

P9601644

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

18183

Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

"
A
"

STREPTOMYCES AVERMITILIS ELÁGAZÓ SZÉNLÁNCÚ ALFA-KETOSAV DE-
HIDROGENÁZ KOMPLEXÉT KÓDOLÓ GÉNEK

Pfizer Inc., New York, N.Y., US

Feltalálók:

DENOYA Claudio Daniel, Groton,
STUTZMAN-ENGWALL Kim Jonelle, East Lyme,
Connecticut, US

A bejelentés napja: 1994. 06. 16.

Elsőbbsége: 1993. 12. 16. (08/168 602) US

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/IB94/00157

A nemzetközi közzététel száma: WO95/16781

83758-4185-GI/gcs

STREPTOMYCES AVERMITILIS ELÁGAZÓ SZÉNLANCÚ ALFA-KETOSAV
DEHIDROGENÁZ KOMPLEXÉT KÓDOLO GÉNEK

A találmány tárgya új DNS-szekvenciák, amelyek egy *Streptomyces* nemzetségbe tartozó organizmus elágazó szénláncú alfa-ketosav dehidrogenáz (BCKDH) komplexét kódolják. A találmány további tárgya eljárás elágazó szénláncú alfa-ketosav dehidrogenáz (*bkd*)-deficiens *Streptomyces avermitilis* mutáns génsebészeti módszerekkel történő előállítására. A *bkd*-deficiens mutáns nem rendelkezik elágazó szénláncú alfa-ketosav dehidrogenáz aktivitással, s ezáltal alkalmas új (nem természetes) avermektinek fermentációs előállításához.

A *Streptomyces avermitilis* természetes állapotban nyolc különböző, de közeli rokon parazitaellenes poliketid vegyületet termel, melyeket avermektineknek nevezünk. A *S. avermitilis* által termelt avermektin komplex négy nagy komponensből (A1a, A2a, B1a és B2a) és négy kis komponensből (A1b, A2b, B1b és B2b) áll. A különböző komponensek szerkezetét az (I) képletben mutatjuk be.

Az avermektin poliketid szerkezete hét acetát, öt propionát és egy elágazó alfa-láncú zsírsav molekulából származik, mely zsírsav lehet S-(+)-2-metil-vajsav vagy izovajsav. A komponensek "A" és "B" jelölése azokra az avermektinre vonatkozik, amelyekben az 5-ös helyzetű szubsztituens metoxicsoport, illetve hidroxilcsoport. Az "1" jelölés olyan

avermektinekre vonatkozik, amelyekben a 22-es és 23-as szénatom között kettős kötés található, míg a "2" jelölés azokra az avermektinekre vonatkozik, amelyekben a 22-es szénatom hidrogéngyökkel, a 23-as szénatom pedig hidroxilcsoporttal rendelkezik. Végül, a 25-ös szénatom két lehetséges szubsztituenssel rendelkezhet; a *sec*-butil-csoport (amely az S-(+)-2-metil-vajsav beépüléséből származik) az "a" jelzésű avermektinekben, az izopropilcsoport pedig (amely az izovajsav beépüléséből származik) a "b" jelzésű avermektinekben fordul elő. (Áttekintést ld. Fischer, M.H. és Mrozik, H., "Macrolid Antibiotics", Academic Press, 14. fejezet, 1984.)

A "természetes" avermektiniken a *S. avermitilis* által termelt azon avermektiniket értjük, amelyekben a 25-ös helyzetben izopropil vagy *sec*-butil szubsztituens található. Azokat az avermektiniket, amelyekben a 25-ös szénatomon nem izopropil- vagy *sec*-butil-csoport található, új vagy nem természetes avermektineknek nevezzük.

Az elágazó szénlánú alfa-zsírsavak CoA alakjukhoz vezető egyik metabolikus útvonala elágazó láncú alfa-aminosavakból (izoleucinből és valinból) kiindulva, elágazó láncú aminosav transzamináz reakción keresztül elágazó láncú alfa-ketosav dehidrogenáz reakcióval játszódik le. Az elágazó láncú zsírsav-CoA származékok más lehetőség szerint *de novo* szintézissel előállított elágazó láncú alfa-ketosavakból is kialakíthatók. Ezeket a metabolikus reakcióutakat az (I)

reakcióvázlatban mutatjuk be.

Izoláltak egy olyan *S. avermitilis* mutánst, amely nem rendelkezik kimutatható elágazó szénláncú alfa-ketosav dehidrogenáz (BCKDH) aktivitással (Hafner és mtsi., EP 284,176 számú európai szabadalom, 1988, közrebocsátva: 1993. október 20.). Ezt a mutánst az ATCC 31272 *S. avermitilis* törzs standard kémiai mutagenézisét követően olyan szűréssel (screening) izolálták, melyet a ^{14}C -1 jelölésű 2-oxo-izokapronsav szubsztrátból (egy leucin analóg) felszabaduló $^{14}\text{CO}_2$ hiányára végeztek. Ez a mutáns nem képes természetes avermektineket szintetizálni, kivéve, ha a mutáns tenyésztő tápközegéhez S-(+)-2-metil-vajsavat vagy *sec*-butil-csoportot (S-alak) hordozó izovajsavat adnak. A mutáns vizes aerob körülmények között, külsőleg adott valamilyen másfajta karbonsavat, például ciklohexán karbonsavat (CHC) vagy annak prekursorát tartalmazó tápközegekben fermentálva új (nem természetes) avermektinek termelésére képes.

A *S. avermitilis* elágazó szénláncú alfa-ketosav dehidrogenáz komplexét kódoló gének klónozására nagy szükség van. E gének rekombináns DNS technikákkal végzett manipulációja elősegítheti a természetes és új avermektinek termelését. Bizonyos törzsek esetében a *bkd* gének kópiaszámának növelésével a természetes avermektinek fokozott szintje érhető el. Ezenkívül, a fentebb említett, kémiai mutagenézissel kapott *bkd* mutáns kialakításának javított változata lehet olyan irreverzibilisen blokkolt *bkd* törzs

kialakítása, melynek BCKDH aktivitását véglegesen megszüntettük, illetve génhelyettesítéssel módosítottuk.

Az alfa-ketosav dehidrogenáz multienzim komplexek (az elágazó láncú alfa-ketosav dehidrogenáz (BCKDH) komplex, a piruvát dehidrogenáz (PDH) komplex és az alfa-ketoglutarát dehidrogenáz (KGDH) komplex) az elágazó láncú alfa-ketosavak, a piruvát, illetve az alfa-ketoglutarát oxidatív dekarboxileződését katalizálják, ami CO₂ felszabadulását, és a megfelelő acil-CoA és NADH képződését eredményezi (Perham, R.N., Biochemistry, 30, 8501-8512, 1991). Mindegyik komplex három különböző katalitikus enzimből; dekarboxilázból (E1), dihidro-lipoamid aciltranszferáz transzacilázból (E2) és dihidro-lipoamid dehidrogenázból (E3) áll.

Az elágazó láncú alfa-ketosav dehidrogenáz (BCKDH) multienzim komplex az E1 (dekarboxiláz), E2 (transzaciláz) és E3 (lipoamid dehidrogenáz) funkcionális komponensekből áll. A *Pseudomonas putida*-ból, *Pseudomonas aeruginosa*-ból és *Bacillus subtilis*-ből származó, tisztított komplexek négy polipeptidből épülnek fel. A tisztított emlős komplexek szintén négy polipeptidből (E1-alfa, E1-béta, E2 és E3) állnak. *Bacillus subtilis*-ből izoláltak egy alfa-ketosav dehidrogenáz komplexet, amely piruvát és elágazó láncú alfa-ketosav dehidrogenáz aktivitást egyaránt mutatott. Ez a kétfunkciós komplex a membrán foszfolipidek számára a piruvátot és az elágazó láncú alfa-ketosavakat is oxidálja.

A prokarióta elágazó láncú alfa-ketosav dehidrogenáz gének klónozását a *Pseudomonas* és a *Bacillus* nemzetségben írták le. E rendszerekben azt találták, hogy a BCKDH-t kódoló gének egy operonban csoportosultak. A *Pseudomonas putida* BCKDH komplexének génjeit klónozták, és meghatározták e régió nukleotid-szekvenciáját (Sykes és mtsi., J. Bacteriol., 169, 1619-1625, 1987; Burns és mtsi., Eur. J. Biochem, 176, 165-169, 1988 és 176, 311-317, 1988). Az E1-alfa molekulatömege 45289 D, az E1-bétáé 37138 D, az E2-é 45134 D, és az E3-é 48164 D. A négy gén E1-alfa, E1-béta, E2 és E3 sorrendben csoportosul (cluster). Northern blot analízis alapján e négy gén expressziója egyetlen mRNS-ből történik, és ezek a gének operont alkotnak. Közvetlenül az E1-alfa kódoló régiójának starthelye előtt tipikus prokarióta promoter található, amely lehetővé teszi a *Pseudomonas bkd* gének konstitutív expresszióját. Az E1-béta kódoló régió kezdő kodonja az E1-alfa nyitott leolvasási keretének (ORF) végétől downstream irányban 40 nukleotid távolságban helyezkedik el. Ezzel szemben, az E1-béta és E2 nyitott leolvasási keretek között nincs gén közötti hely, mivel az E1-béta ORF stop kodonja közvetlenül az E2 ORF kezdőkodonja előtt áll. Az E2 és E3 ORF között a gén közötti hely csupán 2 nukleotid nagyságú. A fentiek következtében a *Pseudomonas bkd* gének szorosan kapcsolatosak.

A *Bacillus subtilis* BCKDH/PDH kettős komplexet kódoló operont is klónozták (Hemila és mtsi., J. Bacteriol., 172, 5052-5063, 1990). Ez az operon négy nyitott leolvasási

keretet (ORF) tartalmaz, melyek négy (42 kD-os, 36 kD-os, 48 kD-os és 50 kD-os) proteint kódolnak, s nagymértékben homológok a *Pseudomonas bkd* cluster E1-alfa, E1-béta, E2 és E3 alegységeivel. A *Bacillus stearothermophilus*-ból származó BCKDH/PDH kettős multienzim komplex E1 komponensének alfa és béta alegységét kódoló géneket szintén klónozták és szekvenálták (az alfa és béta alegységek becsült molekulatömege hozzávetőleg 41, ill. 35 kD; Hawkins és mtsi., Eur. J. Biochem., 191, 337-346, 1990).

A fentieken kívül számos eukarióta (emberi, szarvasmarha és patkány) E1 alfa és béta BCKDH alegység szekvenciáját leírták. Számítógépes analízissel több fajból származó PDH és BCKDH komplexek E1-alfa és E1-béta komponenseinek ismert aminosav-szekvenciáit összehasonlították (Wexler és mtsi., FEBS Letters, 282, 209-213, 1991). Érdekes módon, az alfa és béta alegységek több olyan régióját azonosították, amelyek nem csak az eddig leírt PDH-kban, hanem a prokarióta és eukarióta BCKDH komplexekben is nagymértékben konzerváltak.

A *Streptomyces avermitilis*-ből származó BCKDH komplex E1 komponensének alfa (*bkdA*) és béta (*bkdB*) alegységét, illetve E2 (*bkdC*) komponensét kódoló géneket is klónozták, szekvenálták és heterológ génexpressziós rendszerrel analizálták (Denoya, C.D., "Cloned genes encoding branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex from *Streptomyces avermitilis*" 08/100,518 számú Amerikai Egyesült

Allamok-beli szabadalmi bejelentés, 1993. július 30.). A DNS-szekvencia analízis clusterre szerveződött, feltételezett transzkripciós promoter szekvenciák és *bkd* strukturális gének jelenlétét mutatta ki. A cluster elrendeződése: promoter szekvencia, E1-alfa (*bkdA*), E1-béta (*bkdB*) és E2 (*bkdC*) nyitott leolvasási keretek. A teljes *Streptomyces avermitilis bkdABC* gén-clustert *E. coli* gazdasejtben való expresszióhoz az erős *E. coli* T7 promotertől downstream irányban klónozták. Hasonlóan, az E1-alfa és E1-béta nyitott leolvasási kereteket is (külön vagy együtt) a T7 promotertől downstream irányban klónozták, és mindegyik konstrukciót expresszióra tesztelték. Ezek a vizsgálatok azt mutatták, hogy a *S. avermitilis bkd* gén-cluster legalább két nyitott leolvasási kerete (E1-alfa [*bkdA*] és E1-béta [*bkdB*]) *E. coli*-ban expresszálnak teljes mértékben transzlálható volt. Specifikusan a BCKDH komplex E1 komponensének analizálására végzett enzimatikus vizsgálatok igazolták, hogy a rekombináns *E. coli* klónok közül kettő (a teljes *bkd* gén-clustert hordozó klón és az E1-alfa és E1-béta nyitott leolvasási kereteket együtt hordozó klón) E1 BCKDH-specifikus enzimaktivitással rendelkezett.

A találmány a *Streptomyces avermitilis* elágazó szénláncú alfa-ketosav dehidrogenázát (BCKDH) kódoló új gének egy második clusterének molekuláris klónozására és analízisére vonatkozik. A cluster legalább három gént tartalmaz (*bkdF*, *bkdG* és *bkdH*), amelyek a *Streptomyces avermitilis* BCKDH

komplex — sorrendben — E1-alfa, E1-béta, illetve E2 alegységét kódolják. Az általunk leírt *bkd* gén-cluster az utóbbi időben leírt első *bkd* clustertől (*bkdA*, *bkdB* és *bkdC* gének) (ld. Denoya, C.D., 08/100,518 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, 1993. július 30.) downstream irányban, hozzávetőleg 12 kilobázis (kb) távolságban helyezkedik el. Mindkét cluster azonos génszerveződést mutat, és a *Streptomyces avermitilis* kromoszómán azonos irányban helyezkednek el. A két clusterben az egymásnak megfelelő strukturális gének, bár nagymértékben homológok, különböznek egymástól.

