zaváděl malonylový zbytek nebo substituovaný malonylový zbytek a potom prováděl dekarboxylaci zavedeného zbytku za vzniku acetylového zbytku

nebo substituovaného acetylového zbytku (kde tento termín zahrnuje propionyl) pro přenos na prodlužovací modul; a

(b) prodlužovací moduly, nebo alespoň jeden z nich (výhodně alespoň modul sousedící se zaváděcím modulem) se v přirozeném stavu nevyskytují ve spojení se zaváděcím modulem, který provádí dekarboxylaci volitelně substituovaného malonylového zbytku.

Obvykle obsahuje zaváděcí modul také ACP (proteinový nosič pro acyl) doménu.

Výhodně je dekarboxylační funkce zaváděcího modulu dodána doménou KS (ketosynthasového) - typu. Výhodně se odlišuje od KS běžného prodlužovacího modulu tím, že obsahuje glutaminový zbytek místo zásadního cysteinového zbytku v aktivním místě. Tato doména je označena KSq. Může být "přirozená" nebo geneticky upravená, například vzniklá místně cílenou mutagenesí nukleové kyseliny kódující jinou KS, jako je KS prodlužovacího modulu.

Alternativně může být dekarboxylační funkce dodána doménou CLF typu, která se obvykle vyskytuje v PKS systémech II. typu.

Výhodně je zaváděcí funkce dodána doménou AT (acyltransferasového) typu, která napodobuje AT doménu běžného prodlužovacího modulu v tom, že obsahuje argininový zbytek v aktivním místě, který není přítomen v AT doménách zaváděcích modulů, které zavádějí acetat nebo propionat, například v DEBS nebo avermektinových PKS systémech. Tato doména může být označena ATq. Opět může být "přirozená" nebo geneticky upravená, například mutagenesí AT prodlužovacího modulu.

Obvykle je zaváděcí modul ve formě:

KSq-ATq-ACP

kde ACP je proteinový nosič pro acyl.

V jiném aspektu vynález poskytuje způsob pro syntézu polyketidů obsahujících v podstatě výlučně požadovanou počáteční jednotku, který využívá PKS multienzym obsahující zaváděcí modul, jak byl definován výše, který specificky dodává požadovanou počáteční jednotku. Tento způsob může obsahovat poskytnutí nukleové kyseliny kódující multienzym a její vložení do organismu, ve kterém může být exprimována.

V dalším aspektu vynález poskytuje vektory a transformované organismy a kultury obsahující nukleové kyseliny kódující multienzym. Výhodným provedením je kultura, která produkuje polyketid mající požadovanou počáteční jednotku, který v podstatě neobsahuje polyketid s jinou počáteční jednotkou. Například, erythromycin může být produkován v podstatě bez produkce analogů vznikajících v důsledku inkorporace acetatových počátečních jednotek místo propionatu.

Výhodně kóduje hybridní PKS zaváděcí modul a 2 až 7 prodlužovacích modulů a enzym ukončující řetězec (obvykle thioesterasu).

Zejména výhodné je použití zaváděcího modulu typu KSq-ATq-ACP v souboru PKS genu produkujícího 12-, 14- nebo 16-členný makrolid, aby bylo možno získat 12, 14- nebo 16-členný makrolid, který obsahuje výlučně nebo téměř výlučně acetatové počáteční jednotky, i když je taková sestava PKS genu

exprimována ve vysokých úrovních v aktinomycetové hostitelské buňce. Zejména vhodné PKS pro tento účel jsou složky PKS pro biosyntézu erythromycinu, oleandomycinu, tylosinu, spiramycinu, midecamycinu a niddamycinu, kde pro všechny tyto sloučeniny je alespoň částečně znám gen a organizace modulů. Zejména vhodnými zdroji genů kódujících zaváděcí modul typu KSq-ATq-ACP jsou zaváděcí moduly oleandomycinu, spiramycinu, niddamycinu, methymycinu a monensinu, které jsou specifické pro zavedení malonatových jednotek, které jsou potom dekarboxylovány na acetatové počáteční jednotky.

Podobně je zejména výhodné použití zaváděcího modulu typu KSq-ATq-ACP v souboru PKS genu produkujícího makrolidy rifamycin, avermectin, rapamycin, immunomycin a FK506, jejichž zaváděcí moduly mají neobvyklou specifitu (a kde pro každý z nich je alespoň částečně znám gen a organizace modulů) pro přípravu takových makrolidů, které obsahují výlučně nebo téměř výlučně acetatové počáteční jednotky, i když je taková sestava PKS genu exprimována ve vysokých úrovních v aktinomycetové hostitelské buňce. Zejména vhodnými zdroji genů kódujících zaváděcí modul typu KSq-ATq-ACP jsou zaváděcí moduly oleandomycinu, spiramycinu, niddamycinu, methymycinu a monensinu, které jsou specifické pro zavedení malonatových jednotek, které jsou potom dekarboxylovány na acetatové počáteční jednotky.

Podobně je zejména výhodné použití zaváděcího modulu typu KSq-ATq-ACP v souboru PKS genu produkujícího 12-, 14- nebo 16-členný makrolid, aby bylo možno získat 12, 14- nebo 16-členný makrolid, který obsahuje výlučně nebo téměř výlučně propionatové počáteční jednotky, i když je taková sestava PKS genu exprimována ve vysokých úrovních v aktinomycetové hostitelské buňce. Zejména vhodné PKS pro tento účel jsou

složky PKS pro biosyntézu erythromycinu, methymycinu, oleandomycinu, tylosinu, spiramycinu, midecamycinu a niddamycinu, kde pro všechny tyto sloučeniny je alespoň částečně znám gen a organizace modulů. Zejména vhodným zdrojem genu kódujícího zaváděcí modul typu KSq-ATq-ACP je zaváděcí modul tylosinu, který je specifický pro zavedení methylmalonatových jednotek, které jsou potom dekarboxylovány na propionatové počáteční jednotky.

Podobně je zejména výhodné použití zaváděcího modulu typu KSq-ATq-ACP v souboru PKS genu produkujícího makrolidy rifamycin, avermectin, rapamycin, immunomycin a FK506, jejichž zaváděcí moduly mají neobvyklou specificitu (a kde pro každý z nich je alespoň částečně znám gen a organizace modulů) pro přípravu takových makrolidů, které obsahují výlučně nebo téměř výlučně propionatové počáteční jednotky, i když je taková sestava PKS genu exprimována ve vysokých úrovních v aktinomycetové hostitelské buňce. Zejména vhodným zdrojem genu kódujícího zaváděcí modul typu KSq-ATq-ACP je zaváděcí modul tylosinu, který je specifický pro zavedení methylmalonatových jednotek, které jsou potom dekarboxylovány na propionatové počáteční jednotky.

V zaváděcím modulu typu KSq-ATq-ACP mohou být domény nebo jejich části odvozeny ze stejných nebo z různých zdrojů a patří mezi ně přirozené nebo geneticky upravené domény. Například může být ATq doména nahrazena AT doménou z nějakého prodlužovacího modulu PKS typu I, který je specifický pro zavedení buď malonatových jednotek, nebo methylmalonatových jednotek, v příslušném pořadí, pokud je KSq doména vybrána tak, aby měla odpovídající specificitu k methylmalonátovým nebo malonátovým jednotkám, v příslušném pořadí.

Alternativně může být KSq doména v zaváděcím modulu dodaná KSq-ATq-ACP substituovaná CLF polypeptidem PKS typu II. Nyní je známo, že oproti předchozím předpokladům, že jde o faktor určující délku řetězce, může mít CLF kromě jiných aktivit aktivitu analogickou aktivitě KSq domény a může účinkovat jako dekarboxylasa navázaných malonatových jednotek.

Zjištění, že CLF doména PKS typu II má dekarboxylační aktivitu vedlo k provedený zásahů do systémů typu II, například pro zvýšení výtěžku některých fermentací. Mnoho vysoce výtěžných průmyslových fermentací má tendenci ke vzniku směsí, ve kterých jsou přítomny složky inkorporující nežádoucí počáteční jednotky. Tak je tomu zejména v případě systémů, které obsahují pomocné geny pro přípravu neobvyklých počátečních jednotek. CLF geny mohou způsobovat produkci nežádoucích acylových typů, což vede ke vzniku materiálů obsahujících nežádoucí acylové jednotky.

Například produkce oxytetracyklinu vyžaduje neobvyklou malonamidovou počáteční jednotku. Nicméně, nežádoucí aktivita CLF domény způsobuje určitou dekarboxylaci, která vede k inkorporaci acetylu. Podobně syntéza daunomycinu vyžaduje neobvyklou počáteční jednotku, která podléhá "parazitické" aktivitě CLF domény.

Aktivní místo (pro dekarboxylaci) CLF domény obvykle obsahuje glutaminový zbytek. Zjistili jsme, že dekarboxylační aktivita domény může být odstraněna mutací, ve které je Gln zbytek přeměněn na (například) Ala.

V dalším aspektu tedy vynález poskytuje systém a způsob pro syntézu polyketidu typu II (aromatického), ve kterém je Gln

zbytek CLF domény PKS typu II mutován pro potlačení dekarboxylační aktivity. Techniky místně cílené mutagenese, pomocí kterých může být toto provedeno, jsou dobře známe odborníkům v oboru.

Zaváděcí modul typu KSq-ATq-ACP může být navázán na hybridní PKS připravenou například podle PCT/GB97/01819 a PCT/GB97/01810. Je zejména výhodné navázat takový zaváděcí modul na genovou sestavu, která kóduje hybridní PKS, který produkuje nové deriváty 14-členných makrolidů, jak je popsáno například v PCT/GB97/01819 a PCT/GB97/01810.

Vynález dále poskytuje takové sestavy PKS vybavené zaváděcím modulem typu KSq-ATq-ACP, vektory obsahující takové sestavy a transformované organismy exprimující takové vektory. Transformované organismy mohou obsahovat rekombinantní plasmidy nebo mohou být takové plasmidy integrovány. Plasmid s int sekvencí se bude integrovat do specifického vazebného místa (att) chromosomu hostitele. Transformované organismy mohou modifikovat počáteční produkty, například provedením všech nebo některých biosyntetických modifikací běžných při produkci erythromycinů (jak je uvedena na obr. 5) a jiných polyketidů. Mohou být použity mutantní organismy, ve kterých jsou některé normální dráhy mutované, například pro produkci produktů s jednou nebo více "přirozenými" hydroxylovými skupinami nebo sacharidovými skupinami. Vynález dále poskytuje nové polyketidy produkovatelné, přímo nebo nepřímo, transformovanými organismy. Sem patří polyketidy, které byly zpracovány enzymovou modifikací.

V dalším aspektu vynález poskytuje jak známé polyketidy, tak nové polyketidy v čistší formě vzhledem k charakteru

počáteční jednotky, než bylo dosud možné získat. Sem patří makrolidy tvořené 12-, 14- a 16-členným kruhem, které jsou buď "přirozené", nebo které se liší od příslušných "přirozených" sloučenin:

(a) v oxidačním stavu jedné nebo více ketidových jednotek (tj. výběru alternativ ze skupiny:  $-\text{CO}-$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})-$ , alken,  $-\text{CH}-$  a  $-\text{CH}_2-$ ), kde stereochemické uspořádání  $-\text{CH}(\text{OH})-$  je také vybráno nezávisle;

(b) v nepřítomnosti "přirozeného" methylového vedlejšího řetězce; nebo

(c) ve stereochemickém uspořádání "přirozeného" methylu; a/nebo substituentů kruhu jiných než je methyl.

Je také možné připravit deriváty makrolidů tvořených 12-, 14-, nebo 16-členným kruhem odlišné od přirozených sloučenin ve dvou nebo více bodech (a) až (c) uvedených výše.

Mohou být také připraveny deriváty jakýchkoliv výše uvedených polyketidů, které byly dále zpracovány enzymy jinými než PKS, například jednou nebo více hydroxylacemi, epoxidacemi, glykosylacemi a methylacemi.

Předkládaný vynález poskytuje nový způsob pro získání jak známých, tak nových komplexních polyketidů bez tvorby směsí produktů lišící se pouze v tom, že obsahují buď propionatové, nebo acetatové počáteční jednotky. Dále předkládaný vynález poskytuje způsob pro přípravu nových polyketidů, ve kterých je počáteční jednotkou neobvyklá počáteční jednotka, která vzniká

v důsledku působení Ksq domény na sloučeninu vázanou na enzym, která je produktem AT s neobvyklou specificitou odvozené od modulu přirozeného PKS typu I. Konkrétně AT prodlužovacího modulu 4 FK506 PKS genového seskupení přednostně využívá allylový vedlejší řetězec; AT prodlužovacího modulu 6 niddamycinového PKS genového seskupení přednostně využívá vedlejší řetězec vzorce  $\text{HOCH}_2-$ ; a AT spiramycinového prodlužovacího modulu 5 a monensinového prodlužovacího modulu 5 přednostně využívá ethylový vedlejší řetězec. V každém případě je Ksq doména přednostně taková, která je v přirozeném stavu specifická pro propionat. Alternativně, jakákoliv KS z prodlužovacího modulu PKS typu I může být přeměněna na Ksq doménu dekarboxylovat navázaný karboxylovaný acylový thioester, pomocí místně cílené mutagenese cysteinového zbytku aktivního místa pro jeho nahrazení jiným zbytkem, výhodně glutaminem. Nyní je známo, že synthasa živočišných mastných kyselin, která má mnoho společných rysů s PKS typu I, má za nepřítomnosti acetyl-CoA prokazatelnou dekarboxylasovou aktivitu pro malonyl-CoA (Kresze, G.B. et al., Eur. J. Biochem. (1977) 79: 191-199). Po reakci s alkylačním činidlem, jako je jodacetamid, je synthasa mastných kyselin inaktivována specifickou modifikací cysteinu aktivního zbytku KS, a vzniklý protein má zesílenou dekarboxylasovou aktivitu pro malonyl-CoA. Přeměna KS domény pro mastnou kyselinu na dekarboxylasu odráží geneticky určenou změnu mezi KS doménami a Ksq doménou v PKS typu I. Kromě toho, velikost a polarita glutaminového vedlejšího řetězce se velmi podobá velikosti a polaritě karboxamido-cysteinu. Ksq použitá pro dekarboxylaci neobvyklé alkylmalonátové jednotky je výhodně vybrána ze stejného prodlužovacího modulu stejného PKS typu I, který dodává neobvyklou AT, aby byla optimalizována dekarboxylace neobvyklého alkylmalonátu, a použitá ACP je také výhodně ACP stejného prodlužovacího modulu.

Vhodné plasmidové vektory a geneticky upravené buňky vhodné pro expresi PKS genů obsahujících pozměněný zaváděcí modul jsou ty, které jsou popsány v PCT/GB97/01819 jako vhodné pro expresi hybridních PKS genů typu I. Příklady použitelných hostitelů jsou *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces cinnamonensis*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces hygrosopicus*, *Micromonospora griseorubida*, *Streptomyces lasaliensis*, *Streptomyces venezuelae*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces albus*, *Amycolatopsis mediterranei*, a *Streptomyces tsukubaensis*. Mezi tyto organismy patří hostitelé, o kterých je známo, že se v nich plasmidy odvozené od SCP2\* replikují autonomně, jako je například *S. coelicolor*, *S. avermitilis* a *S. griseofuscus*; a jiní hostitelé jako je *Saccharopolyspora erythraea*, ve kterých se plasmidy odvozené od SCP\* integrují do chromosomu homologní rekombinací mezi sekvencí plasmidového insertu a chromosomu; a všechny takové vektory, které jsou integrativně transformovány integrovatelnými plasmidovými vektory.

Nikterá provedení vynálezu jsou ilustrována na následujících výkresech.

#### Popis obrázků na připojených výkresech

Obr. 1 je diagram ukazující funkci 6-deoxyerythronolid B synthasy (DEBS), modulární PKS produkující 6-deoxyerythrolidon B (6-DEB), prekursor erythromycinu A.

Obr. 2 ukazuje srovnání aminokyselinové sekvence KS domén a CLF domén reprezentativních genových seskupení PKS typu II.

Cystein (C) aktivního místa KS domén je označen šipkou a odpovídá glutaminu (Q) nebo kyselině glutamové (E) CLF domén. Použité zkratky a příslušná Genbank/EMBL přírůsková čísla jsou: GRA, granaticin ze *Streptomyces violaceoruber* (X63449); HIR, neznámý polyketid ze *Saccharopolyspora hirsuta* (M98258); ACT, actinorhodin ze *Streptomyces coelicolor* (X63449); CIN, neznámý polyketid ze *Streptomyces cinnamonensis* (Z11511); VNZ, jadomycin ze *Streptomyces venezuelae* (L33245); NOG, anthracykliny ze *Streptomyces nogalater* (Z48262); TCM, tetracenomycin ze *S. glaucescens* (M80674); DAU, daunomycin ze *Streptomyces* sp. C5 (L34880); PEU, doxorubicin ze *Streptomyces peucetius* (L35560); WHI, WhiE pigment spor ze *Streptomyces coelicolor* (X55942).

Obr. 3 ukazuje organizaci genu PKS pro tři 16-členné makrolidy, tylosin, spiramycin a niddamycin.

Obr. 4 ukazuje uspořádání aminokyselinové sekvence KSq-ATq zaváděcích didomén PKS pro niddamycin, platenolid (spiramycin), monensin, oleandomycin a tylosin. Sekvence zaváděcích domén pro monensin a oleandomycin nebyly dříve známe.

Obr. 5 ukazuje enzymatické stupně, které přeměňují 6-deoxyerythronolid B na erythromycin A v *Saccharopolyspora erythrae*.

Obr. 6 je diagram ukazující přípravu plasmidu pJLK117.

Obr. 7 ukazuje strukturu dvou oligonukleotidů.