A találmány további tárgya *bkd* mutáns génsebészeti technikával történő kialakítása. A *bkd* mutáns, amely a *bkdF* gént érintő kromoszomális deléciót hordoz, nem rendelkezik elágazó szénláncú alfa-ketosav dehidrogenáz aktivitással; nem képes egyedüli szénforrásként izoleucinen, leucinen és valinon növekedni, továbbá nem képes természetes avermektineket termelni olyan tápközegben, amelyből hiányzik az S-2-metil-vaajsav és az izovaajsav is. A találmány szerinti mutáns megfelelő, másfajta karbonsavat, például ciklohexán-karbonsavat (CHC) tartalmazó tápközegen, fermentáció útján új (nem természetes) avermektinek termelésére alkalmas. A találmány további tárgya olyan mutáns kialakítása, amely a *bkdF* gént és a *bkdABC* gén-cluster egyaránt érintő kromoszomális deléciót hordoz.

A *Streptomyces* egy fő genetikai kapcsoltsági csoportot (egy

kromoszómát) tartalmaz, amely hifa kompartmentenként gyakran több kópiában van jelen, a spórákban azonban csak egyetlen kópiaként létezik. A *Streptomyces* genom a prokarióták között jellegzetesen nagy méretű (5×10^3 kb és 7×10^3 kb között) (Gladek, A. és Zakrzewska, J., FEMS Microbiol. Lett., 24, 73-76); körülbelül kétszerese az *E. coli* genom méretének.

A *Streptomyces* genetikájának egy különösen érdekes vonatkozása a gyakori kromoszómális átrendeződés, amely széles körű deléciókat foglal magában, melyeket gyakran intenzív DNS amplifikáció követ (Birch, A. és mtsi., J. Bacteriol., 172, 4138-4142). A *Streptomyces* amplifikációs és deléciós eseményei két-három nagyságrenddel nagyobbak, mint az *E. coli* és a *B. subtilis* hasonló eseményei. A *Streptomyces* esetében a kromoszóma 18 %-át érintő deléciókról és a genom 45 %-át kitevő amplifikációkról számoltak be. Bizonyos gének duplikációja (annak ellenére, hogy hosszú időtartamot tekintve instabil) $1/10^4$ sejt gyakorisággal fordul elő. Az ilyen duplikációk általában rendellenes crossing-over események eredményeként következnek be, ami az osztódó utódkromoszómákban rövid, részlegesen homológ DNS-szakaszok kialakulásával jár. Az ilyen duplikációs eseményeket — azáltal, hogy ugyanazon a kromoszómán új DNS szakaszokat hoznak létre —, automatikusan további génamplifikációs és eliminációs események követik. Nemcsak ugyanazon gén, hanem két különböző, igen hasonló szerkezetű gén többszörös kópiái is rekombinációra és deléciók kialakítására lesznek

hajlamosak. Egy gén stabilitásához ilyenformán arra van szükség, hogy semmilyen más génhez ne legyen túlságosan hasonló.

A *Streptomyces* esetében egy gén vagy géncsoport több kópiájának jelenléte nem szokatlan. A *Saccharopolyspora erythraea* esetében beszámoltak az eritromicin makrolid antibiotikum poliketid részének szintéziséhez szükséges gének moduláris (tömbös) szerveződéséről (Donadio és mtsi., Science, 252, 675-679, 1991).

Felfedeztük, hogy a *Streptomyces avermitilis* a *bkd* gének legalább két clusterével rendelkezik: az egyik cluster a *bkdA*, *bkdB* és *bkdC* génekből, a másik cluster pedig a *bkdF*, *bkdG* és *bkdH* génekből áll. Feltételezzük, hogy mind a *bkdABC* cluster (ld. Denoya, C.D., 08/100,518 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, 1993. július 30.), mind a találmányunkban leírt *bkdFGH* cluster génduplikáció eredményeként jön létre a *Streptomyces avermitilis*-ben, és hogy a két kópia mutációk következtében elég különbséget halmoz fel ahhoz, hogy biztosított legyen megmaradásuk (elkerülve a rekombinációs/deléciós eseményeket).

Amellett, hogy leírunk egy második új, BCKDH komplexet kódoló gén-clustert, leírjuk egy *Streptomyces avermitilis bkdF* mutáns génsebészeti módszerekkel történő kialakítását is. A *bkdF* mutáns nem rendelkezik elágazó szénláncú

alfa-ketosav dehidrogenáz aktivitással; nem képes egyedüli szénforrásként izoleucinen, leucinen és valinon növekedni, továbbá nem képes természetes avermektineket termelni olyan tápközegen, amelyből hiányzik az S-2-metil-vaajsav és az izovaajsav. A *bkdF* mutáns megfelelő, másfajta karbonsavat, például ciklohexán-karbonsavat (CHC) tartalmazó tápközegen, fermentáció útján új (nem természetes) avermektinek termelésére alkalmas. Találmányunkban egy olyan mutáns kilakítását is leírjuk, amely a *bkdF* gént és a *bkdABC* gén-clustert egyaránt érintő kromoszómális deléciót hordoz.

A *Streptomyces* mutánsok kémiai és fizikai mutagénekkel történő kialakítása fontos módszer a génfunkció és a génszabályozás vizsgálatában, valamint javított nagyüzemi törzsek kifejlesztésében. A *Streptomyces* gének klónozásának újabb fejlődése számtalan klónozott gén (pl. rezisztencia gének, bioszintetikus gének és regulátor gének) rekombináns technikával történő manipulációjának lehetőségét eredményezte, s lehetővé tette a gének szerveződésének és szabályozásának értelmezését. Egy másik mutagén módszert, a génhelyettesítést sikeresen alkalmazták a *Saccharomyces cerevisiae*, az *Escherichia coli* és a *Bacillus subtilis* esetében (Scherer, S. és R.W. Davis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4951-4955, 1979; Shortle, D. és mtsi., Science, 217, 371-373, 1982; Stahl, M.L. és Ferrari, E., J. Bacteriol., 158, 411-418, 1984), valamint a *Saccharopolyspora erythraea* (Weber, J.M. és Losick, R., Gene, 68, 173-180, 1988) és több *Streptomyces* faj esetében.

Ezzel a technikával lehetővé válik, hogy egy plazmidban szállított, *in vitro* kialakított mutációt a gazdatörzs kromoszómájába vigyünk be. Ez a módszer azon a felfedezésen alapul, hogy a gazdakromoszóma és egy homológ régiót tartalmazó plazmid között rekombináció következik be.

Az *S. avermitis*-nél a génhelyettesítés a vektor által szállított klónozott szekvenciák és kromoszomális párjaik közötti homológ rekombináció útján történik. A klónozott és a "helybéli" szekvenciák között feltehetően két, egyszerre lejátszódó crossover vagy egy integrációt eredményező crossover, majd egy azt követő felbontási lépés (melynek során a beépült plazmid kivágódik) a klónozott szekvencia és a gazda szekvenciája között reciprok kicserélődést eredményez. Az *S. avermitis*-ben a kettős és az egyszeres crossovert egyaránt megfigyeltük. Mindkét mechanizmus (a kettős crossover és az egyszeres crossover, melyet kivágás követ) azonos terméket eredményez. E módszer alkalmazásával képesek voltunk a *S. avermitis bkdF* génjének E1-alfa nyitott leolvasási keretét feldarabolni. A feldarabolás a BCKDH komplex E1-alfa alegységét kódoló gén 5' felét érintő, körülbelül 1,4 kb hosszúságú kromoszomális delécióval jár. A kapott mutáns törzs, amely egy *bkd* mutáns valamennyi jellemző fenotípusos sajátosságát mutatja, stabil, és fermentációval új, értékes avermektinek előállítására alkalmazható.

A találmány leírásában említett valamennyi dokumentumot

hivatkozásul említjük.

A leírásban alkalmazott szakkifejezések a molekuláris genetika területén jártas szakemberek számára jól ismertek. A találmányban gyakran említett kifejezések jelentését az alábbiakban foglaljuk össze.

Amplifikáció: egy (akár intrakromoszomális, akár extrakromoszomális DNS-ként jelenlevő) kromoszomális szekvencia további kópiáinak előállítás.

Antibiotikum-rezisztencia gén: olyan DNS-szekvencia, amely az adott antibiotikumra eredetileg érzékeny gazdasejtbe juttatva antibiotikum rezisztenciát biztosít a sejt számára (antibiotikum markerként is ismert).

Klón: közös össel (eredettel) rendelkező nagyszámú sejt vagy molekula.

Klónozó vektor: olyan plazmid, amelybe klónozni kívánt, idegen DNS inszertálható. A transzformáció során idegen DNS-t szállít a gazdasejtbe.

CoA: Koenzim A.

Ragadás vég szekvencia (Cos): lambda bakteriofágból származó, *in vitro* pakolódást lehetővé tevő DNS-szekvencia.

Kozmid: olyan plazmid, amelybe lambda bakteriofág *cos* helyeket inszertáltunk; ennek eredményeként a plazmid DNS (amely idegen DNS inszerteket hordoz) *in vitro* a fág burkába pakolható.

cRNS: DNS-sel komplementer, egyszálú RNS, amelyet a DNS-ből *in vitro* transzkripcióval szintetizálunk.

Crossover: olyan esemény, melynek során a klónozott szekvencia és kromoszomális párja között reciprok kicserélődés történik.

Dalton (D): molekulatömeg egység, amely egy hidrogénatom tömegének felel meg.

DNS-ligálás: két DNS-fragment közötti kémiai kötés kialakítása.

Kettős crossover esemény: egyszerre vagy egymás után lejátszódó két crossover, melynek eredményeként a klónozott és a gazda szekvencia között reciprok kicserélődés történik.

Gén-cluster: egy kromoszómán egymás közelében elhelyezkedő gének csoportja.

Génhelyettesítés: egy plazmidban hordozott, *in vitro* eredetű mutáció bevitelére alkalmas technika. A helyettesítés akkor történik, amikor egy gazda kromoszóma és a vele homológ

régiót tartalmazó plazmid rekombinálódik.

Genom: teljes kromoszóma készlet, az egyedi gének összessége.

Hibridizáció, telephibridizáció: kiméra vektorokat (melyek inszertált DNS-e valamilyen adott szekvenciához hasonló) hordozó baktérium-telepek azonosításához alkalmazott technika.

Hifa: A penészgombák növekvő vagy vegetatív alakjának legfőbb eleme. A hifák kb. 2-10 mikron átmérőjű tömlős szerkezetűek, melyek összefonódó szálakból álló micéliumot alkotnak.

kb: a DNS vagy RNS hosszúságát mutató kilobázispár (1000 bázispár) rövidítése.

Linker: Rövid, szintetikus oligonukleotid, amely egy vagy több restriktációs enzim felismerési (cél) helyét tartalmazza. Vektorhoz új polilinker vagy többszörös klónozó hely (MCS; multiple cloning site) kialakítása érdekében adjuk.

NADH: redukált nikotin-amid-adenin-dinukleotid.

Nukleotid: a nukleinsavak építőkövei vagy monomer egységei.

Oligonukleotid: nukleotidokból álló rövid lánc.

Operon: komplett bakteriális génexpressziós és szabályozási egység, mely strukturális génekből, regulátor génekből, és a regulátor géntermék(ek) által felismert kontroll elemekből áll.

Plazmid: autonóm, önreplikációra képes, extrakromoszomális, cirkuláris DNS.

Plazmid kópiaszám: a baktériumokban az egyes kromoszómákra jutó plazmid-molekulák száma.

Primer: rövid DNS- vagy RNS-szekvencia, amely egyszálú DNS-sel párosodik és szabad 3'-hidroxil véget eredményez, amelynél a DNS polimeráz megkezdí a dezoxiribonukleotid lánc szintézisét.

Prokarióta sejtek: kisméretű, viszonylag egyszerű sejtek; ezek közé tartozik a legtöbb mikroorganizmus.

Promoter: a DNS azon szakasza, amely a transzkripció beindításáért felelős.

Restrikciós enzim: a DNS specifikus, rövid szekvenciáját felismerő enzim, amely a felismert helynél hasítja a DNS-t.

Restrikciós felismerési szekvencia: egy bizonyos restrikciós enzim által specifikusan felismert DNS-szekvencia (célhelyként is ismert).

Shuttle (ingázó) vektor: kétfunkciós klónozó vektor, amely egy vagy több különböző gazdában (pl. *E. coli*-ban és *Streptomyces*-ben) képes replikálódni.

Egyszeri crossover esemény: egy pontnál lejátszóddó egyszeri reciprok genetikai rekombináció, amely egy külső eredetű cirkuláris plazmid vagy fágvektor beépülését és a homológ kromoszóma szekvencia duplikációját eredményezi.

Southern blot technika: denaturált DNS agaróz gélről nitrocellulóz filterre történő átmásolásának technikája; a filteren a DNS komplementer nukleinsav-próbával hibridizálható.

Szubklónozás: klónozott DNS-fragmentek egyik típusú vektorból másik típusú vektorba (pl. rekombináns kozmidból plazmidba) történő átvitele. Az új rekombináns plazmidot azután alkalmas gazdasejtbe transzformáljuk, miáltal szubklón törzset kapunk.

Baktériumsejtek transzformációja: új genetikai markerek begyűjtése külső eredetű DNS beépítésével.

A találmány tárgya izolált DNS-szegment, amely *Streptomyces* nemzetségbe tartozó organizmus elágazó láncú alfa-ketosav dehidrogenáz komplexét kódolja.

A találmány további tárgya a fentebb említett izolált

DNS-szegment, amely tartalmaz egy olyan DNS-régiót is, amely szabályozza az említett elágazó láncú alfa-ketosav dehidrogenáz komplex expresszióját.

A találmány egy másik tárgya izolált DNS-szegment, amely a *Streptomyces avermitilis* elágazó láncú alfa-ketosav dehidrogenáz komplexét kódolja.

A találmány további tárgya izolált DNS-szegment, amely a későbbiekben bemutatott 1. számú szekvencia, 2. sz. szekv., 3. sz. szekv. vagy 4. sz. szekv. DNS-szekvenciáját vagy az ilyen szekvencia allélváltozatát tartalmazza. A találmány tárgya az említett DNS-szegment alegységét képező, és azzal funkcionálisan egyenértékű DNS-szegment is.