Příklady provedení vynálezu

Předkládaný vynález bude nyní dokreslen v následujících příkladech, které nijak neomezují rozsah vynálezu. Všechna NMR spektra byla měřena v  $\text{CDCl}_3$ , za použití Bruker 500 MHz DMX spektrometru, pokud není uvedeno jinak, a pozice píků jsou vyjádřeny jako díly na milion (ppm) od tetramethylsilanu. Atomové číslo uvedené v NMR vzorci nepředstavuje standardní hodnotu, ale odpovídá NMR datům pro jednotlivé příklady.

## HPLC

## Způsob A:

|              |                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kolona       | Waters Symmetry 5_C18 2,1 mm x 150 mm                                                                                                                                                                                                           |
| Průtok       | 0,29 ml/min                                                                                                                                                                                                                                     |
| Mobilní fáze | Gradient: A:B (22:78) až A:B (38:62) během 12 minut, potom A:B (80:20) do minuty 15.<br>Udržování po dobu 1 minuty. Opětovné uvedení do rovnováhy před dalším vzorkem. A = acetonitril a B = 0,01 M octan amonný v 10% acetonitrilu a 0,02% TFA |

## Způsob B:

|              |                                                                                                                                                               |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kolona       | Waters Symmetry 5_C18 2,1 mm x 150 mm                                                                                                                         |
| Průtok       | 0,29 ml/min                                                                                                                                                   |
| Mobilní fáze | Gradient: 28:72 acetonitril:10 mM $\text{NH}_4\text{OAc}$ až 50:50 během 18 minut. 50:50 do 25 minut. Zpět na 28:72, opět uvedení do rovnováhy během 7 minut. |
| Přístroj     | Hewlett-Packard 1100 LC/MS s APCI zdrojem                                                                                                                     |

## Vodné medium

|         |       |
|---------|-------|
| Glukosa | 5 g/l |
| Trypton | 5 g/l |

Kvasinkový extrakt 2,5 g/l  
EDTA 36 mg/l  
Vodovodní voda do 1 l celkového objemu

ERY-P medium

Dextrosa 50 g/l  
Nutrisoy<sup>(tm)</sup> moučka 30 g/l  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 g/l  
NaCl 5 g/l  
CaCO<sub>3</sub> 6 g/l  
Vodovodní voda do 1 l celkového objemu  
pH upraveno na 7,0

Příklad 1: Příprava rekombinantního vektoru pPFL43

Plasmid pCJR24 se připraví způsobem popsáným v PCT/GB97/01819. pPFL43 je plasmid na bázi pCJR24 obsahující gen kódující hybridní polyketid-synthasu, která obsahuje zaváděcí modul monensinové PKS (izolovaný ze *S. cinamonensis*), prodlužovací moduly 1 a 2 DEBS a thioesterasu ukončující řetězec. Plasmid pPFL43 se připraví následujícím způsobem:

Následující syntetické oligonukleotidy:

5'-CCATATGGCCGCATCCGCGTCAGCGT-3', a

5'-GGCTAGCGGGTCCTCGTCCGTGCCGAGGTCA-3',

se použijí pro amplifikaci DNA kódující zaváděcí modul pro monensin za použití kosmidu, který obsahuje 5'-konec domnělých genů produkujících monensin ze *S. cinamonensis* nebo chromosomální DNA od *S. cinamonensis* jako templátu. PCR produkt velikosti 3,3 kb se přečistí gelovou elektroforesou,

zpracuje se T4 polynukleotidkinasou a liguje se do plasmidu pUC18, který se předem linearizuje trávením SmaI a potom se zpracuje alkalickou fosfatasou. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé klony se testují na přítomnost požadovaného plasmidu pPFL40. Plasmid pPFL40 se identifikuje podle charakteru restriktivního trávení a podle analýzy sekvence.

Plasmid pHD30His je derivátem pNEWAVETE (PCT(GB97/01810)), který obsahuje avermektinový zaváděcí modul, erythromycinové prodlužovací moduly 1 a 2 a ery thioesterasovou doménu. Plasmid pNEWAVETE se tráví EcoRI a HindIII a vloží se do něj syntetický spojovací oligonukleotid, který kóduje adici C-koncové polyhistidinové sekvence k polypeptidu. Následující oligonukleotidy:

5'-AATTCACATCACCATCACCATCACTAGTAGGAGGTCTGGCCATCTAGA-3', a

5'-AGCTTCTAGATGGCCAGACCTCCTACTAGTGATGGTGATGGTGATGTG-3'

se tepelně zpracují a duplex se liguje do pNEWAVETE tráveného EcoRI a HindIII. Vzniklý plasmid se štěpí NdeI a XbaI a liguje se do plasmidu pCJR24, který se předem štěpí stejnými dvěma enzymy, za zisku plasmidu pND30His.

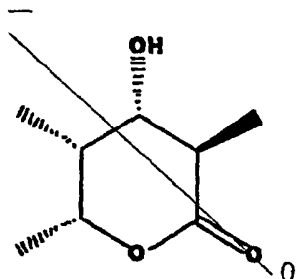
Plasmid pPFL40 se tráví NdeI a NheI a 3,3 kb fragment se přečistí gelovou elektroforesou a liguje se do plasmidu pND30His, který se předem tráví NdeI a NheI a potom se zpracuje alkalickou fosfatasou. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé klony se testují na přítomnost požadovaného plasmidu pPFL43. Plasmid pPFL43 se identifikuje podle charakteru restriktivního trávení.

Příklad 2: Příprava *S. erythraea* JC2/pPFL43

Plasmid pPFL43 se použije pro transformaci protoplastů *S. erythraea* JC2. Příprava kmene JC2, ze kterého jsou prakticky odstraněny vlastní geny pro DEBS, je popsána v projednávané patentové přihlášce PCT/GB97/01819. Kolonie resistantní na thiostrepton se selektují v R2T20 mediu obsahujícím 10 µg/ml thiostreptonu. Několik kolonií se testuje na přítomnost pPFL43 integrovaného do chromosomu Southernovým přenosem jejich genomové DNA s DIG-značenou DNA obsahující mon PKS fragment kódující zaváděcí modul.

### Příklad 3: Produkce polyketidů za použití *S. erythraea* JC2/pPFL43

Zmrazená suspenze *S. erythraea* JC2/pPFL43 se naočkuje do eryP media obsahujícího 5 µg/ml thiostreptonu. Naočkováná kultura se nechá růst po dobu 7 dnů při 28–30 °C. Po této době se medium přefiltruje pro odstranění mycelií a pH se upraví na pH = 3,0. Medium se extrahuje dvakrát dvěma objemy ethylacetatu a kombinované extrakty se promyjí stejným objemem nasyceného roztoku chloridu sodného, suší se přes bezvodý síran sodný a ethylacetat se odstraní za redukováného tlaku, za zisku surového materiálu. Získaný materiál má vzorec uvedený dále a podle MS, GC-MS a <sup>1</sup>H-NMR je identický a autentickým vzorkem.



### Příklad 4: Příprava *S. erythraea* NRRL2338/pPFL43

Plasmid pPFL43 se použije pro transformaci protoplastů *S. erythraea* NRRL2338. Kolonie resistantní na thiostrepton se selektují v R2T20 mediu obsahujícím 10 µg/ml thiostreptonu. Několik kolonií se testuje na přítomnost pPFL43 integrovaného do chromosomu Southernovým přenosem jejich genomové DNA s DIG- značenou DNA obsahující mon PKS fragment kódující zaváděcí modul. Tímto způsobem se selektuje klon s integrovanou kopií pPFL43.

Příklad 5a: Produkce 13-methyl-erythromycinu A a B za použití *Sacch. erythraea* NRRL2338/pPFL43

Kultura *Saccharopolyspora erythraea* NRRL2338 (pPFL43), připravená s insertem monensinové zaváděcí D1IT DNA místo přirozené zaváděcí domény, jak bylo popsáno v příkladu 2, se naočkuje do 30 ml vodného media s 50 µg/ml thiostreptonu v 300 ml Erlenmeyerově baňce. Po třech dnech inkubace při 29 °C se tato baňka použije pro inokulaci 300 ml ERY-P media v 300 ml baňce. Medium se inkubuje při 29 °C a 200 rpm po dobu 6 dnů. V tuto dobu se pH media upraví pomocí NaOH na 8,5 a medium se extrahuje stejným objemem ethylacetatu. Ethylacetatový extrakt se odpaří do sucha při 45 °C za použití proudu dusíku v Zymark TurboVap LV odpařovacím přístroji a potom se rekonstituuje v 0,0625 objemech methanolu pro 16-násobné zahuštění extraktu. Struktura produktů se potvrdí LC/MS, způsobem A. Jako hlavní složka se pozoruje pík při retenčním čase 4,0 minuty, s m/z hodnotou 720 (M+H)<sup>+</sup>, odpovídající 13-methyl-erythromycinu A. Druhý pík má retenční čas 6,4 minuty a m/s hodnotu 704 (M+H)<sup>+</sup>, což odpovídá 13-methyl-erythromycinu B.

Příklad 5b: Produkce a získání 13-methyl-erythromycinu A a B za použití *Sacch. erythraea* NRRL2338/pPFL43 v objemu 8 l

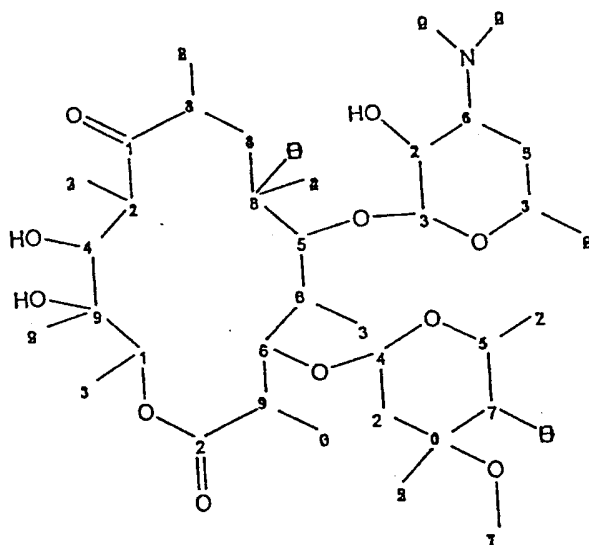
*Saccharopolyspora erythraea* NRRL2338 (pPFL43) se naočkuje do 1000 ml vodného media s 50 µg/ml thiostreptonu v 2,8 l Fernbachově baňce. Po třech dnech inkubace při 29 °C se tato kultura použije pro inokulaci 8 l ERY-P media ve 14 l Microferm fermentačním tanku (New Brunswick Scientifics Co., Inc., Edison, NJ). Medium se inkubuje při 28 °C při provzdušňování 8 l/min, mísení při 800 rpm a za udržování pH mezi 6,9 a 7,3 pomocí NaOH nebo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (15%). Po 24 hodinách se přidává voda pro udržování objemu. Fermentace probíhá po dobu 167 hodin. Po této době se přítomnost 13-methyl-erythromycinu A a B potvrdí upravením vzorku z fermentačního tanku na pH 8,5 pomocí NaOH a potom extrakcí stejným objemem ethylacetatu. Ethylacetatový extrakt se odpaří do sucha při 45 °C za použití proudu dusíku v Zymark TurboVap LV odpařovacím přístroji a potom se rekonstituuje v 0,25 objemech methanolu pro 4-násobné zahuštění extraktu. Struktura produktů se potvrdí LC/MS, způsobem A. Jako hlavní složka se pozoruje pík při retenčním čase 4,1 minuty, s m/z hodnotou 720 (M+H)<sup>+</sup>, odpovídající 13-methyl-erythromycinu A. Druhý pík má retenční čas 6,6 minuty a m/s hodnotu 704 (M+H)<sup>+</sup>, což odpovídá 13-methyl-erythromycinu B.

Přibližně 35 l media obsahujícího přibližně 2,8 g 13-methyl-erythromycinu A se zpracuje pro získání produktu. Medium se přefiltruje přes vyzkoušenou Ceraflo keramickou jednotku a vnese se do 500 ml kolony naplněné XAD-16 pryskyřicí. Produkt se eluuje za použití 100% methanolu. 175 ml CG-161 adsorpční kolona se připraví a uvede do rovnováhy 20% methanolem/vodou. Když se část roztoku obsahujícího produkt se upraví tak, aby obsahoval 20% methanol a vnese se do kolony, není pozorován žádný degradační produkt. Promývání kolony až 40% methanolem/vodou selhává v odstranění jakýchkoliv významných množství nečistot. Eluce 50% methanolem/vodou vede k chromatografické separaci produktu od

dvou hlavních nečistot, 13-methyl-erythromycinu B a degradačního produktu, 13-methyl-dehydroerythromycinu A. Nejčistší frakce se kombinují a zahustí se na přibližně 75% pomocí odpaření za dosažení koncentrace methanolu <10%. Pro zvýšení extrakce 13-methyl-erythromycinu A se přidává pevný hydrogenuhličitan sodný do celkové koncentrace 250 mM. Vodná vrstva obsahující produkt se extrahuje 2x methylenchloridem, pokaždé za použití jedné poloviny celkového objemu. Objem se sníží odpařením za zisku světle žlutého pevného materiálu. 13-methyl-erythromycin A se přečistí rozpuštěním surových krystalů v methylenchloridu při teplotě okolí a ředěním na 15% methylenchlorid hexanem. Kalný roztok se umístí na 30 minut do teploty  $-10^{\circ}\text{C}$  a potom se kapalina dekantuje do druhé zkumavky a nečistoty zůstanou v první zkumavce ve formě oleje. Zkumavka se ponechá přes noc při  $-10^{\circ}\text{C}$  a následující den se odfiltrují špinavě bílé krystaly 13-methyl-erythromycinu A. Přibližně 300 mg 13-methyl-erythromycinu A se izoluje z částečného zpracování 35 l media.

Přibližně 100 g materiálu odpařeného z původní kapaliny se dále použije pro izolaci 13-methyl-erythromycinu B. Zbytkový 13-methyl-erythromycin A se odstraní opakovanou extrakcí původního vzorku vodnou kyselinou octovou (pH 5). Získaná methylenchloridová vrstva se zpracuje chromatografií na 700 g silikagelu za použití 20% methanolu v methylenchloridu. Frakce bohatá na 13-methyl-erythromycin B, jak se určí LC/MS, se kombinují a odpaří se za zisku přibližně 11,0 g tmavého oleje. Olej se rozpustí v minimálním množství methanolu a vnese se do 500 ml kolony obsahující Amberchrom CG-161 pryskyřici. 13-methyl-erythromycin B se eluuje při 2 objemech lože za hodinu pomocí 40% methanolu v deionizované vodě. Frakce velikosti jednoho objemu lože se odeberou a analyzují se LC/MS. frakce 42-62 se kombinují, ředí se na 20% roztok methanolu

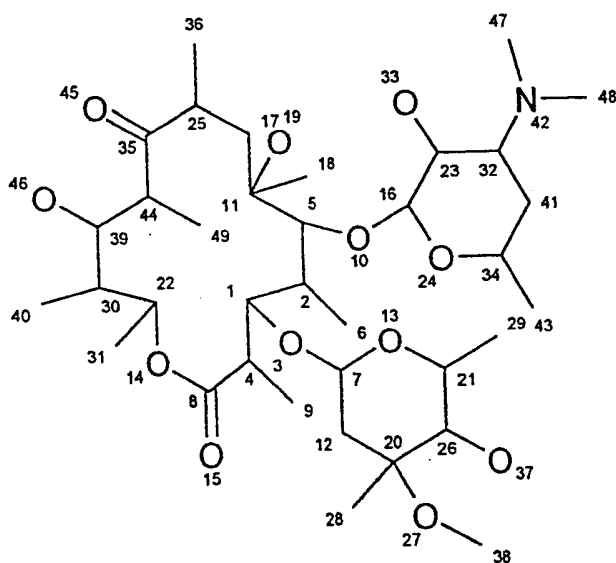
Identifikace vzorků 13-methyl-erythromycinu A a 13-methyl-erythromycinu B se potvrdí hmotností spektrometrií (LS/MS způsob B) a NMR spektrometrií. Pík vzorku 13-methyl-erythromycinu A má retenční čas 4,7 minuty, s  $m/z$  hodnotou 720  $(M+H)^+$ , což odpovídá 13-methyl-erythromycinu A. Pík vzorku 13-methyl-erythromycinu B má retenční čas 7,6 minuty, s  $m/z$  hodnotou 704  $(M+H)^+$ , což odpovídá 13-methyl-erythromycinu B.



19.01.01

| #  | <sup>13</sup> C - ppm | #H | <sup>1</sup> H - ppm |
|----|-----------------------|----|----------------------|
| 1  | 221.91                | 0  |                      |
| 2  | 175.99                | 0  |                      |
| 3  | 103.63                | 1  | 4.45                 |
| 4  | 96.81                 | 1  | 4.88                 |
| 5  | 83.76                 | 1  | 3.60                 |
| 6  | 79.86                 | 1  | 4.10                 |
| 7  | 78.36                 | 1  | 3.05                 |
| 8  | 75.50                 | 0  |                      |
| 9  | 74.87                 | 0  |                      |
| 10 | 73.07                 | 0  |                      |
| 11 | 72.25                 | 1  | 5.19                 |
| 12 | 71.25                 | 1  | 3.26                 |
| 13 | 69.53                 | 1  | 3.53                 |
| 14 | 69.24                 | 1  | 3.97                 |
| 15 | 66.16                 | 1  | 4.06                 |
| 16 | 65.96                 | 1  | 2.48                 |
| 17 | 49.96                 | 3  | 3.36                 |
| 18 | 45.36                 | 1  | 2.79                 |
| 19 | 45.07                 | 1  | 2.81                 |
| 20 | 40.73                 | 3  | 2.32                 |
| 21 | 39.00                 | 1  | 3.15                 |
| 22 | 35.30                 | 2  | 2.42/1.61            |
| 24 | 27.20                 | 3  | 1.50                 |
| 25 | 21.92                 | 3  | 1.28                 |
| 26 | 21.82                 | 3  | 1.27                 |
| 27 | 18.99                 | 3  | 1.32                 |
| 28 | 18.60                 | 3  | 1.22                 |
| 29 | 16.07                 | 3  | 1.19                 |
| 30 | 15.08                 | 3  | 1.19                 |
| 31 | 14.23                 | 3  | 1.26                 |
| 32 | 12.12                 | 3  | 1.19                 |
| 33 | 9.60                  | 3  | 1.15                 |
| 34 | 39.00                 | 2  | 1.98/1.75            |
| 35 | 28.90                 | 2  | 1.72/1.27            |
| 36 | 40.94                 | 1  | 2.05                 |

NMR, 13-methyl-erythromycin B:



| #  | <sup>13</sup> C - PPM | #H<br>navázáno | <sup>1</sup> H - PPM |
|----|-----------------------|----------------|----------------------|
| 1  | 80.50                 | 1              | 4.15                 |
| 2  | 40.62                 | 1              | 2.15                 |
| 4  | 45.17                 | 1              | 2.84                 |
| 5  | 84.08                 | 1              | 3.62                 |
| 6  | 9.86                  | 3              | 1.18                 |
| 7  | 97.26                 | 1              | 4.88                 |
| 8  | 176.48                | 0              |                      |
| 9  | 15.25                 | 3              | 1.22                 |
| 11 | 75.98                 | 0              |                      |
| 12 | 35.43                 | 2              | 2.42/1.61            |
| 16 | 103.75                | 1              | 4.46                 |
| 17 | 38.77                 | 2              | 2.09/1.72            |
| 18 | 27.67                 | 3              | 1.51                 |
| 20 | 73.09                 | 0              |                      |
| 21 | 66.20                 | 1              | 4.06                 |
| 22 | 70.27                 | 1              | 5.58                 |
| 23 | 71.24                 | 1              | 3.28                 |
| 25 | 45.49                 | 1              | 2.81                 |
| 26 | 78.29                 | 1              | 3.06                 |
| 28 | 21.91                 | 3              | 1.28                 |
| 29 | 19.03                 | 3              | 1.33                 |
| 30 | 41.61                 | 1              | 1.65                 |
| 31 | 18.73                 | 3              | 1.29                 |
| 32 | 65.94                 | 1              | 2.53                 |
| 34 | 69.52                 | 1              | 3.55                 |
| 35 | 219.92                | 0              |                      |
| 36 | 19.03                 | 3              | 1.21                 |
| 38 | 49.97                 | 3              | 3.36                 |
| 39 | 70.17                 | 1              | 3.88                 |
| 40 | 9.27                  | 3              | 0.95                 |
| 41 | 29.12                 | 2              | 1.73/1.28            |
| 43 | 21.80                 | 3              | 1.27                 |
| 44 | 39.87                 | 1              | 3.07                 |
| 47 | 40.74                 | 3              | 2.35                 |
| 48 | 40.74                 | 3              | 2.35                 |
| 49 | 9.62                  | 3              | 1.04                 |

#### Příklad 6: Příprava rekombinantního vektoru pPFL42

pPFL42 je plasmid na bázi pCJR24 obsahující gen kódující hybridní polyketid-synthasu, která obsahuje zaváděcí modul tylosinové PKS, erythromycinové prodlužovací moduly 1 a 2 a thioesterasu ukončující řetězec. Plasmid pPFL42 se připraví následujícím způsobem:

Následující syntetické oligonukleotidy:

5'-CCATATGACCTCGAACACCGCTGCACAGAA-3', a

5'-GGCTAGCGGCTCCTGGGCTTCGAAGCTCTTCT-3'

se použijí pro amplifikaci DNA kódující zaváděcí modul pro tylosin za použití buď cps6T (kosmidu, který obsahuje geny pro PKS produkující tylosin ze *S. fradiae*), nebo chromosomální DNA od *S. fradiae* jako templátu. PCR produkt velikosti 3,3 kb se

přečistí gelovou elektroforesou, zpracuje se T4 polynukleotidkinasou a liguje se do plasmidu pUC18, který se předem linearizuje trávením SmaI a potom se zpracuje alkalickou fosfatasou. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé klony se testují na přítomnost požadovaného plasmidu pPFL39. Plasmid pPFL39 se identifikuje podle charakteru restrikčního trávení a podle analýzy sekvence.

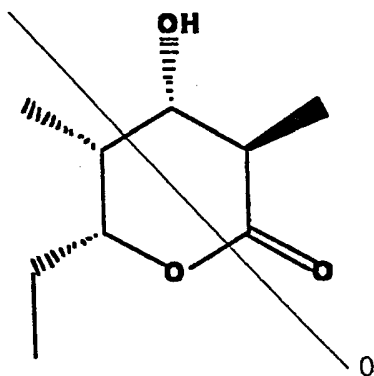
Plasmid pPFL39 se tráví NdeI a NheI a 3,3 kb fragment se přečistí gelovou elektroforesou a liguje se do plasmidu pND30-His, který se předem tráví NdeI a NheI a potom se zpracuje alkalickou fosfatasou. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé klony se testují na přítomnost požadovaného plasmidu pPFL42. Plasmid pPFL43 se identifikuje podle charakteru restrikčního trávení.

#### Příklad 7: Příprava *S. erythraea* JC2/pPFL42

Plasmid pPFL42 se použije pro transformaci protoplastů *S. erythraea* JC2. Kolonie resistantní na thiostrepton se selektují v R2T20 mediu obsahujícím 10 µg/ml thiostreptonu. Několik kolonií se testuje na přítomnost pPFL42 integrovaného do chromosomu Southernovým přenosem jejich genomové DNA s DIG- značenou DNA obsahující tyl PKS fragment kódující zaváděcí modul. Tímto způsobem se identifikuje klon s integrovanou kopií pPFL42.

#### Příklad 8: Produkce polyketidů za použití *S. erythraea* JC2/pPFL42

Zmrazená suspenze *S. erythraea* JC2/pPFL42 se naočkuje do eryP media obsahujícího 5 µg/ml thiostreptonu. Naočkovaná kultura se nechá růst po dobu 7 dnů při 28-30 °C. Po této době se medium přefiltruje pro odstranění mycelií a pH se upraví na pH = 3,0. Medium se extrahuje dvakrát dvěma objemy ethylacetatu a kombinované extrakty se promyjí stejným objemem nasyceného roztoku chloridu sodného, suší se přes bezvodý síran sodný a ethylacetat se odstraní za redukováného tlaku, za zisku surového materiálu. Získaný materiál má vzorec uvedený dále a podle MS, GC-MS a <sup>1</sup>H-NMR je identický a autentickým vzorkem.



#### Příklad 9: Příprava *S. erythraea* NRRL2338/pPFL42

Plasmid pPFL42 se použije pro transformaci protoplastů *S. erythraea* NRRL2338. Kolonie resistantní na thiostrepton se selektují v R2T20 mediu obsahujícím 10 µg/ml thiostreptonu. Několik kolonií se testuje na přítomnost pPFL42 integrovaného do chromosomu Southernovým přenosem jejich genomové DNA s DIG-značenou DNA obsahující tyl PKS fragment kódující zaváděcí modul. Tímto způsobem se selektuje klon s integrovanou kopií pPFL42.

#### Příklad 10: Produkce polyketidů za použití *S. erythraea* NRRL2338/pPFL42

Zmrazená suspenze *S. erythraea* NRRL2338/pPFL42 se naočkuje do eryP media obsahujícího 5 µg/ml thiostreptonu a nechá se růst po dobu 7 dnů při 28–30 °C. Po této době se medium přefiltruje pro odstranění mycelií a pH se upraví na pH = 9,0. Supernatant se potom extrahuje třikrát stejným objemem ethylacetatu a rozpouštědlo se odstraní odpařením. Získaný materiál se analyzuje HPLC/MS a identifikuje se makrolid, který má strukturu identickou s autentickým erythromycinem A (spolu s jinými produkty, které odpovídají erythromycinům B a D, které vznikají v důsledku neúplného post-PKS zpracování).

#### Příklad 11: Příprava plasmidu pPFL35

Plasmid pPFL35 je plasmid na bázi pCJR24 obsahující PKS gen obsahující zaváděcí modul, první a druhý prodlužovací modul DEBS a thioesterasu ukončující řetězec. Zaváděcí modul obsahuje DNA KSq domény ze zaváděcího modulu oleandomycinové PKS fúzaný na AT specifickou pro malonyl CoA modulu 2 rapamycinové PKS, nakonec navázanou na DEBS zaváděcí doménu ACP. Plasmid pPFL35 se připraví přes několik přípravných plasmidů následujícím způsobem:

411 bp segment DNA eryAI genu od *S. erythraea* v rozsahu od nukleotidu 1279 do nukleotidu 1690 (Donadio, S. et al., Science (1991) 2523: 675–679) se amplifikuje PCR za použití následujících syntetických oligonukleotidů:

5'-TGGACCGCCGCCAATTGCCTAGGCGGGCCGAACCCGGCT-3', a

5'-CCTGCAGGCCATCGCGACGACCGCGACCGGTTTCGCC-3'.

DNA z plasmidu označeného pKSW, odvozeného od pT7-7 a DEBS1-TE, do které byla vložena nová PstI a HindIII místa tak, aby obklopovala KS1 prvního prodlužovacího modulu, se použije jako templát. 441 bp produkt PCR se zpracuje se T4

polynukleotidkinasou a liguje se do plasmidu pUC18, který se předem linearizuje trávením SmaI a potom se zpracuje alkalickou fosfatasou. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé klony se testují na přítomnost požadovaného plasmidu pPFL26. Nová MfeI/AvrII místa ohraničující insert sousedí s EcoRI místem v polylinkeru pUC18. Plasmid pPFL26 se identifikuje podle charakteru restričního trávení a podle analýzy sekvence.

MfeI restriční místo je umístěno 112 bp od 5' konce DNA kódující propionyl-CoA:ACP transferasu zaváděcího modulu DEBS. Plasmid pKSW se tráví MfeI a PstI a liguje se s 411 insertem získaným trávením plasmidu pPFL26 MfeI a PstI. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé klony se testují na přítomnost požadovaného plasmidu pPFL27. Plasmid pPFL27 obsahuje PKS gen obsahující DEBS zaváděcí modul, první a druhý prodlužovací modul DEBS a DEBS thioesterasu ukončující řetězec. Plasmid pPFL27 se identifikuje podle charakteru restričního trávení.

Plasmid pPFL27 se tráví NdeI a AvrII a liguje se na 4,6 kb insert odvozený z trávení plasmidu pMO6 (PCT/GB97/01819) NdeI a AvrII. Plasmid pMO6 obsahuje PKS gen obsahující DEBS zaváděcí modul, první a druhý prodlužovací modul DEBS a DEBS thioesterasu ukončující řetězec, s tou výjimkou, že DNA segment kódující AT specifickou pro methylnalonat v prvním prodlužovacím modulu byla specificky nahrazena DNA kódující AT specifickou pro malonat modulu 2 rap PKS. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé klony se testují na přítomnost požadovaného plasmidu pPFL28. Plasmid pPFL28 obsahuje hybridní PKS gen obsahující DEBS zaváděcí modul, AT specifickou pro malonat

modulu 2 rap PKS, ACP zaváděcího modulu DEBS a potom první a druhý prodlužovací modul DEBS a DEBS thioesterasu ukončující řetězec. Plasmid pPFL28 se identifikuje restrikční analýzou.

DNA segment kódující KSq doménu z oleAI genu *S. antibioticus* od nukleotidu 1671 do nukleotidu 3385 se amplifikuje PCR za použití následujících syntetických oligonukleotidových primerů:

5'-CCACATATGCATGTCCCCGGCGAGGAA-3', a

5'-CCCTGTCCGGAGAAGAGGAAGGCGAGGCCG-3'

a chromosomální DNA ze *Streptomyces antibioticus* jako templátu. PCR produkt se zpracuje T4 polynukleotidkinasou a liguje se do plasmidu pUC18, který se linearizuje trávením SmaI a potom se zpracuje alkalickou fosfatasou. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé klony se testují na přítomnost požadovaného plasmidu pPFL31. Nové NdeI místo ohraničující insert sousedí s EcoRI místem pUC18 polylinkeru, a nové BspEI místo sousedí s HindIII místem spojovacího regionu. Plasmid pPFL31 se identifikuje restrikční analýzou a analýzou sekvence.

Plasmid pPFL31 se tráví NdeI a AvrII a insert se liguje s plasmidem pPFL28, který se předem tráví NdeI a AvrII. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé klony se testují na přítomnost požadovaného plasmidu pPFL32. Plasmid pPFL32 se identifikuje restrikční analýzou.

Plasmid pPFL32 se tráví NdeI a XbaI a insert se liguje s plasmidem pCRJ24, který se předem tráví NdeI a XbaI a přečistí se gelovou elektroforesou. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé klony se testují na přítomnost požadovaného

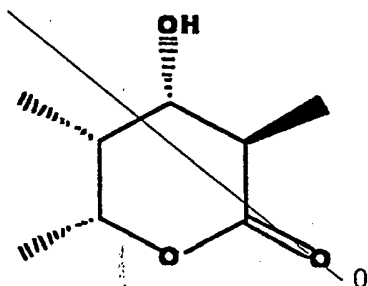
plasmidu pPFL35. Plasmid pPFL35 se identifikuje restriční analýzou.

#### Příklad 12: Příprava *S. erythraea* JC2/pPFL35

Plasmid pPFL35 se použije pro transformaci protoplastů *S. erythraea* JC2. Kolonie resistantní na thiostrepton se selektují v R2T20 mediu obsahujícím 10 µg/ml thiostreptonu. Několik kolonií se testuje na přítomnost pPFL35 integrovaného do chromosomu Southernovým přenosem jejich genomové DNA s DIG- značenou DNA obsahující rap PKS fragment kódující acyltransferasu modulu 2. Tímto způsobem se identifikuje klon s integrovanou kopií pPFL35.

#### Příklad 13: Produkce polyketidů za použití *S. erythraea* JC2/pPFL35

Zmrazená suspenze *S. erythraea* JC2/pPFL35 se naočkuje do eryP media obsahujícího 5 µg/ml thiostreptonu a nechá se růst po dobu 7 dnů při 28–30 °C. Po této době se medium přefiltruje pro odstranění mycelií a pH se upraví na pH = 3,0. Medium se extrahuje dvakrát dvěma objemy ethylacetatu a kombinované extrakty se promyjí stejným objemem nasyceného roztoku chloridu sodného, suší se přes bezvodý síran sodný a ethylacetat se odstraní za redukováného tlaku, za zisku surového materiálu. Získaný materiál má vzorec uvedený dále a podle MS, GC-MS a <sup>1</sup>H-NMR je identický a autentickým materiálem.



Příklad 14: Příprava *S. erythraea* NRRL2338/pPFL35

Plasmid pPFL35 se použije pro transformaci protoplastů *S. erythraea* NRRL2338. Kolonie resistantní na thiostrepton se selektují v R2T20 mediu (Yamamoto et al.) obsahujícím 10 µg/ml thiostreptonu. Několik klonů se testuje na přítomnost pPFL35 integrovaného do chromosomu Southernovou hybridizací jejich genomové DNA s DIG-značenou DNA obsahující rap PKS fragment kódující AT modulu 2. Tímto způsobem se selektuje klon s integrovanou kopií pPFL35.

Příklad 15: Produkce 13-methyl-erythromycinu A a B za použití *Sacch. erythraea* NRRL2338/pPFL35

Kultura *Saccharopolyspora erythraea* NRRL2338 (pPFL35), připravená s insertem oleandomycinové KSQ-rapamycinové AT2-D1TE DNA místo přirozené zaváděcí domény, jak bylo popsáno v příkladu 14, se naočkuje do 30 ml vodného media s 50 µg/ml thiostreptonu v 300 ml Erlenmeyerově baňce. Po třech dnech inkubace při 29 °C se tato baňka použije pro inokulaci 300 ml ERY-P media v 300 ml baňce. Medium se inkubuje při 29 °C a 200 rpm po dobu 6 dnů. V tuto dobu se pH media upraví pomocí NaOH na 8,5 a medium se extrahuje stejným objemem ethylacetatu. Ethylacetatový extrakt se odpaří do sucha při 45 °C za použití proudu dusíku v Zymark TurboVap LV odpařovacím přístroji a potom se rekonstituuje v 0,25 objemech methanolu pro 4-násobné zahuštění extraktu. Struktura produktů se potvrdí LC/MS, způsobem A. Jako hlavní složka se pozoruje pík při retenčním čase 4,0 minuty, s m/z hodnotou 720 (M+H)<sup>+</sup>, odpovídající 13-methyl-erythromycinu A (C<sub>36</sub>H<sub>65</sub>NO<sub>13</sub>). Druhý pík má retenční čas 6,4 minuty a m/z hodnotu 704 (M+H)<sup>+</sup>, což odpovídá 13-methyl-erythromycinu B (C<sub>36</sub>H<sub>65</sub>NO<sub>12</sub>).

pPFL44 je plasmid na bázi pCJR24 obsahující gen kódující hybridní polyketid-synthasu, která obsahuje zaváděcí modul spiramycinové PKS, erythromycinové prodlužovací moduly 1 a 2 a thioesterasu ukončující řetězec. Plasmid pPFL44 se připraví následujícím způsobem:

se použijí pro amplifikaci DNA kódující zaváděcí modul pro spiramycin za použití chromosomální DNA ze *S. ambofaciens* produkující spiramycin připravené způsobem popsáným v Hopwood et al., (1985). PCR produkt velikosti 3,3 kb se přečistí gelovou elektroforezou, zpracuje se T4 polynukleotidkinasou a liguje se do plasmidu pUC18, který se předem linearizuje trávením SmaI a potom se zpracuje alkalickou fosfatasou. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé klony se testují na přítomnost požadovaného plasmidu pPFL41. Plasmid pPFL41 se identifikuje podle charakteru restričního trávení a podle analýzy sekvence.