A találmány további tárgya (a) rekombináns DNS, amely az 1. sz. szekv., 2. sz. szekv., 3. sz. szekv. vagy 4. sz. szekv. DNS-szekvenciáját vagy az ilyen szekvencia allélváltozatát tartalmazza; (b) említett rekombináns DNS-t tartalmazó plazmid; és (c) gazdasejt, amelybe ilyen rekombináns DNS-t építettünk.

A találmány további tárgya az elágazó láncú alfa-ketosav dehidrogenáz komplexet kódoló gének, melyek a pCD713, pCD740, pCD747 és pCD854 plazmidok valamelyikéből származó DNS-szegmentben találhatók.

A találmány további tárgya DNS-szegment, amely az 1. sz.

szekv., 2. sz. szekv., 3. sz. szekv. vagy 4. sz. szekv. DNS-szekvenciáját vagy az ilyen szekvencia allélváltozatát tartalmazza.

A találmány további tárgya DNS-szegment, amely az 1. sz. szekv., 2. sz. szekv., 3. sz. szekv. vagy 4. sz. szekv. DNS-szekvenciájának alegységét képező DNS-szekvenciát vagy az ilyen szekvencia allélváltozatát tartalmazza, és amely próbaként alkalmazva képes az 1. sz. szekv., 2. sz. szekv., 3. sz. szekv., illetve 4. sz. szekv. DNS-szekvenciájához vagy allélváltozatához hibridizálni, illetve PCR primerként alkalmazva képes az említett szekvencia egészét vagy részletét amplifikálni.

A találmány további tárgya lényegében tisztított polipeptid, amely az 5. sz. szekv., 6. sz. szekv., 7. sz. szekv. vagy 8. sz. szekv. szerinti aminosav-szekvenciából áll.

A találmány további tárgya eljárás természetes avermektin előállítására, melynek során az ilyen természetes avermektin előállításához megfelelő feltételek és fermentációs tápközeg alkalmazásával olyan *S. avermitilis*-t fermentálunk, amelyben a *bkdF*, *bkdG* és *bkdH* gének közül egyet vagy többet tartalmazó genomiális fragment kópiaszámát növeltük.

A találmány további tárgya eljárás természetes avermektin előállítására, melynek során az ilyen természetes avermektin

előállításához megfelelő feltételek és fermentációs tápközeg alkalmazásával olyan *S. avermitilis*-t fermentálunk, amelyben a *bkdF*, *bkdG* és *bkdH* gének közül egyet vagy többet tartalmazó genomiális fragment expresszióját az expresszió szabályozásáért felelős gének manipulációjával vagy helyettesítésével fokoztuk.

A találmány további tárgya eljárás új avermektin előállítására, melynek során az ilyen új avermektin előállításához megfelelő feltételek és fermentációs tápközeg alkalmazásával olyan *S. avermitilis*-t fermentálunk, amelyben a *bkdF*, *bkdG* és *bkdH* gének közül egyet vagy többet tartalmazó genomiális fragment expresszióját az expresszióért felelős gének deléciójával, inaktiválásával, helyettesítésével vagy másfajta manipulációjával csökkentettük vagy megszüntettük.

A találmány egyik előnyös megvalósítási módja az új avermektin említett eljárására vonatkozik, melynek során az ilyen új avermektin előállításához megfelelő feltételek és fermentációs tápközeg alkalmazásával olyan *S. avermitilis*-t fermentálunk, melyben a *bkdF*, *bkdG* és *bkdH* gének közül egyet vagy többet tartalmazó genomiális fragmentet delécióval eltávolítottuk vagy inaktiváltuk.

A találmány további tárgya eljárás új avermektin előállítására, melynek során az ilyen új avermektin előállításához megfelelő feltételek és fermentációs tápközeg

alkalmazásával olyan *S. avermitilis*-t fermentálunk, melyben a *bkdA*, *bkdB* és *bkdC* gének közül egyet vagy többet, valamint a *bkdF*, *bkdG* és *bkdH* gének közül egyet vagy többet tartalmazó genomiális fragment expresszióját az expresszióért felelős gének deléciójával, inaktiválásával, helyettesítésével vagy manipulációjával csökkentettük vagy megszüntettük.

A találmány egyik előnyös megvalósítási módja egy új avermektin fenti előállítási eljárására vonatkozik, melynek során az ilyen új avermektin előállításához megfelelő feltételek és fermentációs tápközeg alkalmazásával olyan *S. avermitilis*-t fermentálunk, amelyben a *bkdA*, *bkdB* és *bkdC* gének közül egyet vagy többet, valamint a *bkdF*, *bkdG* és *bkdH* gének közül egyet vagy többet tartalmazó genomiális fragmentet delécióval eltávolítottunk vagy inaktiváltunk.

Az ábrák rövid leírása

Az 1. ábrán *S. avermitilis bkdF* gén (E1-alfa BCKDH) egy fragmentjének klónozásához alkalmazott polimeráz láncreakció (PCR) primerek nukleotid-szekvenciáját mutatjuk be. Mindegyik primert egy 9 aminosavas konzervált régió alapján terveztük. Az egyes konzervált aminosavaknak megfelelő kodonokat a megfelelő tripletek feletti vonallal jelöljük. A jobboldali primert (1/A ábra) a humán E1-alfa BCKDH alegység 192-200. aminosavait magában foglaló régió alapján alakítottuk ki (mely régiót az E1-alfa BCKDH alegység

representatív modelljeként alkalmaztunk). Az baloldali primert (1/B ábra) E1-alfa BCKDH alegység 286-293. aminosavait magában foglaló régió alapján alakítottuk ki. A jobboldali primer 5'-végén két adenin-tartalmú nukleotid, valamint két restriktációs enzimes felismerési hely (EcoRI és SacI) található, melyeket a PCR termékek klónozásának elősegítése érdekében alkalmaztunk. A baloldali primer 5'-végén szintén két adenin-tartalmú nukleotid, valamint két restriktációs enzimes felismerési hely (BamHI és XbaI) található.

A 2. ábrán a *Streptomyces avermitilis* *bkdFGH* gén-clusterének genomiális restriktációs térképét, elhelyezkedését és szubklónjait mutatjuk be. Az ábrán feltüntettük a korábban leírt *bkdABC* gén-cluster (ld. Denoya, C.D., 08/100,518 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalom) elhelyezkedését is. A térkép alatti kis sötét téglalapok a PCR alkalmazásával klónozott eredeti E1-alfa-specifikus *S. avermitilis* genomiális fragmentek elhelyezkedését és orientációját jelzik. Az ábrán feltüntettük a genomiális szubklónokat (a pGEM-3Z származékait), valamint az E1-alfa, E1-béta és E2 BCKDH alegységeket kódoló *bkdF*, *bkdG*, illetve *bkdH* strukturális gének elhelyezkedését és szerveződését is. Az azonosított nyitott leolvasási keretek leolvasási iránya balról jobbra haladó. Rövidítések: B: BamHI; Bg: BglII; P: PstI; S: SphI. Az "X" a *bkdF* nyitott leolvasási keretétől downstream irányban elhelyezkedő DNS-régiók szekvenálásához alkalmazott (ld. később) mini-gamma-delta-1 transzpozon

inszerció helyét jelöli.

A 3. ábrán az 1. ábrán látható primerek alkalmazásával, PCR technikával klónozott 501 bp-os *S. avermitilis* genomiális DNS-fragment (CD613) nukleotid-szekvenciáját és az abból leszármaztatott transzlációs termék aminosav-szekvenciáját mutatjuk be. Ez a genomiális fragment a *bkdF* gén (E1-alfa BCKDH) részét tartalmazza. A nukleotidokat a szekvenciák fölött számozzuk. A leszármaztatott aminosav-szekvenciát a megfelelő kodonok szekvenciája alatt tüntetjük fel.

A 4. ábrán a pCD746 szubklón PstI végéből SP6 vektor primer alkalmazásával szekvenált, 201 bp-os *S. avermitilis* genomiális DNS-régió nukleotid-szekvenciáját és leszármaztatott transzlációs termékének aminosav-szekvenciáját mutatjuk be. A leszármaztatott transzlációs termék a BCKDH komplex (*bkdG* génnek megfelelő) E1-béta komponensének részét reprezentálja. A nukleotidokat a szekvenciák fölött számozzuk. A leszármaztatott aminosav-szekvenciát a megfelelő kodonok szekvenciája alatt tüntetjük fel.

Az 5. ábrán a 4,1 kb-os BamHI genomiális fragmentben a *bkdF* gént tartalmazó BamHI végtől hozzávetőleg 1,7 kb távolságban elhelyezkedő mini-gamma-delta-1 "A3" inszerció mindkét végéből szekvenált, 194 bp-os *S. avermitilis* genomiális DNS-régió nukleotid-szekvenciáját (CD785 szekvencia) és leszármaztatott transzlációs termékének

aminosav-szekvenciáját mutatjuk be. A leszármaztatott transzlációs termék a BCKDH komplex (*bkdG* génnek megfelelő) E1-béta komponensének C-terminális végét reprezentálja. A nukleotidokat a szekvenciák fölött számozzuk. A leszármaztatott aminosav-szekvenciát a megfelelő kodonok szekvenciája alatt tüntetjük fel.

A 6. ábrán a 4,1 kb-os BamHI genomiális fragmentben a *bkdF* gént tartalmazó BamHI végtől hozzávetőleg 3 kb távolságban elhelyezkedő mini-gamma-delta-1 "A5" inszerció mindkét végéből szekvenált, 455 bp-os *S. avermitilis* genomiális DNS-régió nukleotid-szekvenciáját (CD786 szekvencia) és leszármaztatott transzlációs termékének aminosav-szekvenciáját mutatjuk be. A leszármaztatott transzlációs termék a BCKDH komplex (*bkdH* génnek megfelelő) E2 komponensének C-terminális végét reprezentálja. A nukleotidokat a szekvenciák fölött számozzuk. A leszármaztatott aminosav-szekvenciát a megfelelő kodonok szekvenciája alatt tüntetjük fel.

A 7. ábrán a pCD768 génhelyettesítő vektor kialakítását, valamint a CD794 *S. avermitilis bkdF* mutáns törzs genomiális restrikciós térképét mutatjuk be. A pCD768 plazmid a pCD262 ingázó vektor származéka, amely az *ermE* markert (sötét nyíl) szegélyező 2,3 kb-os és 4,1 kb-os BamHI genomiális *S. avermitilis* fragmenteket hordozza. A pCD761 plazmid egy köztestermék (ld. lentebb). Az ábrán bemutatjuk a *S. avermitilis* kromoszóma *bkdF* gént tartalmazó régiójának

genomiális restrikciós térképét (vad típusú és a helyettesített törzs) is. Ezeket a térképeket (próbaként 5,0 kb-os PstI genomiális fragment alkalmazásával) Southern hibridizációs analízis alapján készítettük. Rövidítések: B: BamHI; P: PstI. Az egyes DNS-fragmentek felett lévő számok a fragmentek hosszát jelentik (kb-ban).

A 8. ábrán a pCD768 génhelyettesítéssel vektor restrikciós térképét mutatjuk be. A sötétített ívek jelentése: tsr: thiostrepton-rezisztencia marker; amp: ampicillin-rezisztencia marker; "2,3": 2,3 kb-os *S. avermitilis* BamHI genomiális fragment; erm: eritromicin-rezisztencia marker; "4,1": 4,1 kb-os *S. avermitilis* BamHI genomiális fragment. A *Streptomyces* és *E. coli* replikációs kezdőhely régiókat szintén feltüntettük. Az üres ívek az *E. coli* vektor régiót jelölik. A nyilak a transzkripció és transzláció irányát mutatják.

A 9. ábrán a *bkd*ABCF mutáns kialakításának menetét mutatjuk be. Az ábrán látható a vektor konstrukciók és a megcélzott genomiális régiók genomiális restrikciós térképe és egyszerűsített sémája. A *bkd* gén-clusterek elhelyezkedése, a nyitott leolvasási keretek orientációja és a rövidítések megegyeznek a 3. ábrához leírtakkal. A delécióval eltávolított szakaszokat árnyékolt sávokkal jelöljük. A folytonos és szaggatott vonalak kromoszomális, illetve vektor DNS-t jelölnek. A vastag fekete vonalak a génhelyettesítéshez alkalmazott, klónozott genomiális

fragmenteket ábrázolják. A függőleges nyilak az antibiotikum-rezisztencia marker inszerciójának helyét mutatják.

A találmány szerinti új DNS-szekvenciákat két molekuláris genetikai technika, a polimeráz láncreakció (PCR) és a homológ próba tesztelés alkalmazásával klónoztuk.

A találmány szerinti új DNS-szekvenciák azonosításához és klónozásához, valamint *bkd* mutáns génhelyettesítéssel történő kialakításához alkalmazott eljárásokat az alábbiakban írjuk le.

Először a különböző fajokból származó, leszármaztatott E1-alfa BCKDH peptid-szekvenciák egymás alá rendezése (multiple alignment) segítségével azonosított, konzervált régiók alapján két PCR primert ("jobb" és "bal", ld. 1/A és 1/B ábra) alakítottunk ki. A *S. avermitilis* genomialis DNS-ének jobb- és baloldali primer alkalmazásával végzett PCR amplifikációjával hozzávetőleg 0,55 kb hosszúságú PCR terméket detektáltunk. Ezt az amplifikált DNS-fragmentet az pGEM-3Z *E. coli* vektorba klónoztuk, hogy rekombináns pCD613 plazmidot állítsunk elő. Ezután a pCD613 plazmidot DH5-alfa kompetens *E. coli* sejtekbe transzformáltuk. Egy transzformánst kiválasztottunk, és ezt CD613-as törzsnek neveztük el. A klónozott CD613 DNS-fragment szekvenálásával egy nyitott leolvasási keret létezését mutattuk ki, melynek leszármaztatott peptidje igen homológ volt az E1-alfa BCKDH

alegységgel (3. ábra). Ezután a klónozott CD613 genomiális DNS-fragmentet *S. avermitilis* kromoszóma könyvtár telephibridizációval végzett screeneléséhez próbaként alkalmaztuk. Több kozmid klónt azonosítottunk, és restriktációs és Southern blot analízisekkel kimutattuk, hogy valamennyi kiválasztott kozmid klón hordozott átfedő genomiális fragmenteket. A szubklónozott genomiális DNS-fragmentekből nyert kromoszomális régió DNS-szekvenálásával (amit a 6. példában írunk le részletesen) bebizonyítottuk, hogy a CD613 szekvencia a teljes *bkd* gén-cluster részét képezi. A klónozott *S. avermitilis* *bkd* gének a kromoszóma hozzávetőleg 4 kb hosszúságú régióját (2. ábra) foglalják magukban. DNS-szekvencia analízissel *bkd* strukturális gének jelenlétét mutattuk ki, melyek E1-alfa (*bkdF*), E1-béta (*bkdG*) és E2 (*bkdH*) ORF sorrendben clusterré szerveződve helyezkedtek el (2-6. ábra).