Plasmid pPFL41 se tráví NdeI a NheI a 3,3 kb fragment se přečistí gelovou elektroforesou a liguje se do plasmidu pND30 (plasmid odvozený od pND30 obsahující jako insert ave PKS zaváděcí modul a prodlužovací moduly 1 a 2 nebo DEBS a DEBS thioesterasu) (PCT/GB97/01810), který se předem tráví NdeI a NheI a potom se zpracuje alkalickou fosfatasou. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních E. coli DH10B buněk a jednotlivé klony se testují na přítomnost požadovaného

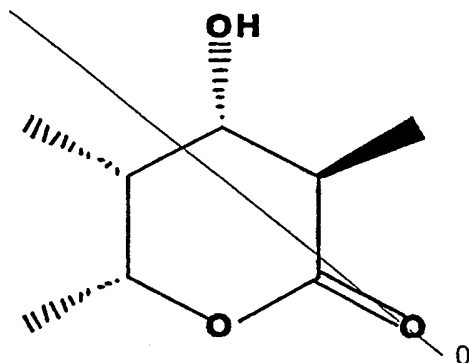
plasmidu pPFL44. Plasmid pPFL44 se identifikuje podle charakteru restrikčního trávení.

#### Příklad 17: Příprava *S. erythraea* JC2/pPFL44

Plasmid pPFL44 se použije pro transformaci protoplastů *S. erythraea* JC2. Kolonie resistantní na thiostrepton se selektují v R2T20 mediu obsahujícím 10 µg/ml thiostreptonu. Několik kolonií se testuje na přítomnost pPFL44 integrovaného do chromosomu Southernovým přenosem jejich genomové DNA s DIG- značenou DNA obsahující srm PKS fragment kódující zaváděcí modul. Tímto způsobem se identifikuje klon s integrovanou kopií pPFL44.

#### Příklad 18: Produkce polyketidů za použití *S. erythraea* JC2/pPFL44

Zmrazená suspenze *S. erythraea* JC2/pPFL44 se naočkuje do eryP media obsahujícího 5 µg/ml thiostreptonu a nechá se růst po dobu 7 dnů při 28–30 °C. Po této době se medium přefiltruje pro odstranění mycelií a pH se upraví na pH = 3,0. Medium se extrahuje dvakrát dvěma objemy ethylacetatu a kombinované extrakty se promyjí stejným objemem nasyceného roztoku chloridu sodného, suší se přes bezvodý síran sodný a ethylacetat se odstraní za redukováného tlaku, za zisku surového materiálu. Získaný materiál má vzorec uvedený dále a podle MS, GC-MS a <sup>1</sup>H-NMR je identický a autentickým materiálem:



### Příklad 19: Příprava *S. erythraea* NRRL2338/pPFL44

Plasmid pPFL44 se použije pro transformaci protoplastů *S. erythraea* NRRL2338. Kolonie resistantní na thiostrepton se selektují v R2T20 mediu obsahujícím 10 µg/ml thiostreptonu. Několik kolonií se testuje na přítomnost pPFL44 integrovaného do chromosomu Southernovou hybridizací jejich genomové DNA s DIG-značenou DNA obsahující fragment spiramycinové PKS kódující zaváděcí modul. Tímto způsobem se selektuje klon s integrovanou kopií pPFL44.

### Příklad 20: Produkce 13-methyl-erythromycinu A a B za použití *Sacch. erythraea* NRRL2338/pPFL44

Kultura *Saccharopolyspora erythraea* NRRL2338 (pPFL44), připravená s insertem DNA spiramycinového zaváděcího modulu - D1TE místo přirozené zaváděcí domény, se naočkuje do 30 ml vodného media s 50 µg/ml thiostreptonu v 300 ml Erlenmeyerově baňce. Po třech dnech inkubace při 29 °C se tato kultura použije pro inokulaci 300 ml ERY-P media v 300 ml baňce. Medium se inkubuje při 29 °C a 200 rpm po dobu 6 dnů. V tuto dobu se pH media upraví pomocí NaOH na 8,5 a medium se extrahuje stejným objemem ethylacetatu. Ethylacetatový extrakt se odpaří do sucha při 45 °C za použití proudu dusíku v Zymark TurboVap LV odpařovacím přístroji a potom se rekonstituuje v 0,0625 objemech methanolu pro 16-násobné zahuštění extraktu. Struktura produktů se potvrdí LC/MS, způsobem A. Jako hlavní složka se pozoruje pík při retenčním čase 4,0 minuty, s m/z hodnotou 720 (M+H)<sup>+</sup>, odpovídající 13-methyl-erythromycinu A (C<sub>36</sub>H<sub>65</sub>NO<sub>13</sub>). Druhý pík má retenční čas 6,4 minuty a m/z hodnotu 704 (M+H)<sup>+</sup>, což odpovídá 13-methyl-erythromycinu B (C<sub>36</sub>H<sub>65</sub>NO<sub>12</sub>).

### Příklad 21: Příprava plasmidu pJLK114

pJLK114 je plasmid na bázi pCJR24 obsahující PKS gen obsahující ery zaváděcí modul, první a druhý prodlužovací modul ery PKS a ery thioesterasu ukončující řetězec s tou výjimkou, že segment DNA mezi koncem acyltransferasy a začátkem ACP druhého ery prodlužovacího modulu je substituován syntetickým spojovacím oligonukleotidem obsahujícím rozpoznávací místa pro následující restriční enzymy: AvrII, BglII, SnaBI, PstI, SpeI, NsiI, Bsu36I a HpaI. Přípraví se následujícím způsobem přes postupné plasmidy (obr. 6).

#### Příprava plasmidu pJLK02

Přibližně 1,47 kb DNA fragment eryAI genu *S. erythraea* se amplifikuje PCR za použití následujících syntetických oligonukleotidů jako primerů:

5'-TACCTAGGCCGGGCCGGACTGGTCGACCTGCCGGGT-3', a

5'-ATGTTAACCGGTCGCGCAGGCTCTCCGTCT-3',

a plasmidu pNTEP2 (Oliynyk, M. et al., Chemistry and Biology (1996) 3: 833-839; WO98/01546) jako templátu. PCR produkt se zpracuje T4 polynukleotidkinasou a liguje se do plasmidu pUC18, který se předem linearizuje trávením SmaI a potom se zpracuje alkalickou fosfatasou. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé klony se testují na přítomnost požadovaného plasmidu. Plasmid pJLK02 se identifikuje podle charakteru restričního trávení a sekvenováním DNA.

#### Příprava plasmidu pJLK03

Přibližně 1,12 kb DNA fragment eryAI genu *S. erythraea* se amplifikuje PCR za použití následujících syntetických oligonukleotidů jako primerů:

5'-ATGTTAACGGGTCTGCCGCGTGCCGAGCGGAC-3', a

5'-CTTCTAGACTATGAATTCCTCCGCCCAGC-3',

a plasmidu pNTEPH jako templátu. PCR produkt se zpracuje T4 polynukleotidkinasou a liguje se do plasmidu pUC18, který se předem linearizuje trávením SmaI a potom se zpracuje alkalickou fosfatasou. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních E. coli DH10B buněk a jednotlivé kolonie se testují na přítomnost požadovaného plasmidu. Plasmid pJLK03 se identifikuje podle charakteru restričního trávení a sekvenováním DNA.

#### Příprava plasmidu pJLK04

Plasmid pJLK02 se tráví PstI a HpaI a 1,47 kb insert se liguje s plasmidem pJLK03, který se předem tráví PstI a HpaI. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních E. coli DH10B buněk a jednotlivé kolonie se testují na přítomnost požadovaného plasmidu. Plasmid pJLK04 se identifikuje podle charakteru restričního trávení.

#### Příprava plasmidu pJLK05

Plasmid pJLK01 (PCT/GB97/01819) se tráví PstI a AvrII a 460 b insert se liguje s plasmidem pJLK04, který se předem tráví PstI a AvrII. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních E. coli DH10B buněk a jednotlivé kolonie se testují na přítomnost požadovaného plasmidu. Plasmid pJLK05 se identifikuje podle charakteru restričního trávení.

#### Příprava plasmidu pJLK07

Plasmid pJLK05 se tráví ScaI a XbaI a plasmid pNTEPH se tráví NdeI a ScaI a tyto dva fragmenty se ligují s plasmidem

pCJR24, který se předem tráví NdeI a XbaI. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních E. coli DH10B buněk a jednotlivé kolonie se testují na přítomnost požadovaného plasmidu. Plasmid pJLK07 se identifikuje podle charakteru restrikčního trávení.

#### Příprava plasmidu pJLK114

Dva syntetické oligonukleotidy Plf a Plb (obr. 7) se každý rozpustí v TE-pufu. 10 µg každého roztoku (0,5 nmol/µl) se smísí a směs se zahřívá po dobu 2 minut při 65 °C a potom se pomalu ochladí na teplotu okolí. Plasmid pJLK07 se tráví AvrII a HpaI a liguje se s tepelně zpracovanými oligonukleotidy. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních E. coli DH10B buněk a jednotlivé kolonie se testují na přítomnost požadovaného plasmidu. Plasmid pJLK114 se identifikuje podle charakteru restrikčního trávení.

pJLK117 je plasmid na bázi pCJR24 obsahující PKS gen obsahující ery zaváděcí modul, první a druhý prodlužovací modul ery PKS a ery thioesterasu ukončující řetězec s tou výjimkou, že segment DNA mezi koncem acyltransferasy a začátkem ACP druhého ery prodlužovacího modulu je substituován syntetickým spojovacím oligonukleotidem obsahujícím rozpoznávací místa pro následující restrikční enzymy: AvrII, BglII, SnaBI, PstI, SpeI, NsiI, Bsu36I a NheI.

Připraví se následujícím způsobem přes postupné plasmidy (obr. 6).

#### Příprava plasmidu pJLK115

Plasmid pJLK114 se tráví NdeI a XbaI a přibližně 9,9 kb insert se liguje s plasmidem pUC18, který se předem tráví NdeI a XbaI. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních E. coli DH10B buněk a jednotlivé kolonie se testují na přítomnost požadovaného plasmidu. Plasmid pJLK115 se identifikuje podle charakteru restrikčního trávení.

#### Příprava plasmidu pJLK116

Plasmid pJLK13 (PCT/GB97/01819) se tráví Bsu36I a XbaI a 1,1 kb fragment se liguje s plasmidem pJLK115, který se předem tráví Bsu36I a XbaI. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních E. coli DH10B buněk a jednotlivé kolonie se testují na přítomnost požadovaného plasmidu. Plasmid pJLK116 se identifikuje podle charakteru restrikčního trávení.

#### Příprava plasmidu pJLK117

Plasmid pJLK116 se tráví NdeI a XbaI a 9,9 kb fragment se liguje s plasmidem pCJR24, který se předem tráví NdeI a XbaI. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních E. coli DH10B buněk a jednotlivé kolonie se testují na přítomnost požadovaného plasmidu. Plasmid pJLK117 se identifikuje podle charakteru restrikčního trávení.

#### Příklad 22: Příprava plasmidu pJLK29

pJLK29 je plasmid na bázi pJLK117 s tou výjimkou, že DNA fragment kódující redukční smyčku modulu 10 rap PKS se inseruje do mcs. Připraví se následujícím způsobem přes postupné plasmidy (obr. 5).

#### Příprava plasmidu pJLK121.1

Přibližně 2,2 kb DNA fragment rapB genu *S. hygroscopicus* kódující redukční smyčku modulu 10 se amplifikuje PCR za použití následujících syntetických oligonukleotidů jako primerů:

5'-TAAGATCTTCCGACGTACGCGTTCCAGC-3', a

5'-ATGCTAGCCACTGCGCCGACGAATCACCGGTGG-3',

a přibližně 7 kb fragmentu získaného trávením kosmidu cos 26 (Schwecke, T. et al., (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7839-7843) ScaI a SphI jako templátu. PCR produkt se zpracuje T4 polynukleotidkinasou a liguje se do plasmidu pUC18, který se předem linearizuje trávením SmaI a potom se zpracuje alkalickou fosfatasou. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé kolonie se testují na přítomnost požadovaného plasmidu. Plasmid pJLK121.1 se identifikuje podle charakteru restričního trávení a sekvenováním DNA.

#### Příprava plasmidu pJLK29

Plasmid pJLK121.1 se tráví BglII a NheI a 2,2 kb fragment se liguje s plasmidem pJLK117, který se předem tráví BglII a NheI. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé kolonie se testují na přítomnost požadovaného plasmidu. Plasmid pJLK29 se identifikuje podle charakteru restričního trávení.

#### Příklad 24: Příprava plasmidu pJLK50

Přibližně 6,1 kb DNA fragment genového seskupení erythromycinové PKS *S. erythraea* v rozsahu od začátku ACP modulu 2 do začátku ACP modulu 3 se amplifikuje PCR za použití následujících syntetických oligonukleotidů jako primerů:

5'-TACCTGAGGGACCGGCTAGCGGGTCTGCCGCGTG-3', a

5'-ATGCTAGCCGTTGTGCCGGCTCGCCGGTTCGGTCC-3'

a plasmidu pBAM25 (publikovaný pBK25, Best, D.J. et al., Eur. J. Biochem. (1992) 204: 39-49) jako templátu. PCR produkt se zpracuje T4 polynukleotidkinasou a liguje se do plasmidu pUC18, který se předem linearizuje trávením SmaI a potom se zpracuje alkalickou fosfatasou. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních E. coli DH10B buněk a jednotlivé klony se testují na přítomnost požadovaného plasmidu. Plasmid pJLK50 se identifikuje podle charakteru restričního trávení a sekvenováním DNA.

#### Příklad 25: Příprava kmene JLK10 S. erythraea

Kmen JLK10 je variantou kmene NRRL2338, ve kterém je redukční smyčka ery modulu 2 (tj. KR doména) nahrazena redukční smyčkou rapamycinového modulu 10. Připraví se za použití plasmidu pJLK54, který se připraví následujícím způsobem.

#### Příprava plasmidu pJLK54

pJLK54 je plasmid na bázi pJLK29 obsahující PKS gen obsahující ery zaváděcí modul, první, druhý a třetí prodlužovací modul ery genového seskupení a ery thioesterasu ukončující řetězec s tou výjimkou, že segment DNA mezi koncem acyltransferasy a začátkem ACP druhého ery prodlužovacího modulu je substituován ekvivalentním segmentem modulu 10 rapamycinové PKS. Připraví se následujícím způsobem:

Plasmid pJLK50 se tráví NheI a přibližně 6,1 kb insert se liguje s plasmidem pJLK29, který se předem tráví NheI. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních E. coli DH10B buněk a jednotlivé kolonie se testují na přítomnost

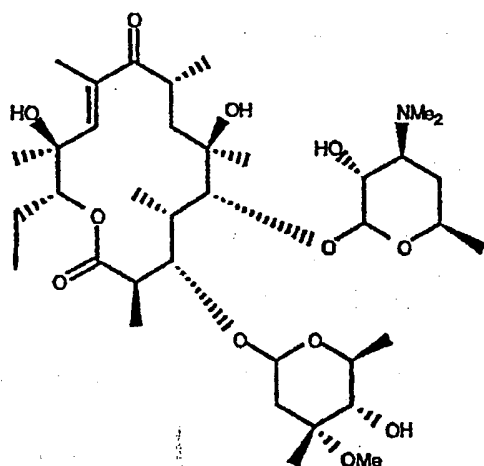
požadovaného plasmidu. Plasmid pJLK54 se identifikuje podle charakteru restrikčního trávení.

Použití plasmidu pJLK54 pro přípravu *S. erythraea* NRRL2338/pJLK54 a produkci TKL derivátů

Přibližně 5 µg plasmidu pJLK54 se použije pro transformaci protoplastů *S. erythraea* NRRL2338 a izolují se stabilní kolonie resistantní na thiostrepton. Z několika kolonií se získá celková DNA a analyzuje se Southernovou hybridizací pro potvrzení toho, že plasmid byl integrován do TE.

Příprava kmene JLK10 *S. erythraea* a jeho použití pro produkci 13-methyl-10,11-dehydro-erythromycinu A

Kmen JLK10 *S. erythraea* je mutant *S. erythraea* NRRL2338, ve kterém je "redukční smyčka" ery modulu 2, tj. ketoreduktasová doména, substituována "redukční smyčkou" rapamycinového modulu 10. Připraví se ze *S. erythraea* kmene NRRL2338, do kterého se integruje plasmid pJLK54. *S. erythraea* NRRL2338 se podrobí několika kolům neselektivní kultivace, která vede ke druhému křížení současně se ztrátou integrovaného plasmidu. Klony, ve kterých dojde k nahrazení erythromycinového genu kódujícího DEBS1 mutantní verzí se identifikují Southernovou hybridizací. Jeden z těchto klonů se označí jako kmen JLK10 *S. erythraea* a použije se k naočkování SM3 media (eryP medium dává stejné výsledky) a nechá se růst po dobu 7 až 10 dnů při 28–30 °C. Po této době se medium odstředí a pH supernatantu se upraví na pH 9. Supernatant se potom extrahuje třikrát stejným objemem ethylacetatu a rozpouštědlo se odstraní odpařením. Získaný materiál se analyzuje HPLC/MS, MS/MS a 1H-NMR. Identifikuje se následující makrolid, C-13 methyl-erythromycin A (spolu s produkty neúplného zpracování post-PKS enzymy).



#### Příklad 26: Příprava plasmidu pPFL50

Plasmid pPFL50 je plasmid na bázi pPFL43, ze kterého se odstraní DNA fragment kódující KR1 (částečně), ACP1 a modul 2 erythromycinové PKS a erythromycinová TE. Připraví se následujícím způsobem. Plasmid pPFL43 se tráví SfuI a XbaI pro odstranění 6,5 kb fragmentu. 5' přesahující konec se doplní Klenowovým fragmentem DNA polymerasy I a plasmid se recirkularizuje. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé kolonie se testují na přítomnost požadovaného plasmidu. Plasmid pPFL50 se identifikuje podle charakteru restriktivního trávení.

#### Příprava *S. erythraea* JLK10/pPFL50

Přibližně 5  $\mu$ g plasmidu pPFL50 se použije pro transformaci protoplastů *S. erythraea* kmene JLK10 a izolují se stabilní kolonie resistantní na thiostrepton. Z několika kolonií se získá celková DNA a analyzuje se Southernovou hybridizací pro potvrzení toho, že plasmid byl integrován do homologního regionu chromosomální DNA. Kmen JLK10/pPFL50 *S. erythraea* se použije k naočkování SM3 media obsahujícího 5  $\mu$ g/ml

thiostreptonu (eryP medium obsahující 5 µg/ml thiostreptonu dává stejné výsledky) a nechá se růst po dobu 7 až 10 dnů při 28–30 °C. Po této době se medium odstředí a pH supernatantu se upraví na pH 9. Supernatant se potom extrahuje třikrát stejným objemem ethylacetatu a rozpouštědlo se odstraní odpařením. Získaný materiál se analyzuje HPLC/MS, MS/MS a 1H-NMR. Identifikuje se následující makrolid, C-13 methyl-10,11-dehydro-erythromycin A (spolu s produkty neúplného zpracování post-PKS enzymy).

#### Příprava *S. erythraea* NRRL2338/pPFL50

Přibližně 5 µg plasmidu pPFL50 se použije pro transformaci protoplastů *S. erythraea* NRRL2338 a izolují se stabilní kolonie resistantní na thiostrepton. Z několika kolonií se získá celková DNA a analyzuje se Southernovou hybridizací pro potvrzení toho, že plasmid byl integrován do homologního regionu chromosomální DNA. Kmen NRRL2338/pPFL50 *S. erythraea* se použije k naočkování SM3 media obsahujícího 5 µg/ml thiostreptonu (eryP medium obsahující 5 µg/ml thiostreptonu dává podobné výsledky) a nechá se růst po dobu 7 až 10 dnů při 28–30 °C. Po této době se medium odstředí a pH supernatantu se upraví na pH 9,5. Supernatant se potom extrahuje třikrát stejným objemem ethylacetatu a rozpouštědlo se odstraní odpařením. Získaný materiál se analyzuje HPLC/MS, MS/MS a 1H-NMR. Identifikuje se následující makrolid, C-13 methyl-erythromycin A (spolu s produkty neúplného zpracování post-PKS enzymy).

#### Příprava plasmidu pCB121

pCB121 je plasmid obsahující monensinový zaváděcí modul a KS monensinového modulu 1, po kterém následuje AT

erythromycinového modulu 1 a část KR erythromycinového modulu 1. Připraví se následujícím způsobem přes postupné plasmidy.

#### Příprava plasmidu pPFL45

Přibližně 1,8 kb DNA segment genového seskupení monensinové PKS *Streptomyces cinnamomensis* kódující část ACP zaváděcího modulu a KS modulu 1 se amplifikuje PCR za použití následujících syntetických oligonukleotidů jako primerů:

5'-CGTTCCTGAGGTCGCTGGCCCAGGCGTA-3', a

5'-CGAAGCTTGACACCGCGGCGGCGGCGG-3',

a kosmidu obsahujícího 5' konec genů monensinové PKS ze *S. cinnamomensis* nebo alternativně chromosomální DNA *S. cinnamomensis* jako templátu. PCR produkt se zpracuje T4 polynukleotidkinasou a liguje se do plasmidu pUC18, který se předem linearizuje trávením *Sma*I a potom se zpracuje alkalickou fosfatasou. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé klony se testují na přítomnost požadovaného plasmidu. Plasmid pPFL45 se identifikuje podle charakteru restriktivního trávení.

#### Příprava plasmidu pPFL47

Plasmid pPFL45 se tráví *Nde*I a *Bsu*36I a přibližně 2,6 kb fragment se liguje do plasmidu pPFL43, který se předem tráví *Nde*I a *Bsu*36I. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé kolonie se testují na přítomnost požadovaného plasmidu. Plasmid pPFL47 se identifikuje podle charakteru restriktivního trávení.

#### Příprava plasmidu pCB135

Plasmid pCJR24 se tráví HindIII, 5' přesahující část se doplní Klenowovým fragmentem DNA polymerasy I a religuje se. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé kolonie se testují na přítomnost požadovaného plasmidu. Plasmid pCB135 se identifikuje podle charakteru restričního trávení, při kterém chybí rozpoznávací místo pro HindIII.

#### Příprava plasmidu pKSW1

Plasmid pKS1W je vektor odvozený od pNTEP2 (GB97/01810) obsahující triketid synthasu odvozenou od DEBS1TE s jedinečnými restričními místy vloženými do okrajů KS1. Plasmid pKS1W se připraví přes následující postupné plasmidy.

#### Příprava plasmidů pM009, pM010 a pM013

Pro PCR amplifikaci pro plasmid pM009 se následující syntetické oligonukleotidy použijí jako mutagenní primery, kde jeden z těchto oligonukleotidů obsahuje MunI místo a druhý obsahuje PstI místo.

5'-GCGCGCCAATTGCGTGACATCTCGAT-3', a

5'-CCTGCAGGCCATCGCGACGACCGGTTGCGCG-3'.

Pro PCR amplifikaci pro plasmid pM010 se následující syntetické oligonukleotidy použijí jako mutagenní primery, kde jeden z těchto oligonukleotidů obsahuje HindIII místo a druhý obsahuje EcoRV místo.

5'-GTCTCAAGCTTCGGCATCAGCGGCACCAA-3', a

5'-CGTGCGATATCCCTGCTCGGCGAGCGCA-3'.

Pro PCR amplifikaci pro plasmid pM013 se následující syntetické oligonukleotidy použijí jako mutagenní primery, kde jeden z těchto oligonukleotidů obsahuje PstI místo a druhý obsahuje HindIII místo.

5'-GATGGCCTGCAGGCTGCCCCGGCGGTGTGAGCA-3', a

5'-GCCGAAGCTTGAGACCCCCGCGGCGCGGTGCGC-3'

PCR se provede za použití pNTEP2 (GB97/01810) jako templátu za použití Pwo DNA polymerasy a jednoho cyklu: 96 °C, 1 minuta; tepelné zpracování při 50 °C, 3 minuty; a prodloužení při 72 °C, 1 minuta; a 25 cyklů: 96 °C, 1 minuta; tepelné zpracování při 50 °C, 3 minuty; a prodloužení při 72 °C, 1 minuta, za přítomnosti 10% (obj./obj.) dimethylsulfoxidu. U získaného materiálu se opraví konce a materiál se klonuje do pUC18 tráveného SmaI a ligační směs se transformuje do E. coli DH10B. Z jednotlivých kolonií se připraví plasmidová DNA. Požadované plasmidy pro pM009 (3,8 kb), pM010 (3,9 kb) a pM013 (4,3 kb) se identifikují podle charakteru restričního trávení a sekvenováním DNA.

#### Příprava plasmidu pM011

Plasmid pM013 se tráví HindIII a 1,2 kb insert se klonuje do pM010, který se předem tráví HindIII. Ligační směs se transformuje do E. coli DH 10B. Požadovaný plasmid (5,0 kb) se identifikuje podle charakteru restričního trávení a označí se pM011.

#### Příprava plasmidu pM012

Plasmid pM009 se tráví PstI a 1,6 kb insert se klonuje do pM011, který se předem tráví PstI. Ligační směs se transformuje do E. coli DH 10B. Požadovaný plasmid (6,6 kb) se identifikuje podle charakteru restričního trávení a označí se pM012.

#### Příprava plasmidu pKS1W

Plasmid pM012 se tráví MunI a EcoRV a 3,9 kb fragment se klonuje do pNTEPH (viz dále), který se předem tráví MunI a EcoRV. Ligační směs se transformuje do E. coli DH 10B. Požadovaný plasmid (13, kb) se identifikuje podle charakteru restričního trávení a označí se pKS1W.

#### Příprava pNTEPH

Plasmid pNTEPH se získá z pNTEP2 odstraněním HindIII místa. pNTEP2 se tráví HindIII, 5' přesah se doplní Klenowovým fragmentem DNA polymerasy I a religuje se. Požadovaný plasmid (13,6 kb) se identifikuje podle charakteru restričního trávení.

#### Příprava plasmidu pCB136

Plasmid pKSW1 se tráví NdeI a XbaI a přibližně 11,2 kb fragment se liguje s plasmidem pCB135, který se předem tráví NdeI a XbaI. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních E. coli DH10B buněk a jednotlivé kolonie se testují na přítomnost požadovaného plasmidu. Plasmid pCB136 se identifikuje podle charakteru restričního trávení.

#### Příprava plasmidu pCB137

Plasmid pCB136 se tráví SfuI a XbaI pro odstranění 6,5 kb fragmentu. 5' přesah se doplní Klenowovým fragmentem DNA polymerasy I a religuje se. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé kolonie se testují na přítomnost požadovaného plasmidu. Plasmid pCB137 se identifikuje podle charakteru restričního trávení.

#### Příprava plasmidu pCB121

Plasmid pPFL47 se tráví NdeI a HindIII a přibližně 4,4 kb fragment se liguje s plasmidem pCB137, který se předem tráví NdeI a HindIII. Ligační směs se použije pro transformaci elektrokompetentních *E. coli* DH10B buněk a jednotlivé kolonie se testují na přítomnost požadovaného plasmidu. Plasmid pCB121 se identifikuje podle charakteru restričního trávení.

#### Příklad: Příprava *S. erythraea* JLK10/pPFL50

Přibližně 5 µg plasmidu pCB121 se použije pro transformaci protoplastů *S. erythraea* JLK10 a izolují se stabilní kolonie resistantní na thiostrepton. Z několika kolonií se získá celková DNA a analyzuje se Southernovou hybridizací pro potvrzení toho, že plasmid byl integrován do homologního regionu chromosomální DNA. Kmen JLK10/pCB121 *S. erythraea* se použije k naočkování SM3 media obsahujícího 5 µg/ml thiostreptonu (eryP medium obsahující 5 µg/ml thiostreptonu dává podobné výsledky) a nechá se růst po dobu 7 až 10 dnů při 28-30 °C. Po této době se medium odstředí a pH supernatantu se upraví na pH 9. Supernatant se potom extrahuje třikrát stejným objemem ethylacetatu a rozpouštědlo se odstraní odpařením. Získaný materiál se analyzuje HPLC/MS, MS/MS a 1H-NMR. Identifikuje se makrolid C-13 methyl-10,11-dehydro-

-erythromycin A (spolu s produkty neúplného zpracování post-  
PKS enzymy).

Příklad: Příprava *S. erythraea* NRRL2338/pCB121

Přibližně 5 µg plasmidu pCB121 se použije pro transformaci protoplastů *S. erythraea* NRRL2338 a izolují se stabilní kolonie resistantní na thiostrepton. Z několika kolonií se získá celková DNA a analyzuje se Southernovou hybridizací pro potvrzení toho, že plasmid byl integrován do homologního regionu chromosomální DNA. Kmen NRRL2338/pCB121 *S. erythraea* se použije k naočkování SM3 media obsahujícího 5 µg/ml thiostreptonu (eryP medium obsahující 5 µg/ml thiostreptonu dává podobné výsledky) a nechá se růst po dobu 7 až 10 dnů při 28-30 °C. Po této době se medium odstředí a pH supernatantu se upraví na pH 9. Supernatant se potom extrahuje třikrát stejným objemem ethylacetatu a rozpouštědlo se odstraní odpařením. Získaný materiál se analyzuje HPLC/MS, MS/MS a 1H-NMR. Identifikuje se makrolid C-13 methyl-erythromycin A (spolu s produkty neúplného zpracování post-PKS enzymy).

Ačkoliv je předkládaný vynález dokreslen příklady uvedenými výše, není jimi nijak omezen. Popis uvedený výše poprvé popisuje přípravu genového uskupení PKS typu I obsahující zcela nebo částečně heterologní zaváděcí modul obsahující KSq a jeho použití pro získání polyketidových produktů, které jsou použitelné jako meziprodukty nebo jako biologicky aktivní materiály, jako jsou antibiotika. Odborníkům v oboru bude jasné, že zcela nebo částečně heterologní zaváděcí modul obsahující KSq z jiné genové sestavy PKS může být použit pro nahrazení zaváděcího modulu DEBS, nebo může být vložen do jiné sestavy PKS genů. Odborníkům v oboru bude také jasné, že specifická způsobená účinnějším rozlišením mezi

methylnalonyl-CoA a malonyl CoA na ATq, následovaná specifickou dekarboxylací prostřednictvím KSq, je výhodnější než nedokonalé rozlišení mezi propionyl-CoA a acetyl-CoA, které je vlastní zaváděcímu modulu DEBS a mnoha jiným zaváděcím modulům PKS v tom, že maximalizuje produkci jednoho produktu vzhledem ke směsi lišící se v charakteru počáteční jednotky. Eliminace takových směsí zvyšuje výtěžek a eliminuje potřebu pracných a obtížných separačních postupů.

19.01.01

PVL 1010-49/2

~~4839~~

## P a t e n t o v é   n á r o k y

1. Systém pro výrobu polyketidů obsahujících v podstatě výlučně požadovanou počáteční jednotku v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje PKS multienzym, který obsahuje zaváděcí modul a více prodlužovacích modulů; kde uvedený zaváděcí modul je upraven tak, aby zaváděl volitelně substituovaný malonylový zbytek a potom prováděl dekarboxylaci zavedeného zbytku pro dodání volitelně substituovaného acetylového zbytku, který je potom přenesen do blízkosti jednoho z uvedených prodlužovacích modulů; a kde uvedené prodlužovací moduly, nebo alespoň jeden z nich, nejsou přirozeně spojeny se zaváděcím modulem, který způsobuje dekarboxylaci, s podmínkou, že cílovým polyketidem není 14-členný makrolid obsahující 13-methylovou skupinu v důsledku inkorporace (nesubstituované) acetatové počáteční jednotky.

2. Systém podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený sousední prodlužovací modul, na který je acetatová počáteční jednotka přenesena, není za přirozeného stavu spojen se zaváděcím modulem, který provádí dekarboxylaci.

3. Systém podle nároku 1 nebo 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dekarboxylační funkce zaváděcího modulu je zprostředkována doménou ketosynthasového typu obsahující v aktivním místě glutaminový zbytek nebo jiný zbytek jiný než cystein.

4. Systém podle nároku 1 nebo 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dekarboxylační funkce zaváděcího modulu je zprostředkována doménou CLF-typu.

5. Systém podle jakéhokoliv z nároků 1 až 4  
v y z n a č u j í c í s e t í m, že zaváděcí funkce  
zaváděcího modulu je zprostředkována doménou  
acyltransferasového typu obsahující v aktivním místě  
argininový zbytek.
6. Systém podle jakéhokoliv z nároků 1 až 5  
v y z n a č u j í c í s e t í m, že zaváděcí modul obsahuje  
proteinový nosič pro acyl.
7. Systém podle jakéhokoliv z nároků 1 až 3, 5 nebo 6  
v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň KSq doména  
uvedeného zaváděcího modulu odpovídá zaváděcímu modulu PKS  
multienzymu pro oleandomycin, spiramycin, niddamycin,  
methymycin nebo monensin.
8. PKS multienzym exprimovatelný z DNA systému podle  
jakéhokoliv z nároků 1-7 nebo jeho varianta mající schopnost  
syntetizovat polyketidovou sloučeninu.
9. Nukleová kyselina kódující PKS multienzym podle nároku 8.
10. Vektor obsahující nukleovou kyselinu podle nároku 9.
11. Transformovaný organismus obsahující systém podle  
jakéhokoliv z nároků 1 až 7.
12. Způsob pro přípravu polyketidu v y z n a č u j í c í s e  
t í m, že obsahuje kultivaci organismu podle nároku 11 a  
získání polyketidu.
13. Systém, multienzym, nukleová kyselina, organismus nebo  
způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků

v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený polyketid je vybrán z:

- (a) 12- a 16-členných makrolidů s acetatovými počátečními jednotkami;
- (b) 12-, 14- a 16-členných makrolidů s propionatovými počátečními jednotkami;
- (c) variant rifamycinu, avermectinu, rapamycinu, immunomycinu a FK506 s acetatovými počátečními jednotkami nebo propionatovými počátečními jednotkami;
- (d) polyketidu, ve kterém počáteční jednotka vytváří vedlejší řetězec vybraný z allylu a hydroxymethylu.

14. Varianta původního polyketidu, která se liší od původního polyketidu ve vedlejším řetězci tvořeném počáteční jednotkou.

15. Způsob přípravy polyketidu II. typu v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kultivaci organismu obsahujícího polyketid-synthasu II. typu (PKS), kde přirozená synthasa obsahuje CLF doménu, která způsobuje dekarboxylaci vedoucí k tvorbě nežádoucích počátečních jednotek; kde uvedený organismus obsahuje PKS, která byla geneticky upravena tak, aby měla potlačenou dekarboxylační aktivitu uvedené CLF domény.