Ezután a *bkdF* gén inaktivált változatát hordozó plazmidot konstruáltunk. Amint a 2. ábrán látható, a *S. avermitilis* kromoszómában három szomszédos BamHI restriktációs fragmentet térképeztünk, melyek mérete (balról jobbra): 2,3 kb, 1,4 kb és 4,1 kb. Az 1,4 kb-os BamHI genomiális fragment az E1-alfa nyitott leolvasási keret (ORF-1) (*bkdF* gén) kezdeti részét tartalmazza. A 4,1 kb-os BamHI fragment a *bkd* gén-cluster többi részét (*bkdF* gén vége, *bkdG* és *bkdH*) hordozza. A pCD768 plazmid a pCD262 vektor származéka, amely két *S. avermitilis* genomiális fragmentet (2,3 kb-os és 4,1 kb-os BamHI fragmen) hordoz, melyek a kromoszóma 1,4 kb-os BamHI

fragmentjével (annak mindkét oldalán) szomszédosak. Ezenkívül, a pCD768 plazmid a 2,3 kb-os és a 4,1 kb-os BamHI fragment között elhelyezkedő *ermE* markert is hordozza. Az eritromicinnel szemben rezisztenciát biztosító *ermE* marker az ORF-1-hez (*bkdF*) képest ellenkező orientációban fekszik, hogy elkerülhetők legyenek a downstream irányban elhelyezkedő gének túlexpresszáldásából eredő esetleges problémák. Ez a konstrukció rekombináció következtében 1,4 kb-os deléciót okoz a gazda genomban (amely az ORF-1-et érinti; részletesebben ld. később).

A pCD768 plazmidot *S. avermitilis* ATCC 31272 SC2 gazda protoplasztokba transzformáltuk. Két transzformánst választottunk ki, melyek az eritromicin és a thiostrepton antibiotikumra egyaránt rezisztensek voltak (*erm-R*, ill. *tsr-R*). Az 1. számú transzformánst (CD783) folyékony tápközegben növesztettük, protoplasztokat készítettünk, és ezeket eritromicint tartalmazó agar táptalajra kentük. A további analízishez ötven klónt választottunk ki; ezek közül 46 *erm-R* és *tsr-R*, míg 4 *erm-R* és *tsr-S* (*tsr*-szenzitív) volt. Az utóbbi négy klón *bkd*-deficiens fenotípust mutatott, ami az alábbiakban nyilvánult meg: ILV minimál táptalajon képtelenek voltak növekedni; nem mutattak detektálható E1 (elágazó láncú dekarboxiláz) aktivitást; és a fermentáció hatására akkor sem voltak képesek természetes avermektineket szintetizálni, ha a tápközeget S-(+)-2-metil-vajsavval vagy izovajsavval egészítettük ki (ld. 9. példa). Ráadásul, ha a fermentációs tápközeghez CHC-t adtunk, új avermektinek (CHC-

-avermektinek) szintetizálódtak, ami azt bizonyítja, hogy a *bkd* blokkolás nem befolyásolja az avermektin celluláris bioszintetikus mechanizmusát. E négy klón közül egyet (pp15 klón) hivatalosan *S. avermitilis* CD794 törzsnek neveztünk el, s a találmány példaként szolgáló törzseként az American Type Culture Collection-nél helyeztük letétbe. Southern hibridizációs analízissel végül beigazolódott, hogy a *bkdF* génnek megfelelő ORF-1 a *S. avermitilis* ATCC 31272 SC2 törzsben végzett génhelyettesítés hatására, a várakozásoknak megfelelően, feldarabolódott.

A *S. avermitilis bkd* génjeinek klónozása során végzett lépések teljes leírását és a kapott eredményeket az alábbiakban foglaljuk össze.

(a) Az E1-alfa BCKDH peptid alegységében olyan konzervált régiók azonosítása, amelyek a PCR primerek kötődéséhez megfelelő helyként szolgálhatnak

Négy E1-alfa BCKDH peptid-szekvenciával végeztünk alignment-et, hogy a megfelelő PCR primerek kialakításához alkalmas szekvenciaként szolgáló konzervált régiókat azonosítsunk. A vizsgálathoz emberből (Fischer és mtsi., J. Biol. Chem., 264, 3448-3453, 1989), patkányból (Zhang és mtsi., J. Biol. Chem., 262, 15220-15224), *Pseudomonas putida*-ból (Sokatch és mtsi., Eur. J. Biochem., 176, 311-317, 1988) és *Bacillus stearothermophilus*-ból származó (Perham és mtsi., Eur. J. Biochem., 191, 337-346, 1990)

E1-alfa BCKDH peptid-szekvenciákat alkalmaztunk. Az E1-alfa alegység prokarióta és eukarióta BCKDH komplexekben egyaránt nagymértékben konzervált régióinak azonosítása érdekében végzett számítógépes analízishez a GCG szekvencia-analizáló szoftver csomag (GCG, Madison, WI) LineUp és Pretty programját alkalmaztuk. A négy E1-alfa BCKDH peptid multiple alignment-je több homológ régiót eredményezett (ld. Wexler, I.D. és mtsi., FEBS Lettère, 282, 209-213, 1991). A humán E1-alfa alegység 182. és 229. aminosavai között elhelyezkedő tiamin pirofoszfát-kötő motívum (Perham és mtsi., FEBS Letters, 255, 77-82) és a 291-307 aminosavakra kiterjedő, 1. és 2. foszforilációs helyet magában foglaló régió mind a négy vizsgált E1-alfa BCKDH peptidben jelentős mértékben konzervált volt. Szintén jelen volt egy korábban leírt, nagymértékben homológ régió, amely a 245. és 289. aminosavak között helyezkedik el. Úgy tűnik, ez a régió egyedülálló az alfa-ketosav dehidrogenázokban (melyek alfa és béta alegységekkel egyaránt rendelkeznek), és az *E. coli* PDH E1, valamint az *E. coli* és élesztő alfa-ketoglutarát dehidrogenáz komplexek E1 komponensének egyik szekvenciájával sem homológ, mely utóbbiak olyan dimerek, amelyek egyetlen E1 polipeptidől állnak. A fenti okok miatt felvetették, hogy az utóbbi homológ régió játszik szerepet az alegység interakcióban (Patel és mtsi., FEBS Letters, 282, 209-213, 1991). A PCR primerek tervezéséhez kiválasztott konzervált régiók a humán E1-alfa BCKDH protein 192-200., valamint 286-293. aminosavait kódolják.

(b) Az E1-alfa BCKDH konzervált régiókból származó új oligonukleotidok kialakítása PCR primerként való alkalmazáshoz

Amint fentebb leírtuk, a multiple alignment vizsgálat eredményeként az E1-alfa BCKDH alegység két konzervált régióját választottuk ki. A jobboldali PCR primert (1/A ábra) a humán E1-alfa BCKDH alegység 192-200. aminosavait magában foglaló, a humán E1-alfa BCKDH alegység reprezentatív modelljeként alkalmazott régió alapján alakítottuk ki. Ezek az aminosavak a tiamin pirofoszfát kötési motívumon belül helyezkednek el. A baloldali primert (1/B ábra) a humán E1-alfa BCKDH alegység 286-293. aminosavait magában foglaló régió alapján alakítottuk ki. Az utóbbi aminosav-szekvencia az alegység kölcsönhatási hely végét és a foszforilációs hely kezdetét (két konzervált régió) foglalja magában. *Streptomyces* gén kodon-kijelölést alkalmaztunk (F. Wright és M.J. Bibb, Gene, 113, 55-65, 1992). A jobboldali primer 5'-végén két adenin-tartalmú nukleotid, és két restrikciós enzimes felismerési hely (EcoRI és SacI) volt, hogy megkönnyítsük a PCR termékek klónozását. A baloldali primer 5'-végén szintén két adenin-tartalmú nukleotid, valamint két restrikciós enzimes felismerési hely (BamHI és XbaI) volt.

A jobboldali primer teljes szekvenciája:

5'-AAGAATTCGAGCTCGGCGACGGCGCCACCTCCGAGGGCGAC-3'

(9. sz. szekv.)

A baloldali primer teljes szekvenciája:

5'-AAGGATCCTCTAGAGGTSSWGTGGKGGCCGATSCGGWA-3' (10. sz. szekv.)

A DNS-szekvenciák leírásához a nukleotidok nomenklaturájának International Union of Biochemistry (IUB) szerinti szabályait alkalmaztuk. A redundanciákat az IUB Group Codes szerint jelöltük: K = G+T, S = G+C; W = A+T. Az E1-alfa *bkd* génekkel nem homológ restrikciós felismerési szekvenciákat, melyeket klónozást elősegítő célból a primerekbe foglaltunk, aláhúzással jelöltük (ld. 1. ábra).

(c) A *S. avermitilis* genomiális PCR-fragmentjeinek PCR-amplifikációja

Nagy GC tartalommal rendelkező DNS-hez alkalmas, valamint a *Streptomyces* nemzetségbe tartozó gombák DNS-ének hatékony és specifikus amplifikációját elősegítő reakciófeltételek alkalmazásával, enzimatikus módszerekkel, *S. avermitilis* genomiális DNS-t amplifikáltunk (ld. 2. példa). A PCR-t a fentebb leírt primer kombináció alkalmazásával hajtottuk végre (jobboldali primer, 5'-AAGAATTCGAGCTCGGCGACGGCGCCACCTCCGAGGGCGAC-3'; [9. sz. szekv.]; baloldali primer 5'-AAGGATCCTCTAGAGGTSSWGTGGKGGCCGATSCGGWA-3' [10. sz. szekv.]). Az amplifikációs termékeket agaróz gélelektroforézissel méret szerint frakcionáltuk. E primer-kombináció alkalmazásával a fentebb leírt PCR reakciófeltételek mellett egyetlen (kb. 550 bp hosszúságú) DNS sávot detektáltunk.

(d) Az amplifikált genomiális DNS-fragment *Escherichia coli* klónozó vektorba történő klónozása, és *E. coli* gazdasejtbe való transzformálása

Amint fentebb említettük, a jobboldali PCR primerbe — a klónozás megkönnyítése érdekében — egy EcoRI restrikciós helyet építettünk, míg a baloldali primer 5'-végén egy XbaI restrikciós hely található. A 0,55 kb-os PCR fragmentet elektroelúcióval kinyertük az agaróz gélből, és EcoRI és XbaI restrikciós enzimekkel emésztettük. Miután a specifikus fragmentet (a pCD613 plazmidot kialakítva) linearizált *E. coli* vektorba (pGEM-3Z) ligáltuk és kompetens *E. coli* sejtekbe transzformáltuk, sok rekombináns klónt kaptunk. A további karakterizáláshoz kiválasztottunk egy transzformánst, s ezt CD613 törzsnek neveztük el. Igazoló restrikciós analízissel kimutattuk, hogy a CD613 *E. coli* törzsből izolált pCD613 plazmid valóban tartalmazta a 0,55 kb-os *S. avermitilis* inszertet.

(e) A klónozott fragment DNS-szekvenálása és a bkd-specifikus szekvenciák azonosítása

A pCD613 plazmidban található 0,55 kb-os inszertet vektor primer pár alkalmazásával, kétszálú szekvenálási módszerrel szekvenáltuk (ld. 6/A példa). A 0,55 kb-os PCR inszerten belül található 0,35 kb-os SalI fragmentet M13 bakteriofágba szubklónoztuk, és egyszálú szekvenálási eljárással szekvenáltuk (ld. 6/B példa). A DNS-szekvenálást egyszálú

DNS templát és TaqTrack készlet (Promega) alkalmazásával a didezoxi-nukleotid-láncterminációs eljárással végeztük. A DNS-szekvenálási adatok kodon-preferencia analízisével (GCG szekvencia analizáló szoftver csomag, Madison, WI) a *Streptomyces* génekre várt kodonalkalmazást mutató nyitott leolvasási keret létezését mutattuk ki.

Ezután a feltételezett nyitott leolvasási keretet az IntelliGenetics Suite szoftver Seq and Translate programjának (IntelliGenetics Inc., Mountain View, California) alkalmazásával aminosav-szekvenciává fordítottuk át. Végül, a kérdéses peptid-szekvenciával kapcsolatban adatbanki hasonlóságokat kerestünk, amihez az IntelliGenetics szoftver FASTDB programját használtuk. Akár DNS adatbankokat (GenBank[®]; National Institute of Health; European Molecular Biology Laboratory [EMBL], Heidelberg, Németország), akár protein adatbankokat (PIR és Swiss-Prot) vizsgáltunk, a kutatás eredménye egyértelműen azt mutatta, hogy a CD613 klónból származó szekvencia nagymértékben homológ, de új, és különbözik valamennyi, az adatbankokban szereplő prokarióta vagy eukarióta E1-alfa BCKDH peptidtől. Ezenkívül, a *bkdA* gén által kódolt (ld. Denoya, C.D., "Cloned genes encoding branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex from *Streptomyces avermitilis*", 08/100,518 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, 1993, július 30.) új *S. avermitilis* E1-alfa BCKDH peptid-szekvenciát szintén összehasonlítottuk. Ebből a vizsgálatból szintén arra a következtetésre jutottunk, hogy

a CD613 *E. coli* törzsben klónozott 550 bp-os *S. avermitilis* genomiális PCR termék valóban új E1-alfa *bkd* gén-fragment.