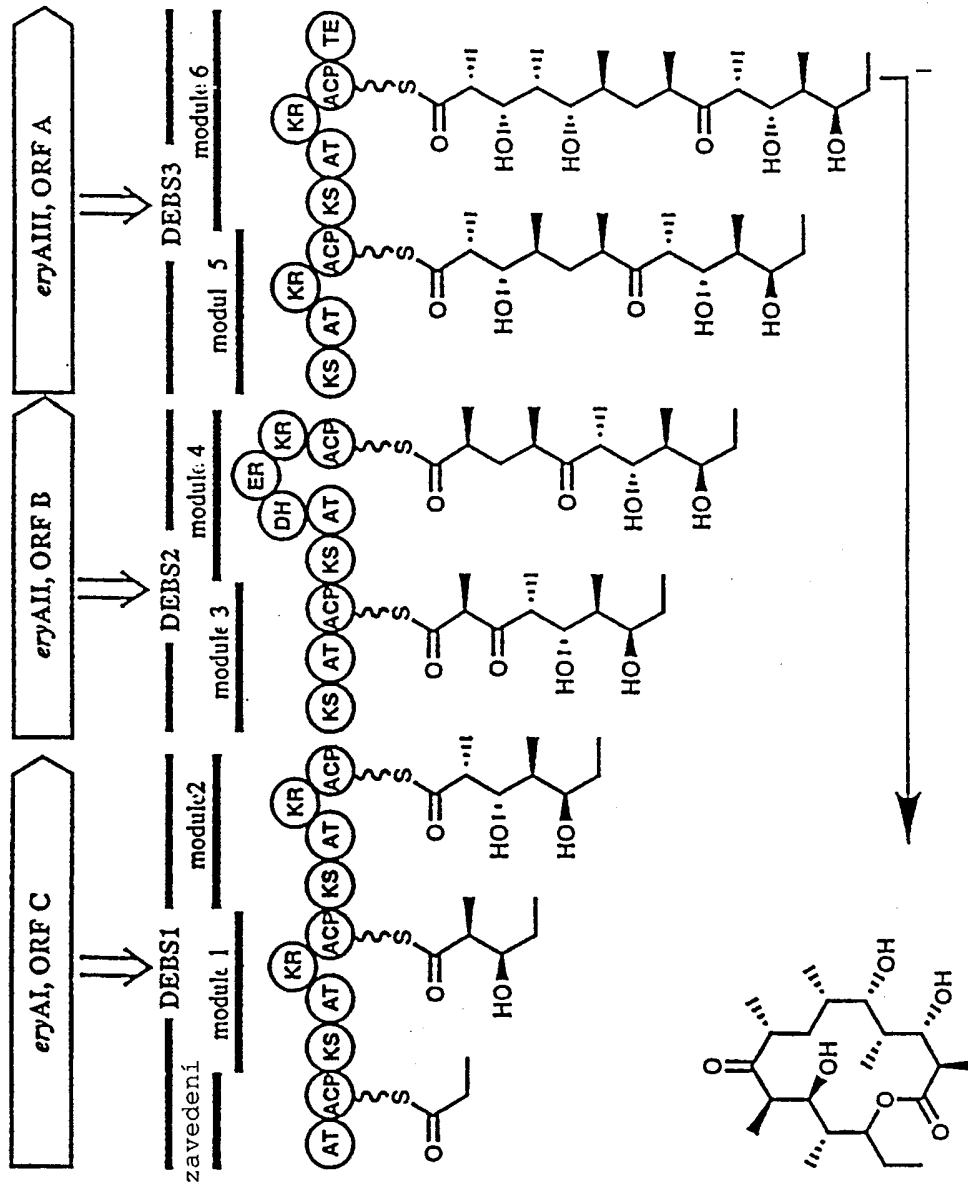
19.01.01

1/13

PV 6000-4912

4839

Erythromycinová PKS



190101

2/13

KCLFDAU  
KCLFPEU  
KCLFACT  
KCLFHIR  
KCLFGRA  
KCLFNOG  
KCLFTCM  
KCLFCIN  
KCLFVNZ  
KCLFWHIE  
KSGRA  
KSHIR  
KSACT  
KSCIN  
KSVNZ  
KSNOG  
KSTCM  
KSDAU  
KSPEU  
KSWHI

-----MVTGLGIVAPNGLGVGAIWDAVLNGRNGIGPLR  
MTGTAARTASSQLHASPAGRRGLRGRAVVTGLGIVAPNGLGVGAYWDAVLNGRNGIGPLR  
-----MSVLTITGVGVVAPNGLGLAPYWSAVLDGRHGLGPVT  
-----MSTWVTGMSGVAPNGLGADDDHWAATLKGRHGISRLS  
-----MSTPDRRRRAVVTGLSVAAPGGLGTERYWKSLLTGENGIAELS  
-----MTAAVVVTGLGVVAPTGLGVREHWSSTVRGASAIGPVT  
-----MSAPAPVVVTGLGIVAPNGLGTEEYWAATLAGKSGIDVIQ  
-----MTP-VAVTGMGIAAPNGLGRPTTGRPPWAPRAASAAST  
-----MSASVVVTGLGVAAPNGLGREDFWASTLGGKSGIGPLT  
-----MSGPQRTGTGGSSRAVVTGLGVLSPHGTGVEAHKAVADGTSSLGPVT  
-----MTRRVVTITGVGVRAPEGSGTKEFWDLLTAGRTATRPIS  
-----MTRRVVTITGVGVRAPEGGLGAKNFWELLTSGRTATRRIS  
-----MKRRVVTITGVGVRAPEGNGTRQFWELLTSGRTATRRIS  
-----MTQRRVAITGIEVLAPGGLGRKEFWQLLSEGRTATRGIT  
-----MTARRVVTITGIEVLAPGGTGSKAFWNLLSEGRTATRGIT  
-----MKESINRRVVTITGIGIVAPDATGVKPFWDLLTAGRTATRTIT  
-----MTRHAEKRVVTITGIGVRAPEGAGTAAFWDLLTAGRTATRTIS  
-----MNRRVVTITGMGVVAPGAIGIKSFWELLSGTTATRAIT  
-----MNRRVVTITGIGVAPGAVGTKPFWELLSGTTATRAIS  
-----MTRRRVAVTIGVGVAPGGIGTPQFWRLLESGRTATRRIS

\*\*\*: : : \* \*

KCLFDAU  
KCLFPEU  
KCLFACT  
KCLFHIR  
KCLFGRA  
KCLFNOG  
KCLFTCM  
KCLFCIN  
KCLFVNZ  
KCLFWHIE  
KSGRA  
KSHIR  
KSACT  
KSCIN  
KSVNZ  
KSNOG  
KSTCM  
KSDAU  
KSPEU  
KSWHI

RFADDGRLGRLAGEVSDFVP-EDHLPKRLLVQTDPMQMTALAAAEWALREAGCAPSS--  
RFTGDGRLGRLAGEVSDFVP-EDHLPKRLLAQTDPMQY-ALAAAEWALRESGCSPPSS--  
RFDVSRYPATLAGQIDDFHA-PDHI PGRLLPQTDPPSTRL-ALTAADWALQDAKADPES-L  
RFDPTGYPAELAGQVLDFDA-TEHLPKRLLPQTDVSTRF-ALAAAALWALADAEVDPAE-L  
RFDASRYPSRLAGQIDDFEA-SEHLP SRLLPQTDVSTRY-ALAAADWALADAGVGPESGL  
RFDAGRYPSKLAGEVPGFVP-EDHLP SRLMPQTDHMTL-ALVAADWAFQDAAVDPK-L  
RFDPHGYPVVRVGEVLAFDA-AAHLPGRLLPQTDRTMQH-ALVAAEWALADAGLEPEK-Q  
RFDPSGYPAQLAGEIPGFRA-AEHLPGRLVPQTDKVRTL-SLAAADWALADAGVEVAA-F  
RFDPTGYPARLAGEVPGFAA-EEHLP SRLLPQTDRTML-ALVAADWALADAGVRPEE-Q  
REGCAHLPLRVAGEVHGFDA-AETVEDRFLVQTDRTFHF-ALSATQH ALADARFGRADVD  
FFDASPFERSRIAGEI-DFDAVABGFSPREVRMDRATQF-AVACTRDALADSGLDLGA-L  
FFDPTPNRSQIAAEC-DFDPEHEGLSPREIRMDRAAQF-AVVCTRDADVADSGLEFEQ-V  
FFDPSPYRSQVAAEA-DFDPVABGFSPRELDMDRASQF-AVACAREFAASGLDPDT-L  
FFDPAPFRSKVAAEA-DFCGLENGSLPQEVRRMDRAAQF-AVVTAR-AVEDSGAELAA-H  
FFDPTPFERSRVAAEI-DFDPEAHGLSPQEIIRMDRAAQF-AVVAAR-AVADSGIDLAA-H  
AFDPSPFERSRIAAEC-DFDPLAEGLTPOQIRMDRATQF-AVVSARESLDGLDLGA-L  
LFDAAPYRSRIAGEI-DFDPIGEGLSRQASTYDRATQL-AVVCAREALKDSGLDPAA-V  
TFDATPFERSRIAAEC-DFDPVAAGLSAEQARRLDRAQF-ALVAGQEALTDGLRIGE-D  
TFDATPFERSRIAAEC-DFDPVAAGLSAEQARRLDRAQF-ALVAGQEALADSGLRIDE-D  
LFDPSGLRSQIAAEC-DFEPSDHGLGLATAQRCDRYVQF-ALVAAEAVRDANLDMNR-E

...: \* : : : : :

100101

3/13

KCLFDAU  
KCLFPEU  
KCLFACT  
KCLFHIR  
KCLFGRA  
KCLFNOG  
KCLFTCM  
KCLFCIN  
KCLFVNZ  
KCLFWHIE  
KSGRA  
KSHIR  
KSACT  
KSCIN  
KSVNZ  
KSNOG  
KSTCM  
KSDAU  
KSPEU  
KSWHI

-PLEAGVITASASGGFASGQRELQNLWSKG-----PAHVSAYMSFAWFY-AVNTGQIAIR  
-PLEAGVITASASGGFAFGQRELQNLWSKG-----PAHVSAYMSFAWFY-AVNTGQIAIR  
TDYDMGVVTANACGGFDFTHREFRKLWSEG-----PKSVSVYESFAWFY-AVNTGQISIR  
PEYGTGVTISNATGGFEFTHREFRKLWAGQ-----PEFVSUYESFAWFY-AVNTGQISIR  
DDYDLGVVTSTAQGGFDFTHREFHKLWSQG-----PAYVSUYESFAWFY-AVNTGQISIR  
PEYGVGVVTASSAGGFEFGHRELQNLWSLG-----PQYVSAYQSFADFY-AVNTGQVSIR  
DEYGLGVLTAAAGAGGFEFGQREMOKLWGTG-----PERVSAYQSFADFY-AVNTGQISIR  
DPLDMGVVTASHAGGFEFGQDELQKLLGQG-----QPVL SAYQSFADFY-AVNSGQISIR  
DDFTMGVVTAASAGGFEFGQELQKLWSQG-----SQYVSAYQSFADFY-AVNSGQISIR  
SPYSVGVVTAAGSGGGEFGQRELQNLWGHG-----SRHVGPYQSIADFY-AASTGQVSIR  
DPSRIGVALGSASASATSLENEYLVMSDSGRELVDPAHLSPMFDFYLSPGVMPAEVAVAWA  
PPERIGVSLGSASAAAATSLEREYLLLSDSGRDWEVDAAWLSRHMFDYLVPSVMPAEVAVAWA  
DPAHVGVSLGSASAAAATSLEREYLLLSDSGRDWEVDAAWLSRHMFDYLVPSVMPAEVAVAWA  
PPHRI GVVVGSASGATMGLDNEYRVVSDGGRDLVDHRYAVPHLYNYLVPSVMPAEVAVAWA  
DPYRVGVTVGSASGATMGLDEEYRVVSDGGRDLVDHAYAVPHLYDYMPVSSFAEVAVAWA  
DASRTGVVVGSAVGCTTSLLEEYAVVSDSGRNWLVDDGYAVPHLYDYFVPSVSSIAAEVAHD  
NPERIGVSI GTAVGCTTGLDREYARVSEGGSRWLVDDHLYAVEQLFDYFVPTSI CREVAWE  
SAHRVGVCVGTAVGCTQKLESEYVALSAGGANWVVDPHRGAPELYDYFVPSVSSIAAEVAWL  
SAHRVGVCVGTAVGCTQKLESEYVALSAGGAHWVVDPRGSGPELYDYFVPSVSSIAAEVAWL  
DPWRAGATLGTAVGGTTRLEHDYVLVSEGRSRWVDVDRRSEPHLERAFPTATLSSASAAEE

\* . . . . . \*



KCLFDAU  
KCLFPEU  
KCLFACT  
KCLFHIR  
KCLFGRA  
KCLFNOG  
KCLFTCM  
KCLFCIN  
KCLFVNZ  
KCLFWHIE  
KSGRA  
KSHIR  
KSACT  
KSCIN  
KSVNZ  
KSNOG  
KSTCM  
KSDAU  
KSPEU  
KSWHI

-HDLRGPVGVVVAEQAGGLDALAHAR-RKVRGGAE-LIVSGAMDSSLCP-YGMAAQVRSG  
-HDLRGPVGVVVAEQAGGLDALAHAR-RKVRGGAE-LIVSGAVDSSLCP-YGMAAQVKS  
-HGMRGPSALVAEQAGGLDALAHAR-RTIRRGTF-LVVSGGVDSALDP-WGWSVQIASG  
-HGLRGPVGVVVAEQAGGLDAIGHAR-RTVRRGPG-WCSAVASTRRSTR-GASSSQLSGG  
-NIMRGPSAALVGEQAGGLDAIGHAR-RTVRRGPG-WCSAVASTRRSTR-GASSSQLSGG  
-HGLRGPVGVVVAEQAGGLDALGQAR-RQLRRGLP-MVVGAVDGSFPCP-WGWSVQIASG  
-HGMRGHSSVFVTEQAGGLDAAHAA-RLLRKGTLTNTALTGGCEASLCP-WGLVAQIPSG  
-HGMKGPSGVVVSQAGGLDALAQAR-RLVRKGTP-LIVCGAVEPRAPGAGSPSSPAGG  
-NGMKGPSGVVVSQAGGLDALAQAR-RLVRKGTP-LIVCGAVEPRAPGAGSPSSPAGG  
-NDFKGPVGVVVAEQAGGLDALAHAA-LAVRNGTD-TVVCGATEAPLAP-YSIVCQLGYP  
-AGAEGPVTMVS DGTSGGLDSVGYAV-QGTREGSADVVVAGAADTPVSPVIVVACFDAIKA  
-VGAEGPVAMVS DGTSGGLDSLHAC-SLIAEGTIDVMVAGAADTPITP VVSCFDAIKA  
-VGAEGPVTMVS DGTSGGLDSVGNV-RAIEEGSADVMFAGAADTPITP VVACFDAIRA  
-VGAEGPSTVVS DGTSGGIDAVGIY-ELVREGSVDVMVAGAADTPISPIVACFDAIKA  
-VGAEGPNTVVS DGTSGGLDSVGYARGELIREGSADVMLAGSSDAPISPIVACFDAIKA  
RIGAEGPVS DGTSGGLDAVGRAA-DLIAEGAADVMLAGATEAPISPIVACFDAIKA  
-AGAEGPVTVVS DGTSGGLDAVGYGT-ELIRDGRADVVVCGATDAPISPIVACFDAIKA  
-AGAEGPVTVVS DGTSGGIDSIGYAC-ELIREGTVDVMLAGGVDAP IAPITVACFDAIRA  
-AGAEGPVTVVS DGTSGGIDSIGYAC-ELIREGTVDVMLAGGVDAP IAPITVACFDAIRA  
-FGVRGPVQTVS DGTSGGLDAVGYAY-HAVAEGRVDVCLAGAADSPISPIVACFDAIKA

\* . . . . . \*



KCLFDAU  
KCLFPEU  
KCLFACT  
KCLFHIR  
KCLFGRA  
KCLFNOG  
KCLFTCM  
KCLFCIN  
KCLFVNZ  
KCLFWHIE

RLSGSDPTAGYLPFDRAAGHVPGE-GAILAVEDAERVAERG-GKVGYSIAGT-ASF  
RLSGSDNPTAGYLPFDRAAGHVPGE-GAILTVEDAERAAERG-AKVYGSYAGYASFD  
RISTATDPDRAYLPFDRAAGYVPGEG-GAILVLEDSAAA EARGHDAYGELAGASTFD  
RVSRATDPGRAYLPFDVAANGYVPGEG-GAILLLEDAESAKARG-ATGYGEIAGYATFD  
LVSTVADPERAYLPFDVDAAGYVPGEG-GAVLIVEDADSARARG---AERIYVRSPLRRD  
GLSTSDPDRAYLPFDAAAGHVPGE-GALLVLESDESARARGVTRWYGRIDGYATFD  
FLSEATDPHAYLPFDARAAGYVPGEG-GAMLVAERADSARERDAATVYGRIGHASTFD  
-MSDSDEPNRAYLPFDRDGRGYVPGGRGVVPLERAEAAAPARG-AEYGE-AGPLARL  
RLSTSEEPARGYLPFDREAQGHVPGE-GAILVMEAAEAARERG-ARIYGEIAGYGSTFD  
ELSRATEPDRAYRPFTEAACGFAPAEG-GAVLVVEEEAAARERG-ADV RATVAGHAATFT

190101

4/13

KSGRA  
KSHIR  
KSACT  
KSCIN  
KSVNZ  
KSNOG  
KSTCM  
KSDAU  
KSPEU  
KSWHI

TTPRNDPAHASRPFDRNGFVLAEG-AAMFVLEEYEAQRRG-AHIYAEVGGYATRSQ  
TTPRNDPEHASRPFDRNGFVLAEG-AALFVLEELHARARG-AHVYAEISGCATRLN  
TTARNDDPEHASRPFDRNGFVLAEG-AAMFVLEEDYSALARG-ARIHAEISGYATRCN  
TTPRHADAPATASRPFDRNGFVLGEG-AAFFVLEELHSARRRG-AHIYAEIAGYATRSN  
TINRYDDPAHASRPFDRNGFVLGEG-AAVFLVEELHARARG-AHIYAEIAGYATRSN  
TTPRNDTPAEASRPFDRNGFVLGEG-AAVFLVEEFHARRRG-ALVYAEIAGFATRCN  
TSANNDPAHASRPFDRNGFVLGEG-SAVFVLEELHARARG-AHAYAEVRGFATRSN  
TSDHNDTPETLA-PFSRNGFVLGEG-GAIVVLEEEAAVRRG-ARIYAEIGGYASRCN  
TSDHNDTPETASRPFDRNGFVLGEG-GAIVVLEEEAAVRRG-ARIYAEIGGYASRCN  
TSPNNDPAHASRPFDRNGFVMGEG-AAVLVLEELHARARG-ADVCEVSGYATFGN

\* \*\* \* . . \* . . \*

KCLFDAU  
KCLFPEU  
KCLFACT  
KCLFHIR  
KCLFGRA  
KCLFNOG  
KCLFTCM  
KCLFCIN  
KCLFVNZ  
KCLFWHIE  
KSGRA  
KSHIR  
KSACT  
KSCIN  
KSVNZ  
KSNOG  
KSTCM  
KSDAU  
KSPEU  
KSWHI