(f) A teljes *S. avermitilis bkd* gén-cluster klónozása, restrikciós és Southern blot analízise, valamint kromoszóma térkép készítése

Amint fentebb leírtuk, az eredeti 0,55 kb-os PCR fragment tartalmaz egy belső, 0,35 kb-os SalI fragmentet. Ezt a kis fragmentet *S. avermitilis* genomiális DNS kozmid könyvtár telephibridizációval végzett screeneléséhez radioaktívan jelölt próbaként alkalmaztuk. A screenelés eredményeként tíz klónt azonosítottunk, illetve nyertünk ki. Restrikciós és Southern blot hibridizációs vizsgálatokkal kimutattuk, hogy ez a tíz klón azonos kromoszóma régióból származó, átfedő szekvenciákat tartalmaz. Az előbbi próbát stringens feltételek mellett *S. avermitilis* ATCC 31272 SC2 törzsből származó, emésztett kromoszomális DNS Southern blotjaival szemben alkalmaztuk. Ezzel a vizsgálattal bebizonyítottuk a genomkönyvtárból nyert klónok azonosságát. A kozmid klónok közül kettő, meglepő módon, szintén *bkdA*-specifikus próbához hibridizált (Denoya, C.D., "Cloned genes encoding branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex from *Streptomyces avermitilis*", 08/100,518 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, 1993, július 30.), ami azt sugallja, hogy az itt leírt *bkd* gén (*bkdF*) a *bkdA*, *bkdB* és *bkdC* génekből álló cluster közelében helyezkedhet el. A *S. avermitilis* CD613 szekvenciát

tartalmazó genomiális régióról restrikciós térképet készítettünk (2. ábra). A fenti hibridizációs adatokból arra következtetünk, hogy a *bkdF* gént csak 12 kilobázis választja el a *bkdABC* gén-clustertől.

(g) Kozmid klónokból származó genomiális DNS-fragmentek szubklónozása; a *bkd* gén-clustert tartalmazó *S. avermitilis* kromoszóma régió DNS-szekvenálása

A *S. avermitilis* kromoszóma teljes CD613 *bkd* régióját lefedő BamHI és PstI genomiális fragmenteket DNS-könyvtárból származó kozmid klónokból a pGEM-3Z *E. coli* vektorba szubklónoztuk. Az e munka során létrehozott szubklónok listája, az egyes plazmidok rövid leírásával, az alábbi:

1. pCD740 plazmid; 2,3 kb-os BamHI fragmentet tartalmaz;
2. pCD854 plazmid; 1,4 kb-os BamHI fragmentet tartalmaz;
3. pCD713 plazmid; 4,1 kb-os BamHI fragmentet tartalmaz;
4. pCD747 plazmid; kb. 5 kb-os PstI inszertet tartalmaz.

(A fenti négy plazmidnak megfelelő CD740, CD854, CD713, illetve CD747 *E. coli* törzseket az American Culture Type Collection-nél helyeztük letétbe. Ezekívül, a pCD713 plazmidban lévő 4,1 kb-os BamHI fragmentből egy hozzávetőleg 3,1 kb-os PstI/BamHI fragmentet származtattunk le. A kapott új konstrukciót pCD764-nek neveztük el, és DNS-szekvenáláshoz alkalmaztuk (ld. később). Az egyes szubklónok azonosságát plazmid restrikciós térképezéssel, Southern hibridizációval és PCR analízissel igazoltuk.

- (h) A klónozott DNS-fragmentekből kapott DNS-szekvenálási adatok számítógépes analízise és a *S. avermitilis* E1-alfa, E1-béta és E2 nyitott leolvasási keretek azonosítása

A DNS-szekvenálási adatokat számos különböző szubklónból és konstrukcióból kaptuk:

1. CD613: a fenti (c) és (d) szakaszban és a 2. és 3. példában leírt eredeti PCR klónt képviseli, és a BCKDH komplex E1-alfa komponensét kódoló *bkdF* génnek megfelelő 1. nyitott leolvasási keret (ORF-1) részét tartalmazza.
2. CD746: A pCD713 plazmidból származó 3,1 kb-os PstI/BamHI fragmentet (ld. (g) rész) reprezentálja. A pCD746 plazmid PstI végének SP6 primer (Promega Co.) alkalmazásával végzett szekvenálásával kapott adatok az ORF-2 rész jelenlétét mutatták, amely a BCKDH komplex E1-béta komponensét kódol *bkdG* génnek felel meg (4. ábra).
3. CD785: mini-gamma-delta-1 transzpozon inszerció, melyet a 4,1 kb-os klónozott BamHI genomiális fragmentben a *bkdF* nyitott leolvasási keretétől downstream irányban elhelyezkedő DNS-régiók szekvenálására alkalmazunk. Ezt az "A3" elnevezésű mini-gamma-delta-1 inszerciót a *bkdF* gént tartalmazó BamHI végtől hozzávetőleg 1,7 kb távolságban helyeztük el. Az A3 inszerció mindkét végétől elvégzett DNS-szekvenálás (ld. 6/C példa)

eredményeként az E1-béta ORF (ORF-2) (*bkdG*; 5. ábra) végének megfelelő ORF jelenlétét mutattuk ki.

4. CD786: mini-gamma-delta-1 transzpozon inszerció, amelyet a klónozott 4,1 kb-os BamHI genomiális fragmentben lévő *bkdF* nyitott leolvasási kerettől downstream irányban elhelyezkedő DNS-régiók szekvenálásához alkalmazunk. Ezt az "A5" elnevezésű mini-gamma-delta-1 inszerciót a *bkdF* gént tartalmazó BamHI végtől hozzávetőleg 3 kb távolságban helyeztük el. Az A5 inszerció mindkét végétől elvégzett DNS-szekvenálás (ld. 6/C példa) eredményeként az E2 ORF (ORF-3) (*bkdH*; 6. ábra) végének megfelelő ORF jelenlétét mutattuk ki.

A *S. avermitilis* E1-alfa, E1-béta és E2 (részleges) *bkd* nyitott leolvasási kereteket (ORF-eket) tartalmazó, szekvenált genomiális régió csúszó (sliding) bázis-összetétel analízisét a "DNA Inspector" szoftver (Texto, N.H.) alkalmazásával végeztük. Ezzel a vizsgálattal a G+C tartalom folyamatos átlagának profilját kaptuk, melyhez 30 bázisos szakaszhosszúságot és 20-as kiegyenlítő (offset) értéket alkalmaztunk. A *S. avermitilis* kromoszóma e régiójának megfelelő összes G+C tartalom 69 % volt. A G+C tartalmat a kodon-pozíció függvényeként is vizsgáltuk. A nyitott leolvasási kereteket "CodonPreference" program (Genetics Computer Group, Madison, WI) és 64 génre vonatkozó *Streptomyces* kodon-felhasználtsági táblázat (F. Wright és M. J. Bibb, Gene, 113, 55-65, 1992) alkalmazásával detektáltuk.

A CodonPreference program egy keret-specifikus génkereső program, amely a proteint kódoló szekvenciákat a kodon-gyakoriság táblázattal mutatott hasonlóságuk, illetve az egyes kodonjaik harmadik helyén lévő összetételük (rendszerint GC) eltérése alapján ismeri fel. Az ORF-eket a nekik megfelelő leolvasási keret görbéje alatti dobozként mutatju be. Detektáltuk az összes kezdő (ATG) és stop kodont is (függőleges vonalak). Az egyes leolvasási keretekben talált ritka kodonokat az egyes ORF görbék alatt jelöltük. A G+C tartalmat 25 kodonnak megfelelő "csúszó ablak" (sliding window) alkalmazásával számítottuk ki, így körülbelül 25 kodonos késésre számíthatunk, mielőtt a protein kódoló régiójának teljes hosszát észlelnénk. Három profilt kaptunk: 1. (a triplet első helye), 2. (a triplet második helye), 3. (a triplet harmadik helye). A vizsgálat eredményeként három *bkd* ORF-et lokalizáltunk, melyek az E1-alfa, E1-béta és E2 BCKDH alegységeknek felelnek meg.

(i) *S. avermitilis bkd* mutáns létrehozása

A deléció beviteléhez alkalmazott technika a *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* és *Bacillus subtilis* esetében alkalmazott génhelyettesítési eljárás (Scherer, S. és R.W. Davis, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **76**, 4951-4955, 1979; Shortle, D. és mtsi., Science, **217**, 371-373, 1982; Stahl, M.L. és Ferrari, E., J. Bacteriol., **158**, 411-418, 1984) változata. E (specifikusan *Streptomyces*-re alkalmazott) technika általános leírását ld. Kieser, T. és Hopwood, D.A.,

"Genetic Manipulation of *Streptomyces*: Integrating Vectors and Gene Replacement", *Methods in Enzymology*, 204, 430-458, 1991). E technika részletes leírása, amely az egyedülálló telepizolátumok biztosításához és a plazmid-elimináció gyakoriságának fokozásához szükséges protoplaszt-képző lépést is magában foglal, Anzai és mtsi. cikkében található ("Replacement of *Streptomyces hygroscopicus* genomic segments with the *in vitro* altered DNA sequences", *Journal of Antibiotics*, XLI, (2), 226-233, 1988).

Egy mutált nagyüzemi törzs génhelyettesítéssel történő kifejlesztésének kulcslépése egy olyan integrációs vektor konstruálása, amely az adott törzsben hatékonyan működik. Amennyiben a *Streptomyces* kromoszómában helyettesítünk géneket, az egyik fő probléma a vektor eltávolítása. Megfelelő megoldásnak látszik olyan *Escherichia coli* plazmidok alkalmazása, amelyek *Streptomyces*-hez alkalmas szelektálható markereket tartalmaznak, mivel ezek a plazmidok *Streptomyces*-ben nem képesek replikálódni. Az *Escherichia coli* plazmidokat korábban sikerrel alkalmazták *S. ambofaciens*-ben és *S. lividans*-ban (Kieser, T. és Hopwood, D.A. "Genetic Manipulation of *Streptomyces*: Integrating Vectors and Gene Replacement", *Methods in Enzymology*, 204, 430-458, 1991). Ennek ellenére, kísérletünkben ez a módszer a *S. avermitilis*-be alacsony hatásfokú integrációt, többnyire egyszeres crossover eseményeket eredményezett.

Az utóbbi időben számos sokoldalú ingázó (shuttle) vektort fejlesztettünk ki, melyek *Streptomyces*-ben és *Escherichia coli*-ban egyaránt alkalmasak a klónozáshoz, és a *Streptomyces*-ben egyéb molekuláris genetikai technikákban is alkalmazhatók (C.D.Denoya, "Novel Bacterial Plasmid Shuttle Vectors for *Streptomyces* sp. and *Escherichia coli*" 1993. március 18-án benyújtott 032,925 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés). Ezek az ingázó vektorok szerkezetileg stabilak, és *Escherichia coli*-ban és számos *Streptomyces* fajban hatékony replikációra képesek, ami lehetővé teszi, hogy széles mérettartományú, klónozott DNS-fragmenteket lehessen egyik gazdából a másikba oda-vissza vinni. Az ingázó vektorok közül három (pCD262, pCD385 és pCD500) hőérzékeny *Streptomyces* replikációs kezdőhelyet tartalmaz, amely a *Streptomyces*-ben közepestől magas szintig szabályozza a kópiaszámot. E replikon hőérzékenysége alkalmassá teszi a *Streptomyces* génhelyettesítéssel kísérletekben és mutánsok kialakításában való felhasználásra.

A pCD262 és pCD500 ingázó vektorokat sikeresen alkalmaztuk a találmányban leírt *bkd*-deficiens törzs létrehozásában. Ez a vektor a *S. avermitilis*-ben önállóan replikálódó, nagy kópiaszámú plazmidok formájában stabilan fennmarad. Ha azonban egy, a fenti vektorok bármelyikével transzformált *S. avermitilis* törzset stresszhatásoknak vetünk alá (pl. magas hőmérséklet, spóráképzés, protoplaszt-képzés, regeneráció), számos plazmid-mentes telepet nyerhetünk. A *S. avermitilis*-

ben végzett génfelbontási kísérletekben kihasználtuk a pCD262, ill. pCD500 integrációs vektorként való felhasználásának lehetőségét.

S. avermitilis-ben a génhelyettesítés mechanizmusa feltehetően kettős crossover vagy egyszeres crossover, amely integrálódást és azt követően felbontási lépést eredményez, mely utóbbi során az integrálódott plazmid kivágódik. *S. avermitilis*-ben megfigyeltük mind a kettős, mind az egyszeres crossovert. Mindkét mechanizmus azonos terméket eredményez. E módszer alkalmazásával képesek voltunk felbontani a találmányban leírt *S. avermitilis bkd* gén-cluster *bkdF* génjének megfelelő E1-alfa nyitott leolvasási keretet. A felbontás egy kb. 1,4 kb-os kromoszómális delécióval jár, amely a BCKDH komplex alfa alegységét kódoló gén 5' oldali felét érinti. A kapott mutáns törzs, amely a *bkd* mutánsok valamennyi jellemző fenotípusos sajátosságával rendelkezik, stabil, és fermentáció útján értékes új avermektin termékek előállításához alkalmazható.

Közelebbről; létrehoztunk egy *bkdF* mutánst, oly módon, hogy a *S. avermitilis* ATCC 31272 SC2 kromoszómában lévő E1-alfa BCKDH (*bkdF*) gén egy szegmentjét a *Saccharopolyspora erythraea* eritromicin-rezisztenciát biztosító *ermE* génjével helyettesítettük. Amint fentebb említettük, ezt egy új, kétfunkciós (*E. coli*/*Streptomyces*) vektor (pCD262) alkalmazásával valósítottuk meg, amely *S. avermitilis*-ben a klónozási és génhelyettesítési kísérletekben egyaránt

hatékonyan működött. Amint a 7. ábrán látható, a *S. avermitilis* kromoszómában három szomszédos BamHI restrikciós fragmentet térképeztünk (balról jobbra: 2,3 kb; 1,4 kb; és 4,1 kb). Az 1,4 kb-os BamHI genomiális fragment az El-alfa nyitott leolvasási keret (ORF-1) (*bkdF* gén) elejét tartalmazza, míg a 4,1 kb-os BamHI fragment a *bkd* gén-cluster többi részét foglalja magában (*bkdF* vége; *bkdG* és *bkdH*).