-PPPGSGRP---SALARAVETALADAGLDRSDIAVVFADGAA-VGELDVAEAEALASVFG  
-PPPGSGRP---SALARAVETALADAGLDGSDIAVVFADGAA-VPELDAAEAEALASVFG  
-PAPGSGRP---AGLERAIRLALNDAGTGPEDVDVVFADGAG-VPELDAAEARAIGRVFG  
-PAPGSGRP---PALRRAIELALADAELRPEQVDVVFADAG-VAELDAIEAAAIREFLG  
-PAPGSGRP---PALGRAAEALAEAGLTPADISVVFADGAG-VPELDRAEADTLARLFG  
-PPPGSGRP---PNLLRAAQALDDAEVGPEDVDVVFADAG-TPEDDAEADAVRRLFG  
-ARPGTGRP---TGPARAIRLALAEARVAPEDVDVVFADAG-VPALDRAEAEALAEVFG  
-PAPHSGRG---STRAHAIRLALDDAGTAPGDIRRVFADGGGRYPN-DRAEAEAEI SEVFG  
-PRPGSGRE---PGLRKAIELALADAGAAPGDIDVVFADAAA-VPELDRVEAEALNAVFG  
GAGRWAESR---EGLARAIQALAEAGCRPEEVDVVFADALG-VPEADRAEALALADALG  
-AYHMTGLKKGREMAESIRALDEARLDRTAVDYVNAHGSG-TKQNDRHETAFAFKRSLG  
-AYHMTGLKTDGREMAEAI RVALDLARIDPTDIDYINAHGSG-TKQNDRHETAFAFKRSLG  
-AYHMTGLKADGREMAETIRVALDESRTDATDIDYINAHGSG-TRQNDRHETAFAFKRSLG  
-AYHMTGLR-DGAEMAEAIRLALDEARLNPEQVDYINAHGSG-TKQNDRHETAFAFKRSLG  
-AFHMTGLRPGDGAEMAEAIRVALDEARMNPTEIDYINAHGSG-TKQNDRHETAFAFKRSLG  
-AFHMTGLKPDGREMAEAITAALDQARRTGDDLHYINAHGSG-TRQNDRHETAFAFKRSLG  
-AYHMTGLRADGAEMAAITAAALDEARRDPDSDVYVNAHGTA-TRQNDRHETSAFKRSLG  
-AYHMTGLRADGAEMAAITAAALDEARRDPDSDVYVNAHGTA-TKQNDRHETSAFKRSLG  
-AYHMTGLTKEGLEMARAITAALDMAELDGSADIDYVNAHGSG-TQQNDRHETAFAVKRSLG

. : : \*\* : : \* . . \* \* : \*

Obr. 2C

1901

P--HRVPVTVPKTLTGRLYSGAGPLDVATGLLALRDEVVPATGHVH-PDPDLPLDVVTGR  
P--RRVPVTVPKTLTGRLYSGAGPLDVATALLALRDEVVPATAHVD-PDPDLPLDVVTGR  
R--EGVPVTVPKTTTGRLYSGGGPLDVVTALMSLREGVIAPTAGVTSVPREYIDLVLGE  
P--SGVPVTAPKIMTGRLYSGGGPLDLVAALLAIRDGVIPPTVHTAEFPVEHQDLVLTGD  
P--RGVPVTAPKALTGRLCAGGGPADLAAALLALRDQVIPATGRHRAVPDAYALDLVTGR  
P--YGVVVTAPKIMTGRLSAGGAALDVATALLALREGVPPVTNVSRPRPEYELDLVLA-  
P--GAVPVTAPKIMTGRLYAGGAALDVATALLSIRDCVVPPTVGTGAPAPGLGIDLVLHQ  
P--GRVPVTCPRIMTGRHLSGAAPLDVACALLAMRAGVIPPTVHID-PCPEYDLDLVLVYQ  
T--GAVPVTAPKIMTGRLYSGAAPLDLAAAFAMDEGVIPPTVNVE-PDAAYGLDLVVGG  
PHAARVPVTAPKTGTGRAYCAAPVLDVATAVLAMEHGLIPTPHVL--DVCHDLDLVTGR  
EHAYAVPVSSIKSMGGHSLGAIGSIEIAASVLAIEHNVVPTTANLHTPDPECDLDYVPLT  
EHAYRTPVSSIKSMVGHSLGAIGSIEVAACALAIHGVVPTTANLHEPDPECDLDYVPLT  
EHARRTPVSSIKSMVGHSLGAIGSLEIAACVLALEHGVVPTTANLRTSDPECDLDYVPLE  
EHAYRTPVSSIKSMVGHSLGAIGSIEIAASALAMEYDVVPTTANLHTPDPECDLDYVPLT  
DHAYRTPVSSIKSMVGHSLGAIGSIEIAASALAMEHNVVPTTANLHTPDPECDLDYVR-S  
DHAYRVPVSSIKSMIGHSLGAIGSLEIAASVLAITHDVVPTTANLHEPDPECDLDYVPLR  
QRAYDVPVSSIKSMIGHSLGAIGSLELAACALAIHGVIPPTTANYEEDPECDLDYVPNV  
DHAYRVPVSSIKSMIGHSLGAIGSLEVAATALAVEYGAIPPTTANLHDPPELDLDYVPLT  
EHAYRVPVSSIKSMIGHSLGAVGSLEVAATALAVEYGVIPPTTANLHDPPELDLDYVPLT  
EHAYATPMSSIKSMVGHSLGAIGSIELAACVLAMAHQVVPPTTANYTTDPPECDLDYVPRE

. \* : : \* : . : : : : \* : \* \*

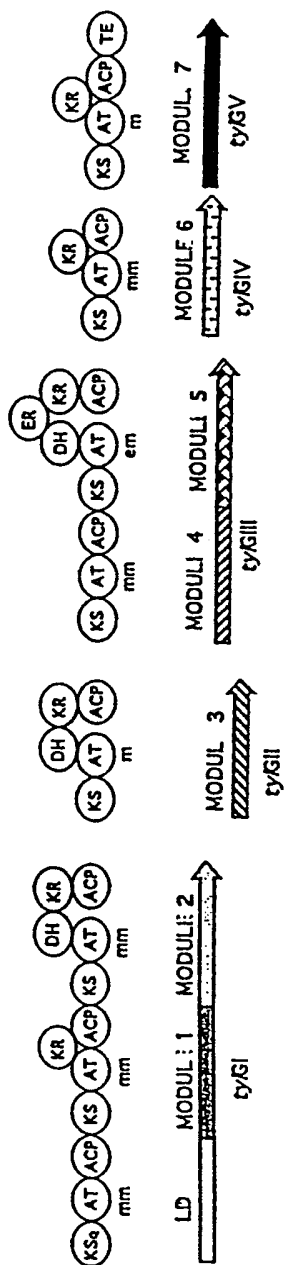
```

PRAMADARAALVVARHGGFNSALVVRGAA-----
PRSLADARAALLVARGYGFNSALVVRGAA-----
PRSTAPRTA-LVLARGRWGFNSAAVLRREFAPTP----
PRHQQLGTA-LVLARGKWGFNSAVVVRGVGTG-----
PREAALSAA-LVLARGRHGFNSAVVVTLRGSDHRRPT
PRRTPLARA-LVLARGRGGFNAMVVGPRAEETR----
PRELRVDTA-LVVARGMGGFNSALVVRRHG-----
VRPAALRTA-LGGARGHGGFNSALVVRAGQ-----
PRTAEVNTA-LVIARGHGGFNSAMVVRSA-----
ARPAEPRTA-LVLARGLMGNSALVLRRAVPPDGR-
AREQRVDTV-LTVSGSGFGGFQSAMVLRHREEAA---
AREQRVDTV-LSVSGSGFGGFQSAMVLRRLGGANS---
ARERKLSRV-LTVSGSGFGGFQSAMVLRDAETAGAAA-
ARDQRVDSV-LTVSGSGFGGFQSAMVLTSAQ---RSTV
CREQLTDSV-LTVSGSGFGGFQSAMVLARPE---RKIA
ARACPVDTV-LTVSGSGFGGFQSAMVLCGPGSRGRSAA
AREQRVDTV-LSVSGSGFGGFQSAAVLARPKETRS---
AREKVRHA-LTVSGSGFGGFQSAMLLSRPER-----
AREKVRHA-LTVSGSGFGGFQSAMLLSRLER-----
ARERTLRHV-LSVSGSGFGGFQSAMVLSGSEGGLR---
*      . *      . *      * ::* ::

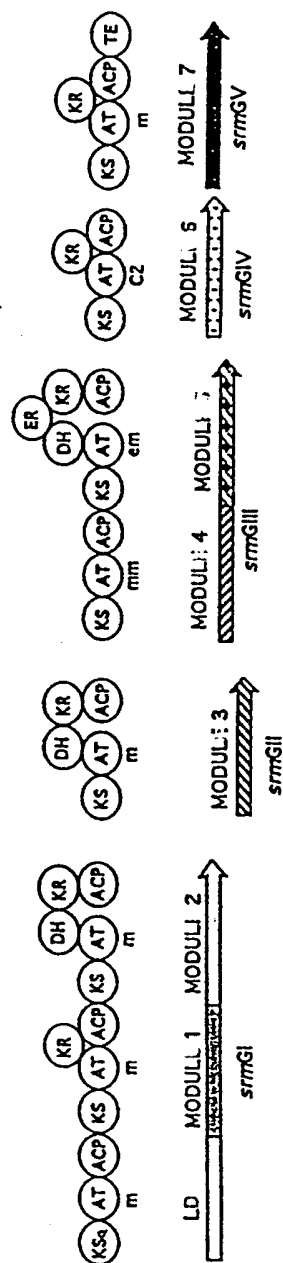
```

obr. 2D

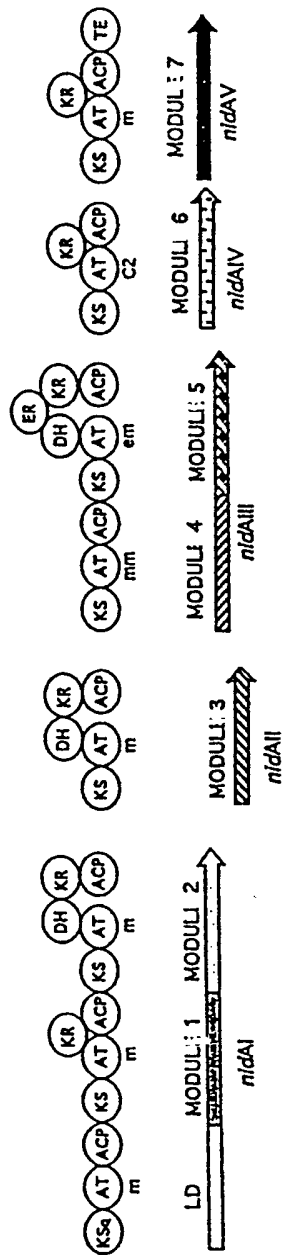
# Organizace polyketid-synthasy produkující tylosin



# Organizace polyketid-synthasy produkující spiramycin



## Organizace polyketid-synthasy produkující niddamycin



m: malonyl transferasa

mm: methylmalonyl transferasa

em: ethylmalonyl transferasa

C2: neznámá transferasa pro C2 jednotku

Obr. 3b

19.01.01

8/13

|              |            |            |             |             |             |
|--------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|
|              | 1          |            |             |             | 50          |
| niddamycin   | -----      | -----      | MAGHGDATAQ  | KAQDAEKSED  | GSDAIAVIGM  |
| platenolide  | -----      | -----      | -----MS     | GELAISRSD   | RSDAVAVVGM  |
| monensin     | -----      | -----      | -----MAAS   | ASASPSGPSA  | GPDPPIAVVGM |
| oleandomycin | -----      | -----      | -----       | ---MHVPGEE  | NGHSIAIVGI  |
| tylosin      | MSSALRRVQ  | SNCGYGDLMT | SNIAAQNTGD  | QEDVDGPDST  | HGGEIAVVGM  |
|              | 51         |            |             |             | 100         |
| niddam...    | SCRFPGAPGT | AEFWQLSSG  | ADAVVTAADG  | RRR.....    | .....GTIDA  |
| platenol.    | ACRFPGAPGI | AEFWKLLTDG | RDAIGRDADG  | RRR.....    | .....GMIEA  |
| monensin     | ACRLPGAPDP | DAFWRLLESG | RSVSTAPPE   | RRRADSGLHG  | P...GGYLDR  |
| oleandom     | ACRLPGSATP | QEFWRLADS  | ADALDEPPAG  | RFPTGSLSSP  | PAPRGGLDS   |
| tylosin      | SCRPGAAGV  | EEFWELLRS  | RGMPTRQDDG  | TWRAA.....  | .....LED    |
|              | 101        |            |             |             | 150         |
| niddam...    | PADFDAFFG  | MSPREAAATD | PQQLVLELG   | WEALEDAGIV  | PESLRGEAAS  |
| platenol.    | PGDFDAFFG  | MSPREAAETD | PQQLMLELG   | WEALEDAGIV  | PGSLRGEAVG  |
| monensin     | IDGFDADFFH | ISPRAVAMD  | PQQLLLELS   | WEALEDAGIR  | PPTLARSRTG  |
| oleandom     | IDTFDADFFN | ISPRAEGLD  | PQQLALELG   | WEALEDAGIV  | PRHLRGTRTS  |
| tylosin      | HAGFDAGFFG | MNARQAAATD | PQHRLMLELG  | WEALEDAGIV  | PGDLTGTDGT  |
|              | 151        |            |             |             | 200         |
| niddam...    | VFVGAMNDY  | ATLLH.RAGA | PTDYYTATGL  | QHSMIANRLS  | YFLGLRGPSL  |
| platenol.    | VFVGAMHDDY | ATLLH.RAGA | PVGPHATATGL | QRAMLANRLS  | YVLGTRGPSL  |
| monensin     | VFVGAFWDDY | TDVLNLRAPG | AVTRHTMTGV  | HRASILANRLS | YAYHLAGPSL  |
| oleandom     | VFMGAMWDDY | AHLAHARGE  | ALTRHSLTGT  | HRGMIANRLS  | YALGLQGPSL  |
| tylosin      | VFAGVASDDY | A.VLTRRSV  | SAGGYTATGL  | HRALANRLS   | HFLGLRGPSL  |
|              | 201        |            |             |             | 250         |
| niddam...    | VVDTGQSSSL | VAVALAVESL | RGGTSGIALA  | GGVNLVLAE   | GS.AAMERVG  |
| platenol.    | AVDTAQSSSL | VAVALAVESL | RAGTSRVAVA  | GGVNLVLAD   | GT.AAMERLG  |
| monensin     | TVDTAQSSSL | VAVHLACESI | RGSDSDIAFA  | GGVNLICSP   | TTELAAARFG  |
| oleandom     | TVDTGQSSSL | AAVHMACE   | ARGESDLALV  | GGVNLVLDPA  | GT.TGVERFG  |
| tylosin      | VVDSAQSASL | VAVQLACESL | RRGETSLAVA  | GGVNLILTEE  | ST.TVMERM   |
|              | 251        |            |             |             | 300         |
| niddam...    | ALSPDGRC   | FDARANGYVR | GEGGAIVVLK  | PLADALADGD  | RVYCVVRGVA  |
| platenol.    | ALSPDGRC   | FDARANGYVR | GEGGAIVVLK  | PLADALADGD  | PVYCVVRGVA  |
| monensin     | GLSAAGRC   | FDARADGFVR | GEGGLVVLK   | PLAAARRDGD  | TVYCVIRGSA  |
| oleandom     | ALSPDGRCYT | FDSRANGYAR | GEGGVVVVLK  | PTHRALADGD  | TVYCEILGSA  |
| tylosin      | ALSPDGRC   | FDARANGYVR | GEGGGAIVVLK | PLDAALADGD  | RVYCVIKGGA  |
|              | 301        |            |             |             | 350         |
| niddam...    | TGNDGGGPGL | TVPDRAGQEA | VLRAACDQAG  | VRPADVRFVE  | LHGTGTPAGD  |
| platenol.    | VGNDGGGPGL | TAPDREGQEA | VLRAACAQAR  | VDPAEVRFVE  | LHGTGTPVGD  |
| monensin     | VNSDGTDDGI | TLPSSQAQD  | VVRLACRRAR  | ITPDQVQYVE  | LHGTGTPVGD  |
| oleandom     | LNNDGATEGL | TVPSARAQAD | VLRQAWERAR  | VAPTDVQYVE  | LHGTGTPAGD  |
| tylosin      | VNNDGGGASL | TTPDREAQEA | VLRQAYRRAG  | VSTGAVRYVE  | LHGTGTRAGD  |