A pCD768 plazmid a pCD262 ingázó vektor származéka, amely az 1,4 kb-os BamHI fragmentet szegélyező két *S. avermitilis* genomiális fragmentet (2,3 kb-os és 4,1 kb-os BamHI) tartalmaz (8. ábra). A pCD768 plazmid ezenkívül a 2,3 kb-os és 4,1 kb-os BamHI fragment között *ermE* markert is tartalmaz. Az *ermE* marker az ORF-1-gyel ellentétes orientációban található, ami kiküszöböli a downstream gének esetleges túlexpresszáldásából adódó bonyodalmakat. Ettől a konstrukciótól azt várjuk, hogy a gazda genomjában rekombináció hatására 1,4 kb-os deléciót okoz (amely az ORF-1-et érinti).

A pCD768 plazmidot *S. avermitilis* ATCC 31272 CS2 gazda protoplasztokba transzformáltuk. Két transzformánst választottunk ki, melyek az eritromicinre és a thiostreptonra egyaránt rezisztensek voltak (*erm-R*, ill. *tsr-R*) (ld. 9. példa). Az 1. transzformánst (CD768) folyékony tápközegben növesztettük, protoplasztot készítettünk, és a protoplasztokat eritromicint tartalmazó

agar táptalajra kentük. Ötven klónt szelektáltunk ki, és ezeket tovább vizsgáltuk: 46 erm-R, tsr-R; és 4 erm-R, tsr-S (pp15, pp17, pp22 és pp40) volt. Az utóbbi csoport négy klónját, illetve az első csoport két klónját (pp14 és pp21; ld. 9. példa, I. táblázat) tovább vizsgáltuk, s valamennyi *bkd*-deficiens fenotípust mutatott, a következők szerint; ILV minimál táptalajon mind a négy erm-R, tsr-S klón képtelen volt a növekedésre; a BCKDH komplex E1 komponensére tesztelve nem mutattak aktivitást; fermentációval nem voltak képesek természetes avermektineket szintetizálni (csak akkor termeltek természetes avermektineket, ha a tápközeget S-(+)-2-metil-vaajsavval vagy izovaajsavval egészítettük ki (ld. 9. példa). Ha a fermentációs tápközeghez CHC-t adtunk, új avermektinek (CHC avermektinek) szintetizálódtak, ami azt bizonyítja, hogy a *bkd* blokkolás nem befolyásolja az avermektin celluláris bioszintetikus gépezetét (ld. 9. példa). A négy klónból álló csoport egyik klónját (pp15) hivatalosan *S. avermitilis* CD794 törzsnek neveztük el, s a találmány bemutatási céljaira az American Culture Type Collection-nél helyeztük letétbe. Southern hibridizációs analízissel végül egyértelműen igazolódott, hogy a *bkdF* génnek megfelelő ORF-1 a *S. avermitilis* ATCC 31272 SC2 kromoszómában a génhelyettesítés hatására a várakozásoknak megfelelően darabolódott fel. (ld. 5. példa).

Az alábbiakban a *S. avermitilis* *bkdFGH* génjeinek azonosításához, klónozásához és vizsgálatához alkalmazott kísérleti eljárások példáit írjuk le, melyeket az ábrák

segítségével is illusztrálunk. Ezenkívül leírjuk két *bkd*-deficiens mutáns génhelyettesítéssel történő kialakítását is. A molekuláris biológia terén jártas szakemberek számára ismert standard technikák egyéb részleteit illetően ld. pl. Sambrook és mtsi., "Molecular Cloning"; Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

1. példa

S. avermitilis genomiális DNS előállítása

S. avermitilis ATCC 31272 SC2 (2. különálló telep-izolátum) micéliumot YDP-2 agar táptalajon, 29 °C hőmérsékleten hét napig konfluens rétegben növesztettünk. A tápközeg összetétele:

Difco élesztő kivonat:	10 g
Difco Bacto-pepton:	10 g
Dextróz:	5 g
Difco Bacto agar:	20 g
Nátrium-acetát:	2 g
MOPS:	10 g
pH:	7,0
Végtérfogat:	1 l

A tápközeget 121 °C-on 25 percig autoklávoztuk.

A micéliumot ezután 300 nl-es bedugaszolt lombikban 30 ml AS-7 tápközeg (ld. Hafner és mtsi., 88300353.5 számú európai szabadalmi bejelentés, 0 284176 számú közzétételi irat, 1988) beoltásához használtuk. A lombikot 29 °C-on 24 óra

hosszat kevertük (230 percenkénti fordulattal). A tápközeg összetétele:

Hígított keményítő ¹ :	20 g
Ardamin pH ² :	5 g
Pharmamedia ³ :	15 g
CaCO ₃ :	2 g
pH:	NaOH-dal 7,2-re
Végtérfogat:	1 l

A tápközeget 121 °C-on 25 percig autoklávoztuk.

(¹: a keményítőt a *Bacillus licheniformis*-ből származó "termamil" nevű alfa-amilázzal (Novo Enzymes, Wilton, CT) hidrolizáltuk, miáltal hozzávetőleg 40 %-os dextróz-ekvivalenst értünk el;

²: Yeast Products, Inc., Clifton, NJ 07012;

³: Traders Protein, Memphis, TN 38108.

A fenti tenyészet hozzávetőleg 0,3 ml-ét egy másik, 30 ml módosított folyékony Yeast Extract Malt Extract (YEME; élesztő kivonat, maláta kivonat; Bibb, M.J., Freeman, R.F. és D.A. Hopwood, Mol. Gen. Genetics, 154, 155-166, 1977) tápközeget tartalmazó, 300 ml-es, bedugaszolt lombik beoltásához alkalmaztuk. A módosított YEME tápközeg összetétele (egy liter térfogatra vonatkoztatva):

Difco élesztő kivonat:	3 g
Difco Bacto-pepton:	5 g
Oxoid maláta kivonat:	3 g
Szacharóz:	300 g
Glükóz:	10 g

A tápközeget 121 °C-on 40 percig autoklávoztuk, majd 2 ml 2,5 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -t adtunk hozzá, és a végtérfogatot 1 literre egészítettük ki.

A tenyészeteket 29 °C-on 48-72 óra hosszat növesztettük. A micéliumokat centrifugálással gyűjtöttük össze, és a genomiális DNS-t ismert eljárással készítettük (D.A. Hopwood és mtsi., "Isolation of *Streptomyces* Total DNA by Caesium Chlorid Gradient Centrifugation: Procedure 2", Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, Norwich, Egyesült Királyság, 1985). A DNS üledéket 3 ml TE pufferben (10 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 1 mM EDTA) újraszuszpendáltuk.

2. példa

A *S. avermitilis* genomiális DNS-ének polimeráz láncreakciós (PCR) amplifikálása

A *S. avermitilis* genomiális DNS-t Perkin-Elmer Cetus PCR készülék alkalmazásával enzimatikusan amplifikáltuk. A PCR reakciót Taq-polimeráz (Perkin-Elmer Cetus) és a gyártó által biztosított puffer felhasználásával, 200 μM dNTP, mindegyik primerből 0,5 μM , 50 ng templát DNS és 2,5 egység enzim jelenlétében, 100 μl végtérfogatban, 30 ciklussal végeztük. Az első ciklus lépései az alábbiak voltak: 95 °C-on 3 percig (denaturálás); 55 °C-on 2 percig (hibridizálás); és 72 °C-on 2 percig (extenzió). A további 29 ciklust hasonlóan végeztük, azzal a különbséggel, hogy a

denaturálási lépés időtartamát 1,5 percre csökkentettük. A DNS primereket a Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas) biztosította számunkra. A jobboldali primer (1/A ábra) bázisszekvenciája:

5'-AAGAATTCGAGCTCGGCGACGGCGCCACCTCCGAGGGCGAC-3' (9. sz. szekv.);

a baloldali primer (1/B ábra) szekvenciája:

5'-AAGGATCCTCTAGAGGTSSWGTGGKGGCCGATSCGGWA-3' (10. sz. szekv.).

A DNS-szekvenciák leírásához az International Union of Biochemistry (IUB) nukleotidokra vonatkozó nevezéktani szabályait alkalmaztuk. A redundanciákat az IUB Group Codes szerint használtuk: K = G+T; S = G+C; és W = A+T. Az 1. ábrán az E1-alfa *bkd* génekkel nem homológ restrikciós felismerési szekvenciákat, melyeket klónozási célokból a primerekbe építettünk, aláhúzással jelöltük. Az amplifikációs termékeket agaróz gélelektroforézissel méret szerint frakcionáltuk. A PCR mintát vízszintes, 1 %-os agaróz gélen 1 X TBE pufferben (90 mM Tris-HCl [pH = 8,5], 90 mM bórsav, 2,5 mM EDTA), 100 V feszültséggel 1,5 óra hosszat elektroforizáltuk (ld. Sambrook és mtsi., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2. kiadás, Cold Spring Harbor Lab, NY, 1989). Az elkülönített PCR DNS-termékeket etidium-bromidos festéssel, és a fluoreszcens sávok 365 nm-es UV fénnel végzett láthatóvá tételével lokalizáltuk a gélen. A fenti PCR feltételek és primerek alkalmazásával egyetlen (hozzávetőleg 550 bázispár hosszúságú) DNS-sávot

detektáltunk.

3. példa

0,55 kb hosszúságú, PCR-ral amplifikált *S. avermitilis* genomiális DNS-fragment klónozása *E. coli* vektorba, és azt követő transzformálása *E. coli* gazdasejtbe

A) A 0,55 kb-os PCR termék kinverése

Amint fentebb említettük, templátként *S. avermitilis* genomiális fragment alkalmazásával, illetve a jobboldali és baloldali primerek kombinációjának felhasználásával PCR-ral 0,55 kb-os DNS-fragmentet amplifikáltunk. Amint az 1. ábrán látható, a jobboldali primer 5'-végén elhelyezkedő EcoRI felismerési hellyel, a baloldali primer pedig szintén 5'-végén elhelyezkedő XbaI felismerési hellyel rendelkezik. A 0,55 kb-os PCR fragmentet olyan ligálási eljárással klónoztuk, melyben az inszertet és a klónozó vektort egyaránt EcoRI és XbaI enzimekkel emésztettük. Az amplifikáció után (ld. 2. példa) a PCR reakcióelegy kb. 80 mikroliterét 1 %-os agaróz gélre töltöttük, és elektroforézist végeztünk. A 0,55 kb-os DNS-fragmentet a fentebb leírtak szerint tettük láthatóvá, és elektroelúcióval nyertük ki. Eszerint, a 0,55 kb-os DNS-sávot borotvapengével kivágtuk, és a DNS-t 80 V feszültséggel 35 percig végzett elektroelúcióval 7,5 M ammónium-acetáttal töltött V-alakú üregbe gyűjtöttük össze, amihez egyenáramú elektroelúciós készüléket (International

Biotechnology Inc., New Haven, CT) alkalmaztunk. A DNS-t ezután etanollal kicsaptuk, leüleptítettük, és végül 20 μ l DNS pufferben (10 mM Tris-HCl, 4 mM NaCl, 0,1 mM EDTA; pH = 7,5) újra feloldottuk.

B) EcoRI és XbaI enzimekkel végzett restrikciós emésztés

A fentiek szerint kinyert PCR anyag teljes mennyiségét 1-1 egység EcoRI és XbaI restrikciós enzimmel egyszerre emésztettük (a gyártó útmutatásai szerint; Boehringer Mannheim Biochemicals). Hasonlóan, a pGEM-3Z plazmid (Promega Corp., Madison, WI) kb. 1 μ g-ját és az EcoRI és XbaI restrikciós enzim (Boehringer Mannheim Biochemicals) 2-2 egységét 37 °C-on, a gyártó által meghatározott vizsgálati pufferben 4 óra hosszat inkubáltuk (60 μ l össztérfogatban), hogy lineáris molekulákat kapjunk. Ezután a PCR fragmentet és a linearizált vektort külön-külön extraháltuk (kétszer azonos térfogatú fenol/kloroform eleggyel, kétszer azonos térfogatú éterrel), végül a DNS-eket kétszeres térfogatnyi abszolút etanol hozzáadásával kicsaptuk. A kicsapott DNS-eket 10 000 x g-vel 10 percig végzett centrifugálással gyűjtöttük össze és vákuum alatt szárítottuk. A PCR fragmentek üledékét 20 μ l DNS pufferben, a linearizált vektor üledékét pedig 12 μ l DNS pufferben oldottuk fel újra.

C) A pCD613 előállítása ligálással

Az EcoRI/XbaI enzimekkel kezelt 0,55 kb-os PCR DNS-fragment kb. 11 μ l-ét, és az EcoRI/XbaI enzimekkel linearizált pGEM-3Z plazmid kb. 1 μ l-ét 20 μ l reakciótérfogatban, 1 egység ligázzal (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA), a forgalmazó által meghatározott feltételek mellett, 15 °C-on egy éjszakán keresztül inkubáltuk. A reakció leállításához a mikrocsővet jégre tettük, majd a reakcióelegyet (20 μ l) Sambrook és mtsi. által leírt standard eljárással ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2. kiadás, Cold Spring Harbor Lab, NY, 1989) kompetens *E. coli* DH5-alfa sejtek transzformálásához alkalmaztuk. Sok ampicillin-rezisztens transzformánst kaptunk. A pGEM-3Z plazmidvektor tartalmaz egy, az *Escherichia coli lac* operonjából származó DNS-szegmentet, amely a béta-galaktozidáz N-terminális fragmentjét kódolja (Yanisch-Perron, C., Vieira, J. és J. Messing, Gene, 33, 103, 1985). Ez a fragment — melynek szintézise izopropil-tio- β -D-galaktozidázzal (IPTG) indukálható — a gazda által kódolt β -galaktozidáz hibás formájával intra-allélikus (alfa) kiegészítésre képes. Az IPTG-vel indukált *E. coli* sejtek az enzim mindkét fragmentjét szintetizálják, és a kromogén 5-bróm-4-klór-3-indolil- β -D-galaktozidáz (X-gal) szubsztrátot tartalmazó táptalajra kenve kék telepeket alkotnak. Az idegen DNS a plazmid poliklónozó helyére inszertálva inaktiválja a β -galaktozidáz N-terminális fragmentjét, és megszünteti az alfa kiegészítést. Ilyenformán, a rekombináns plazmidokat

hordozó baktériumok fehér telepeket hoznak létre. Ezzel a transzformációs kísérlettel számos fehér telepet kaptunk, melyek minden bizonnyal tartalmazzák a pCD613 plazmidot. Ennek igazolása érdekében kiválasztottunk egy telepet, melyet CD613 törzsnek neveztünk el, és további vizsgálatokat végeztünk. A CD613 *E. coli* törzs egy telepét standard mikrobiológiai módszerrel 50 µg/ml ampicillint tartalmazó folyékony Luria-Bertani (LB) tápközegbe oltottuk. Az LB tápközeg összetétele:

Bacto-tripton	10 g
Bacto-élesztő kivonat	5 g
NaCl	10 g
pH	5 N NaOH-oldattal 7,0-ra
Végtérfogat	1 l-re kiegészítve

A tápközeget 121 °C-on 20 perces autoklávozással sterilizáltuk.

A tenyészetet 35 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk. A következő reggelen a baktériumsejteket 4 °C-on, 10 000 percenkénti fordulattal 5 percig végzett centrifugálással gyűjtöttük be. A frissen betakarított *E. coli* CD613 sejtekből Birnboim és Doly eljárásának (Nucleic Acid Res., 7, 1513-1523, 1979) módosításával (ld. Denoya és mtsi., Microbios Lett., 29, 87-93, 1985) plazmidvektort izoláltunk. Az izolált plazmid DNS-t végül DNS pufferben (10 mM Tris-HCl, 4 mM NaCl, 0,1 mM EDTA; pH = 7,5) oldottuk, miáltal hozzávetőleg 1 µg pCD613/10 µl puffer koncentrációt értünk el. Az EcoRI és XbaI alkalmazásával végzett igazoló

restrikciós analízis azt mutatta, hogy a pCD613 plazmid — a várákozásnak megfelelően — tartalmazta a 0,55 kb-os DNS-inszertet.

4. példa

Egységesen radioaktív izotóppal jelölt kétszálú DNS próbák előállítás

Nick transzláció alkalmazásával (a technika általános leírását ld. Sambrook és mtsi., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2. kiadás, Cold Spring Harbor Lab, NY, 1989) kétszálú DNS próbákat állítottunk elő. Először megfelelő restrikciós emésztéssel és az 1. példában leírt elektroelúciós tisztítással a célszekvenciát hordozó, specifikus DNS-fragmentet készítettünk. Mindegyik esetben hozzávetőleg 1 ug DNS-t jelöltünk; a jelöléshez [alfa- ^{32}P]dCTP-t ([alfa- ^{32}P]-dezoxi-citidin-5'-trifoszfát, tetra(trietil-ammónium) só (NEN-Dupont) és BRL Nick Translation System-et (BRL Life Technologies, Inc.) alkalmaztunk, és a gyártó útmutatásait követtük. A reakciót rendszerint 50 ul térfogatban végeztük. 5 ul Stop puffer (leírását ld. a BRL által javasolt eljárásban) hozzáadása után a jelölt DNS-t Stratagene push oszlop alkalmazásával a gyártó útmutatásai szerint) elválasztottuk a be nem épült nukleotidoktól. Ezzel az eljárással ^{32}P -izotóppal jelölt DNS-t kaptunk, melynek specifikus aktivitása jóval 10^8 cpm/ug érték felett volt.

5. példa

S. avermitilis genomiális DNS analízise Southern
hibridizációval

A tisztított *S. avermitilis* genomiális DNS kb. 10 μ g-ját 37 °C-on legalább két órán keresztül 2 egység BamHI restrikciós enzimmel emésztettük. Az emésztés végén a DNS-fragmenteket 1 %-os agaróz gélen végzett elektroforézissel (ld. 1/A példa) elválasztottuk, és egy éjszakán át nylon membránra másoltuk (pórusméret: 0,45 μ m) (Schleicher és Schuell Nytran membrán), amihez a kapilláris átviteli módszer (Southern, E.M., J. Mol. Biol., 98, 503, 1975) alkalmaztuk. A következő napon a nylon membránokat műanyag burkolatba csomagoltuk, és a membránok DNS-t tartalmazó oldalát UV fénnel sugároztuk be (302 nm), hogy a DNS-t a membránhoz rögzítsük. A nylon membránokon rögzített, radioaktívan jelölt RNS vagy DNS próbák hibridizációját Sambrook és mtsi. által leírt eljárással ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2. kiadás, Cold Spring Harbor Lab, NY, 1989; a továbbiakban "Sambrook és mtsi. kézikönyve") végeztük. Az előhibridizációt és a hibridizációt 42 °C-on végeztük. A hibridizációs oldat összetétele: 6 x SSC (1 x: 0,15 M NaCl, 15 mM nátrium-citrát; pH = 7,0); 10 x Denhardt-reagens (1 x: 0,02 % ficoll, 0,02 % polivinil-pirrolidon, 0,02 % szarvasmarha szérumalbumin); 1 % SDS (nátrium-dodecilszulfát); 100 μ g/ml denaturált, fragmentált lazac-sperma DNS; 100 μ g/ml *E. coli* tRNS; és 50 %-os formamid (Fluka). Egy éjszakán át végzett hibridizáció után a membránokat 1 x

SSC és 0,1 % SDS elegyével, szobahőmérsékleten kétszer 15 percig, majd 0,1 x SSC és 0,1 % SDS elegyével, 45 °C-on kétszer 15 percig mostuk. Néhány kísérletben a hibridizációt 65 °C-on, formamid hiányában végeztük, és SSC helyett SSPE-t (1x: 0,18 M NaCl, 10 mM NaPO₄ [pH = 7,7], 1 mM EDTA) alkalmaztunk. Végül a membránokat autoradiográfiás megjelenítés érdekében röntgenfilmre exponáltuk.

6. példa

DNS-szekvenálás

A) A pCD613 plazmidban lévő kétszálú DNS PCR termék szekvenálása

A 2. példában leírtak szerint supercoil szerkezetű pCD613 plazmidot állítottunk elő. A kétszálú pCD613 kb. 4 ug-ját a szekvenálás előtt egyszálúvá alakítottuk., amihez a Taq Track Sequencing Systems Technical kézikönyvben (Promega Co., Madison, WI) leírt lúgos denaturálást alkalmaztuk. Az oligonukleotid szekvenáló primereket a Genosys Biotechnologies, Inc. (Texas) szintetizálta. Az 1. primer (5'-AAGGATCCTGCAGCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGA-3') (11. sz. szekv.) a pGEM-3Z többszörös klónozó helyén (multiple cloning site; MCS) (2689-2712. nukleotidok) lévő EcoRI helytől upstream irányban helyezkedik el, míg a 2. primer (5'-AAGGATCCTGCAGACAGCTATGACCATGATTACGCCA-3') (12. sz. szekv.) az MCS (91-114. nukleotidok) HindIII helyétől downstream irányban található.

B) A pCD613-eredetű 0,35 kb-os SalI *S. avermitilis* genomialis fragment M13 bakteriofágba történő klónozása és DNS-szekvenálása

Amint korábban említettük, restrikciós analízissel kimutattuk, hogy a PCR reakcióból származó CD613 genomialis fragment tartalmaz egy belső 0,35 kb-os SalI fragmentet. Ezt a 0,35 kb-os SalI *S. avermitilis* DNS-fragmentet M13mp18 bakteriofágokba klónoztuk, hogy a Sanger-féle didezoxi szekvenálási eljárásban (Sanger és mtsi., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463-5467, 1977) alkalmazható, egyszálú, rekombináns DNS-t állítsunk elő. Az előzőekben leírt minipreparatív eljárással előállított pCD613 plazmid kb. 2 ug-ját 37 °C-on két óra hosszat SalI enzimmal emésztettük, hogy felszabadítsuk a 0,35 kb-os *S. avermitilis* genomialis fragmentet. Az emésztő elegyet 1,2 %-os agaróz gélen elektroforizáltuk, és a 0,35 kb-os fragmentet a fentebb leírtak szerint elektroelúcióval kivontuk, majd kicsaptuk. Az M13mp18 DNS tisztított, kétszálú replikatív formájának (RF) kb. 1 ug-ját SalI-gyel emésztettük, a Promega Corp.-tól [Madison, WI] vásárolt borjúból alkalikus foszfatázzal (CIAP) defoszforiláltuk, végül a korábban leírtak szerint a 0,35 kb-os DNS-fragmenthez ligáltuk. A tisztított RF M13 klónozó vektort a New England Biolabs-tól vásároltuk. A kompetens *E. coli* JM109 sejtek transzfektálásához ligáló elegyeket alkalmaztunk. Több fehér plakkot kaptunk. Az inszertet ellenkező orientációban tartalmazó mp18 transzfekcióból két különálló fehér plakkot választottunk

ki, fágot növesztettünk, és egyszálú DNS-t készítettünk (ld. Sambrook és mtsi. kézikönyvét). Az egyes egyszálú DNS-templátok szekvenálását az M13-specifikus -40 szekvenáló primer (New England Biolabs, katalógusszám: 1212), dezoxi-adenozin-5'-[alfa-tio]-trifoszfát, [³⁵S] (NEN-Dupont), és a TaqTrack szekvenáló készlet (Promega) alkalmazásával, a forgalmazó (Promega) útmutatásai szerint végeztük.

C) A *bkdF* gén egy részét tartalmazó, 4,1 kb-os, klónozott BamHI fragmenten elhelyezkedő néhány genomialis régió transzpozonnal segített szekvenálása

A *S. avermitilis* 4,1 kb-os klónozott genomialis fragmentjében lévő *bkdF* nyitott leolvasási kerettől downstream irányban elhelyezkedő DNS-régiók szekvenálásához mini-gamma-delta-1 transzpozon inszerciókat alkalmaztunk. A mini-gamma-delta-1 elem egy kisméretű (1,8 kb) gamma-delta (Tn1000) származék, amely a TN5-ből származó *kan* gént, és az egyik gamma-delta vég két 40 bp-os fordított ismétlődése közé klónozott, gamma-deltából származó *res* (resolution) helyet tartalmazza. (Berg, C.M. és mtsi., *Gene*, **113**, 9-16, 1992). A mini-gamma-delta-1-ből hiányoznak a transzpozázt és reszolvázt kódoló gének, így a gazdától függ, hogy ellátja-e a transzpozáz és reszolváz funkciókat. Ennek megfelelően, a helper transzpozonnal nem rendelkező törzsekben a mini-gamma-delta-1 nem változtat helyet (nincs transzpozíció), és az inszerció stabil lesz. A fordított ismétlődésű végeken belül olyan egyedi szekvenciák

találhatók, amelyek a DNS-szekvenáláshoz primerkötő helyként alkalmazhatók. A transzpozon inszerciókat lényegében Berg, C.M. és mtsi. leírása (Methods in Enzymology, Academic Press, 218, 279-306, 1993) szerint hoztuk létre. Valamennyi inszertált transzpozont az inszerció két helyén elhelyezkedő *Streptomyces* DNS szekvenálásához, kiindulási templátként alkalmaztuk. Két "univerzális" primert használtunk, a "res" primert (5'-GTAGGGAGCCTGATATG-3') (13. sz. szekv.) és a "kan" primert (5'-GCTATCCGCGCATCCAT-3') (14. sz. szekv.). A *bkdF* ORF-et tartalmazó BamHI végtől hozzávetőleg 1,7 kb, illetve 3 kb távolságban két mini-gamma-delta-1 inszerciót lokalizáltunk; az "A3"-at (CD785 klón), illetve az "A5"-öt (CD786 klón). Az egyes inszerciók mindkét végén elvégzett DNS-szekvenálással kimutattuk, hogy az A3 inszerció (CD785 szekvencia) az E1-béta ORF (*bkdG*) (5. ábra) végének közelében, az A5 inszerció (CD786 szekvencia) pedig az E2 ORF (*bkdH*) (6. ábra) végének közelében helyezkedik el.

7. példa

A teljes *S. avermitilis bkd* gén-cluster klónozása;

kromoszómális térkép készítése

A tisztított pCD613 DNS kb. 4 ug-ját Sali restrikciós enzimmal emésztettük, és a DNS-fragmenteket 1,2 %-os agaróz gélene elektroforézissel választottuk el. Elektroelúcióval egy hozzávetőleg 0,35 kb-os Sali DNS-fragmentet nyertünk ki, amely a *S. avermitilis bkdF* E1-alfa génre specifikus szekvenciát hordoz, majd a fentebb leírt nick transzlációval

jelöltük. A ^{32}P -izotóppal jelölt DNS-fragmentet *S. avermitilis* genomiális kozmid könyvtár screeneléséhez alkalmaztuk próbaként. A genomiális könyvtárak kialakításának általános leírását ld. Sambrook és mtsi. kézikönyvében. A *Streptomyces* kromoszómális könyvtár készítésének komplett leírását ld. Hopwood és mtsi., Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual, 1985). A kozmid vektorok leírása megtalálható: Denoya, C.D., 1993. április 16. benyújtott, 048,719 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés.

A rekombináns könyvtár több, mint 2200 klónjának screenelése után tíz klónt azonosítottunk. A tíz hibridizáló klónt (melyeket CD519, CD521, CD691, CD692, CD694, CD695, CD696, CD697, CD698 és CD699 *E. coli* klónként regisztráltunk) folyékony LB tápközegben növesztettük, majd minden egyes tenyészetből (a fentebb leírtak szerint) plazmidot készítettünk. A restrikciós és Southern blot hibridizációs analízisek kimutatták, hogy a tíz klón egymással rokon volt, és átfedő kromoszómális régiókkal rendelkeztek. Érdekes, hogy a felsorolt kozmid klónok közül kettő, nevezetesen a CD519 és a CD521, benne volt a *bkdA* próba alkalmazásával azonosított kozmid klónok listájában is (ld. C.D. Denoya, 08/100,518 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés). Standard eljárások alkalmazásával egy *S. avermitilis* genomiális restrikciós térképet kaptunk, amely lefedi a teljes kromoszómális régiót, beleértve a CD613 szekvenciát (ld. 2. ábra). A 2. ábrán bemutatjuk a

találmányunkban leírt új *bkd* gének és a korábban leírt (C.D. Denoya, 08/100,518 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés) *bkd* gének közötti kapcsolatot. A két *bkd* gén-cluster egymástól hozzávetőleg 12 kb távolságban helyezkedik el.