Obr. 4A

190101

9/13

|           |                       |                       |            |
|-----------|-----------------------|-----------------------|------------|
|           | 351                   |                       | 400        |
| niddam... | PVEAEALGAV YGTGRP..AN | EPLLVGSVKT NIGHLEGAAG | IAGFVKAALC |
| platenol. | PVEAHALGAV HGSGRP..AD | DPLLVGSVKT NIGHLEGAAG | IAGLVKAALC |
| monensin  | PIEAAALGAA LGQDAA..RA | VPLAVGSAKT NVGHLEAAAG | IVGLLKTALS |
| oleandom  | PVEAEGLGTA LGTARP..AE | APLLVGSVKT NIGHLEGAAG | IAGLLKTVLS |
| tylosin   | PVEAAALGAV LGAGADSGRS | TPLAVGSVKT NVGHLEGAAG | IVGLIKATLC |

|           |                        |                       |            |
|-----------|------------------------|-----------------------|------------|
|           | 401                    |                       | 450        |
| niddam... | LHERALPASL NFETPNPAIP  | LERLRLKVQT AHAALQPGTG | GGPLLAVGSA |
| platenol. | LRERTLPGSL NFATPSPAIP  | LDQLRLKVQT AAAELPLAPG | GAPLLAGVSS |
| monensin  | IHHRRLAPSL NFFTTPNPAIP | LADLGLTVQQ DLADWP..RP | EQPLIAGVSS |
| oleandom  | IKNRHLPASL NFTSPNPRID  | LDALRLRVHT AYGWP..SP  | DRPLVAGVSS |
| tylosin   | VRKGLVPSL NFSTPNPDIP   | LDDLRLRVQT ERQEW.NEED | DRPRVAGVSS |

|           |                       |                       |            |
|-----------|-----------------------|-----------------------|------------|
|           | 451                   |                       | 500        |
| niddam... | FGMGGTNCHV VLEETPGG.. | .....                 | ...RQPAE.T |
| platenol. | FGIGGTNCHV VLEHLPSR.. | .....                 | ...PTPAV.S |
| monensin  | FGMGGTNCHV VVA....AAP | DSVAVPEPVG VPERVEVPEP | VVVSEPVVVP |
| oleandom  | FGMGGTNCHV VLSELNAGG  | DGAGKGPYTG TEDRLGATEA | EKRDPFATGN |
| tylosin   | FGMGGTNVHL VIAEAPAAAG | SSGAGGSGAG SGAGISAVSG | VV.....    |

|           |                       |                       |                       |
|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|           | 501                   |                       | 550                   |
| niddam... | GQADACLFSA SPMLLLSARS | EQALRAQAAR LREHL..EDS | GADPLDIAYS            |
| platenol. | VAAS...LPD VPPLLLSARS | EGALRAQAVR LGETV..ERV | GADPRDVAYS            |
| monensin  | TPWP.....             | .....VSAHS ASALRAQAGR | LRTHLAAHRP TPDAARVGHA |
| oleandom  | GPDPAQDTHR YPALILSARS | DAALRAQAER LRHHL.EHSP | GQRLRDTAYS            |
| tylosin   | .....                 | ..PVVVSGRS RVVVREAAGR | LAE..VVEAG GVGLADVAVT |

|           |                       |                       |            |
|-----------|-----------------------|-----------------------|------------|
|           | 551                   |                       | 600        |
| niddam... | LATTRTRFEH RAAVPCGDPD | RLSSALAALA AGQTPRGVRI | GS..TDADGR |
| platenol. | LASTRTLFEH RAVVPCGGRG | ELVAALGGFA AGRVSGGVRS | GR..A.VPGG |
| monensin  | LATTRAPLAH RAVLLGGDTA | ELLGSLDALA EGAETASIVR | GEAYT..EGR |
| oleandom  | LATTRQVFER HAVVTGHDRE | DLNLGLRDLE NGLPAPQVLL | GRTPPEPVG  |
| tylosin   | MAD.RSRFGY RAVVLARGEA | ELAGRLRALA GGDPDAGVVT | G...AVLDGG |

|           |                       |                       |            |
|-----------|-----------------------|-----------------------|------------|
|           | 601                   |                       | 650        |
| niddam... | LALLFTGQGA QHPGMQELY  | TTDPHFAAAL DEVCEELQRC | GTQNLREVMF |
| platenol. | VGVLFTHGGA QWVGMRGLY  | AGGGVFAEVL DEVLSMVGEV | DGRSLRDVMF |
| monensin  | TAFLFSGQGA QRLGMGRELY | AVFPVFADAL DEAFALDVH  | LDRPLREIVL |
| oleandom  | LAFLFSGQGS QOPGMGKRLH | QVFPGFRDAL DEVCAELDTH | LGRL.....  |
| tylosin   | VVVGAAPGGA GAAGGAGAAG | GAGGGGVVLV FPGQGTQWVG | MGAGLLGSSE |

|           |                       |                        |                       |
|-----------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
|           | 651                   |                        | 700                   |
| niddam... | TPDQPD....            | .....                  | LLDRTEXTQP ALFALQTALY |
| platenol. | GDVDVDAGAG ADAGAGAGAG | VGSGSGSVGG LLGRTEFAQP  | ALFALEVALF            |
| monensin  | GETDSGGNVS GENVIGEGA. | .....DHQA LLDQTAYTQP   | ALFAIETSLY            |
| oleandom  | .GPEAGPPLR DVMFAERGT. | .....AHSA LLSETHYTQA   | ALFALETALF            |
| tylosin   | VFAASMRECA RALSVHVGWD | LLEVVSAGGAG .LERVDVVQP | VTWAVMVSIA            |

|           |                        |                       |            |
|-----------|------------------------|-----------------------|------------|
|           | 701                    |                       | 750        |
| niddam... | RTLTARGETQA HVLGHESVGE | ITAAGHAGVL DLPDAARLIT | ARAHVMGQLP |
| platenol. | RALEARGVEV SVVLGHESVGE | VAAATVAGVL SLGDAVRLVV | ARGGLMGGLP |
| monensin  | RLAASFGLKP DYVLGHESVGE | IAAAHVAGVL SLPDASALVA | TRGRIMQAVR |
| oleandom  | RLLVQWGLKP DHLAGHSVGE  | IAAAHAAGIL DLSDAAEVLA | TRGALMRSRP |
| tylosin   | RYWQAMGVDV AAVVGHESQGE | IAAATVAGAL SLEDAAAVVA | LRAGLIGRYL |

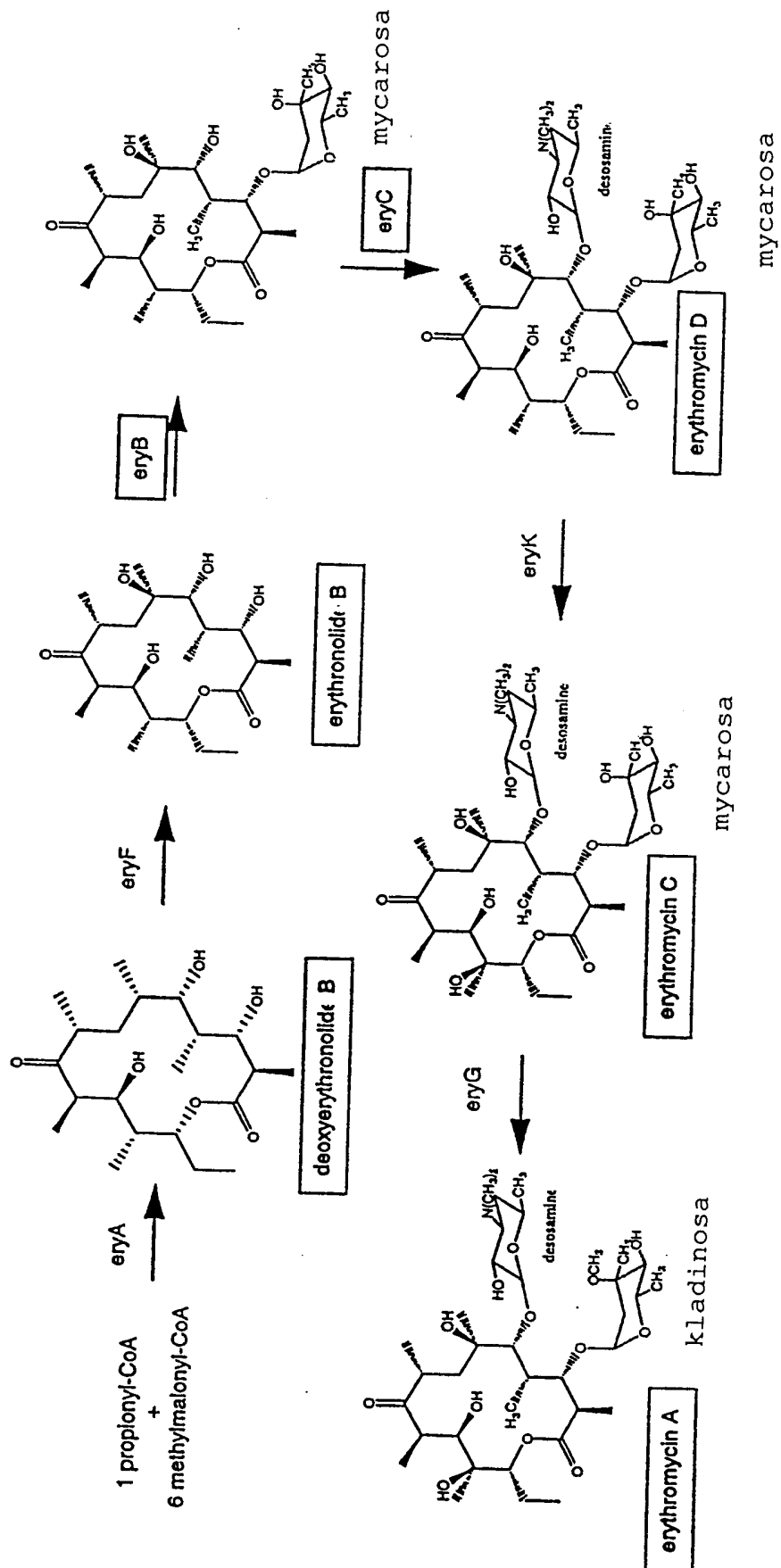
↑

Obr. 4B

10/13

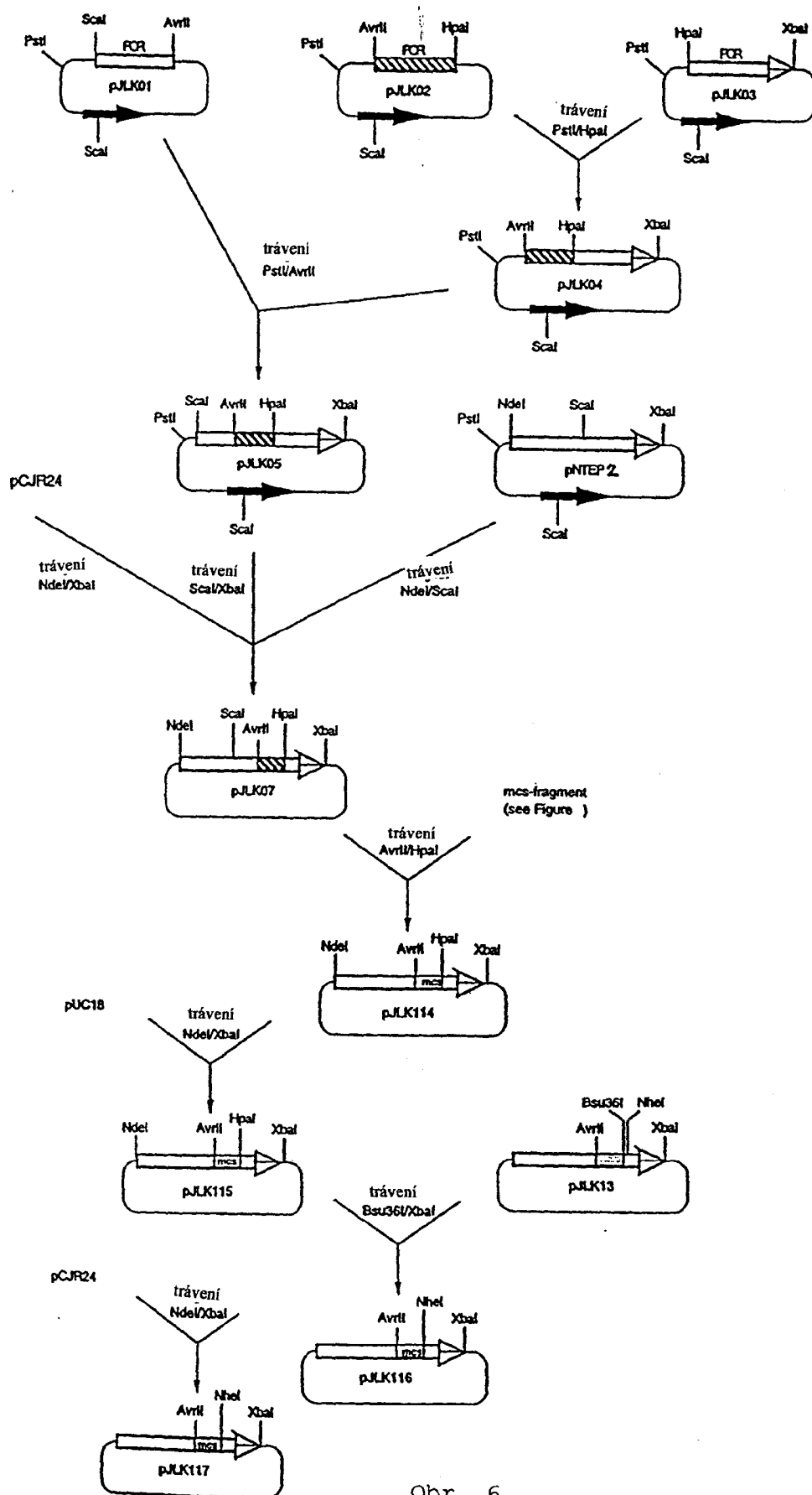
|           |            |            |                                  |
|-----------|------------|------------|----------------------------------|
|           | 751        |            | 800                              |
| niddam... | HG.GAMLSVQ | AAEHDLDQLA | HTHG..VEIA AVNGPTHCVL SGPRTALEET |
| platenol. | VG.GGMWSVG | ASESVVRGVV | EGLGEWVSVA AVNGPRSVVL SGDVGVLESV |
| monensin  | AP.GAMAAWQ | ATADEAAEQ  | AGHERHVTVA AVNGPDSVVV SGDRATVDEL |
| oleandom  | GG.GVMLSQ  | APSEVAPLL  | LGREAHVGLA AVNGPDAVVV SGERGHVAAI |
| tylosin   | AGRGAMAAVP | LPAGEVEAGL | .AKWPGVEVA AVNGPASTVV SGDRRAVAGY |
|           | 801        |            | 850                              |
| niddam... | AQHLREQNVR | HTWLKVSHAF | HSALMDPMLG AFRDTLNTLN Y..QPPTIPL |
| platenol. | VASLMGDGVE | YRRLDVSHGF | HSVLMPEVLG EFRGVVESLE FGRVRPGVVV |
| monensin  | TAAWRGRGRK | AHHLKVSHAF | HSPHMDPILD ELRAVAAGLT FHE..PVIPV |
| oleandom  | EQILRDRGRK | SRYLRVSHAF | HSPLMEPVLE EFAEAVAGLT FRA..PTTPL |
| tylosin   | VAVCQAEQVQ | ARLIPVDYAS | HSRHVEDLKG ELERVLSGI. .RPRSPRVFV |
|           | 851        |            | 900                              |
| niddam... | ISNLTGQIA. | .....DPNHL | CTPDYWIDHA RHTVRFADAV QTAHHQGT   |
| platenol. | VSGVSGGVV. | .....GSGEL | GDPGYWVRHA REAVRFADGV GVVRLGLVGT |
| monensin  | VSNVTGELVT | ATATGSGAGQ | ADPEYWARHA REPVRFLSGV RGLCERGVT  |
| oleandom  | VSNLTG.... | ..APVDDRTM | ATPAYWVRHV REAVRFGDGI RALGKLGTGS |
| tylosin   | CSTVAGEQPG | EPVF.....  | .DAGYWFRNL RNRVEFSAVV GGLLEEGRH  |
|           | 901        |            | 950                              |
| niddam... | YLEIGPHPTL | TTLHHTL..  | .DNP.....T TIPTLHRERP            |
| platenol. | LVEVGPHGVL | TGMAGECLGA | GDDV.....V VVPAMRRGRA            |
| monensin  | FVELGPDAPL | SAMARDCFPA | P.....ADRSRPRPA AIATCRRGRD       |
| oleandom  | FLEVGPDGVL | TAMARACVTA | APEPGHRGEQ GADADAHTAL LLPALRRGRD |
| tylosin   | FIEVSAHPVL | V.....     | .....HAIEQ TAEAADRSVH ATGTLRRQDD |
|           | 951        |            |                                  |
| niddam... | EPETLTQAI  | AVGVRTDGID | WAVLCGASRP RRVELPTYAF            |
| platenol. | EREVFEAALA | TVFTRDAGLD | ATALHTGSTG RRIDLPTTFF            |
| monensin  | EVATFLRSLA | QAYVRGADVD | FTRAYGATAT RRFPLPTYPF            |
| oleandom  | EARSLTEAVA | RLHLHGVPMD | WTSVLGGDVS .RVPLPTYAF            |
| tylosin   | SPHRLLTSTA | EAWAHGATLT | WDPAL..PPG HLTTLPTYPF            |

niddam: niddamycin; platenol: platenolide I (spiramycin); oleandom:  
oleandomycin.



190191

12/13



Obr. 6

Obr. 7

po : (Plf):

5'-CTA GGC CGG GCC GGA CTG GTA GAT CTG CCT ACG TAT CCT TTC CAG GGC AAG CGG TTC TGG CTG CAG CCG GAC CGC ACT ACT CCT CGT GAC GAG  
GGA GAT GCA TCG AGC CTG AGG GAC CGG TT-3'

proti (Plb):

5'-AAC CGG TCC CTC AGG CTC GAT GCA TCT CCC TCG TCA CGA GGA CTA GTG CGG TCC GGC TGC AGC CAG AAC CGC TTG CCC TGG AAA GGA TAC GTA  
GGC AGA TCT ACC AGT CCG GCC CGG C-3'

tepelně zpracované oligonukleotidy

13/13

CTAGCCGGGCGGACTGGTAGATCTGCTACGTATCCTTTCCAGGGCAAGCGGTTCTGGCTCCAGCCGCGGACCGGCTGCTCGTACGAGGAGATGCATCGAGCCTGAGGGACCGGTT  
CGGCCCGGCGCTGACCATCTAGACCGGATGCA TAGGAAGGTCCGTTCCGCAAGACCGACGTCGGCTGGCGTGATCAGGAGCACTGCTCCCTCTAGTAGCTCGGACTCCCTGGCCAA  
-----  
AvrII BglII SnaBI PstI SpeI NsiI Bsu36I HpaI  
-----

13/13