8. példa

Streptomyces lividans transzformálása ingázó (shuttle) vektorokkal; plazmid vektorok nagy mennyiségben történő előállítása *S. lividans* transzformánsokból

Ezekben a kísérletekben a TK64 *S. lividans* törzset alkalmaztuk. A *S. lividans* növesztéséhez és protoplaszt-képzéséhez való tápközeg, illetve a protoplasztok kialakításához és a transzformációhoz alkalmazott eljárás leírását ld. D.A. Hopwood és mtsi., Genetic Manipulation of *Streptomyces* - A laboratory manual (The John Innes Foundation, Norwich, Egyesült Királyság, 1985). Az említett forrásban a TK64 *S. lividans* törzs teljes leírása is megtalálható. A pCD262 ingázó vektorral vagy más származékokkal közvetlenül transzormált *S. lividans* protoplasztokat thiostrepton-rezisztenciára szelektáltuk. A szelektált transzformánsokból az alábbiak szerint plazmid DNS-t készítettünk. A tenyészeteket folyékony YEME tápközegben növesztettük (Bibb, M.J., Freeman, R.F. és D.A. Hopwood, Mol. Gen. Genetics, 154, 155-166, 1977). A YEME tápközeg összetétele (1 literre): 3 g élesztő kivonat; 5 g bacto-pepton; 3 g maláta kivonat; 340 g szacharóz.

Autoklávozás után a tápközeghez 2 ml 2,5 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -t adtunk, és a tenyészeteket 40-48 óra hosszat 30 °C-on növesztettük. A *Streptomyces* sejtek 500 ml-nyi tenyészetéből centrifugálással összegyűjtöttük a micéliumokat, és 50 ml végtérfigatban lizozim-oldattal (2 mg/ml lizozin 0,3 M szacharóz, 0,025 M Tris-HCl (pH = 8,0) és 0,025 M EDTA elegyében) újrasszuszpendáltuk. E lépés után, lényegében a "Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual" című kézikönyvben (The John Innes Foundation, Norwich, 1985) leírtak szerint végzett lúgos lízist követően plazmidokat állítottunk elő. A DNS üledéket 10 mM Tris-HCl (pH = 8,0) és 1 mM EDTA 500 ml-nyi elegyében újraoldottuk, és lényegében Sambrook és mtsi. kézikönyvében leírtak szerint cézium-klorid/etidium-bromid gradiens ultracentrifugálással tovább tisztítottuk. Az izolált plazmid DNS-t végül DNS pufferben (10 mM Tris-HCl, 4 mM NaCl, 0,1 mM EDTA; pH = 7,5) oldottuk, hozzávetőleg 1 ug plazmid/10 ul puffer koncentrációban.

9. példa

S. avermitilis bkdF mutáns kialakítása

A kromoszómális deléció bejuttatásához a *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* és *Bacillus subtilis* esetében alkalmazott génhelyettesítési eljárások (Scherer, S. és R.W. Davis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4951-4955, 1979; Shortle, D. és mtsi., Science, 217, 371-373, 1982; Stahl, M.L. és Ferrari, E., J. Bacteriol., 158, 411-418, 1984) változatát alkalmaztuk. E technika (specifikusan

Streptomyces-re adaptált) általános leírását ld. Kieser, T. és Hopwood, D.A., "Genteic Manipulation of *Streptomyces*: Integrating Vectors and Gene Replacement" (Methods in Enzymology, 204, 430-458, 1991). E technika részletes leírása, amely magában foglalja a különálló telepizolátumok biztosításához és a plazmid elimináció gyakoriságának növeléséhez szükséges protoplaszt-képző lépés leírását is, megtalálható: Anzei és mtsi., "Replacement of *Streptomyces hygroscopicus* genomic segments with *in vitro* altered DNA sequences", The Journal of Antibiotics, XLI (2), 226-233, 1988). A protoplaszt-képzés és a regenerációs lépés gyakran stimulálja a plazmid vesztést. A legtöbb kétfunkciós (*E. coli*/*Streptomyces*) vektor (mint pl. az általunk használt pCD262) — egy vagy két nem szelektív növesztési ciklus után — esetenként plazmidmentes sejtek kialakulását eredményezi (Kieser, T. és Hopwood, D.A., Methods in Enzymology, 204, 430-458, 1991).

A) A *bkdF* gén inaktivált kópiáját hordozó ingázó vektor kialakítása

Amint a 7. ábrán látható, az általunk tárgyalt *bkd* gén-clustert tartalmazó *S. avermitilis* kromoszóma régióban három szomszédos BamHI restrikciós fragmentet térképeztünk, melyek hosszúsága (balról jobbra) 2,3 kb, 1,4 kb, illetve 4,1 kb. Az 1,4 kb-os BamHI genomialis fragment az E1-alfa nyitott leolvasási keret (ORF) (*bkdF*) elejét hordozza. A 4,1 kb-os BamHI fragment a *bkd* gén-cluster többi részét (*bkdF*

vége; *bkdG* és *bkdH*) tartalmazza. E három restrikciós fragmentet pGEM-3Z *E. coli* vektorba szubklónoztuk, miáltal a 2,3 kb-os BamHI fragmentet hordozó pCD740 plazmidot; az 1,4 kb-os BamHI fragmentet hordozó pCD854 plazmidot, és a 4,1 kb-os BamHI fragmentet hordozó pCD713 plazmidot kaptuk (ld. 2. ábra). A *bkdF* gén inaktivált példányát hordozó vektort két lépésben hoztuk létre. Először a 4,1 kb-os BamHI *S. avermitilis* fragmentet, és az (eritromicinnel szemben rezisztenciát biztosító) *ermE* markert hordozó 1,6 kb-os BglII fragmentet a pCD262 ingázó vektorba (C.D. Denoyya, "Novel Bacterial Plasmid Shuttle Vectors for *Streptomyces* sp. and *Escherichia coli*", 032,925 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, 1993. március 18.) klónoztuk. Eszerint, a pCD713 plazmid kb. 1,5 μ g-ját BamHI restrikciós enzimmel emésztettük, és az emésztményt 0,8 %-os agaróz gélen elektroforizáltuk. Ezután a 4,1 kb-os BamHI fragmentet GeneCleanII készlet és a gyártó (Bio 101 Inc., La Jolla, CA) által ajánlott eljárások alkalmazásával kinyertük a gélből. Hasonlóan, kb. 2 μ g pIJ4026 plazmidot BglII-vel emésztettünk, és 0,8 %-os agaróz gélen elektroforézist végeztünk. A pIJ4026 plazmid a *Saccharopolyspora erythraea* (korábban *Streptomyces erythraeus*) *ermE* génjét hordozó pUC18 *E. coli* klónozó vektor származéka (ld. M. Bibb és mtsi., *Gene*, **41**, 357-368, 1985; és D.A. Hopwood és mtsi., "Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual", The John Innes Foundation, Norwich, Egyesült Királyság, 1985). Elektroforézis után az 1,6 kb-os BglII fragmentet GeneCleanII készlet és a gyártó (Bio 101 Inc., La Jolla, CA)

által ajánlott eljárások alkalmazásával kinyertük a gélből. A tisztított pCD262 plazmid egy alikvotját BglII-vel linearizáltuk, borjúból alkalikus foszfatázzal (CIAP) (Promega Corp. Madison, WI) defoszforiláltuk, végül a fentebb említett, tisztított, 4,1 kb-os BamHI fragmenthez és 1,6 kb-os BglII fragmenthez ligáltuk. A ligálási reakciót a mikrocső jégre helyezésével állítottuk le, majd a reakcióelegyet (20 μ l) standard eljárás szerint (ld. 1. példa) kompetens *E. coli* DH5-alfa sejtek transzformálásához alkalmaztuk. A transzformáció eredményeként sok ampicillin-rezisztens telepet kaptunk. Ezeknek a telepeknek a pCD761 plazmidot kell tartalmazniuk. Ennek igazolása érdekében kiválasztottunk egy telepet (melyet CD761 törzsnek neveztünk el), és az ebből a törzsből kinyert rekombináns plazmidot több restriktációs enzimmel tovább vizsgáltuk. A pCD761 plazmid a pCD161 ingázó vektor származéka, amely a 7. ábrán látható orientációban a 4,1 kb-os *S. avermitilis* BamHI genomiális fragmentet, és az *ermE* markert tartalmazó, 1,6 kb-os BglII DNS-fragmentet hordozza. Ezután a pCD761 plazmidot BglII-vel linearizáltuk CIAP-vel linearizáltuk, és a pCD740 plazmidból izolált 2,3 kb-os BamHI *S. avermitilis* fragmenthez ligáltuk. A mikrocsővet jégre helyezve leállítottuk a ligálási reakciót, és a reakcióelegyet (20 μ l) standard eljárás szerint (ld. 1. példa) kompetens *E. coli* DH5-alfa sejtek transzformálásához alkalmaztuk. A transzformáció eredményeként sok ampicillin-rezisztens telepet kaptunk. Ezeknek a telepeknek a pCD768 plazmidot tartalmazniuk. Ennek igazolása érdekében kiválasztottunk egy

telepet (melyet CD768 törzsnek neveztünk el), és az ebből a törzsből kinyert rekombináns plazmidot több restrikciós enzimmel tovább vizsgáltuk. A pCD768 plazmid a pCD161 ingázó vektor származéka, amely két *S. avermitilis* (2,3 kb-os és 4,1 kb-os BamHI) genomiális fragmentet hordoz, mely fragmentek a vad típusú kromoszómán az 1,4 kb-os BamHI fragment két oldalán helyezkednek el. A pCD768 a 2,3 kb-os és 4,1 kb-os BamHI fragmentek között tartalmaz egy *ermE* markert is. Az *ermE* marker az ORF-1-gyel (*bkdF*) ellenkező orientációban fekszik, hogy kiküszöböljük a downstream génnek esetleges túlexpressziója által okozott problémákat. Ez a konstrukció a gazda genomban, rekombináció hatására, 1,4 kb-os deléciót eredményez, amely a *bkd F* gén 5'-végét érinti.

B) A *Streptomyces avermitilis* transzformálása ingázó vektorokkal

A *S. avermitilis* protoplasztok transzformálásához alkalmazott ingázó vektorokat (pCD262, pCD768) transzformált DH5-alfa vagy CD167 *E. coli* sejtekből (a CD167 törzs az *E. coli* GM2163-ből származó, különálló telep izolátum, melyet Dr. B.J. Bachmann kurátortól [*E. coli* Genetic Stock Center, Yale University] kaptunk; ld. 1. példa); illetve transzformált TK64 *S. lividans* sejtekből (ld. 8. példa) állítottuk elő.

A kísérletekhez az ATCC 31272 *S. avermitilis* törzs 2.

különálló telepizolátumát (SC2; single clolony isolate #2) használtuk. A *S. avermitilis* protoplasztok előállításához három lehetséges oltóanyagot használtunk: (1) spórákat (melyeket Hopwood és mtsi. leírása ["Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual", The John Innes Foundation, Norwich, Egyesült Királyság, 1985] szerint állítottunk elő); (2) fagyasztott, hangkezelt micéliumokat (előállításukat ld. alább); és (3) YPD-2 agaron nevelt telepeket (ld. 1. példa). A fagyasztott, hangkezelt micéliumok előállításához micélium tenyészeteket Trypticase Soy Broth (TSB) táplevesben 600 nm-nél 2-9-es mértékű zavarosság eléréséig növesztettünk, majd üveg szövetőrlőben tízszer homogenizáltuk. A homogenizált micéliumokat TSB-ben kétszeres térfogatra hígítottuk, és steril polipropilén centrifugáló csőbe 20 ml-t adagoltunk. A folyadékba 1-2 cm mélyen ultrahang próbát (Bronwill Biosonik III) merítettünk, és a mintát 10 másodpercig 50 %-os intenzitással (a maximális watt-teljesítmény felével) hangkezeltük, melynek eredményeként a micéliumos massa egy-két sejtből álló egységekre diszpergálódott, melyek tovább tenyésztve gyors exponenciális növekedést mutattak. A hangkezelt micélium-készítményeket 40 % végkoncentrációban glicerinnel hígítottuk, fiolákba pipettáztuk, majd -85 °C-ra fagyasztottuk. A spórákat, micéliumokat vagy homogenizált telepeket 0,5 % glicint tartalmazó YEME tápközegbe oltottuk (ld. 1. példa). A *S. avermitilis* protoplasztok előállítását és a transzformációt Hopwood és mtsi. leírása ("Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual", The John

Innes Foundation, Norwich, Egyesült Királyság, 1985) szerint, MacNeil, D.J. és Klapko, L.M. módosításainak (J. Industrial Microbiol., 2, 209-218, 1987) felhasználásával végeztük. A pCD262 ingázó vektorral, illetve annak származékával (pCD768) transzformált *S. avermitilis* protoplasztokat thiostrepton-, illetve eritromicin-rezisztenciára szelektáltuk.

C) Eritromicin-rezisztens, thiostrepton-szenzitív *S. avermitilis* mutáns izolálása pCD768 plazmid alkalmazásával

A pCD768 plazmidot a fentebb leírtak szerint *S. avermitilis* 31272 SC2 protoplasztokba transzformáltuk. A *S. avermitilis* primer transzformánsait 4 ug/ml eritromicint tartalmazó regenerációs táptalajon (RM14) szelektáltuk (a tápközeg összetételét leíró hivatkozást ld. fentebb). Két eritromicin-rezisztens (erm-R) transzformánst (No. 1 és 2). 4 ug/ml eritromicint vagy 4 ug/ml thiostreptont tartalmazó YPD-2 agarlemezekre helyeztünk (ld. 1. példa). Mindkét transzformáns rezisztens volt mindkét antibiotikumra (erm-R, tsr-R). Az 1. transzformánst (*S. avermitilis* CD783 törzs) választottuk ki a további munkához. Ezt a törzset folyékony YEME tápközegben növesztettük, protoplasztokat képeztünk, és ezeket 4 ug/ml eritromicint tartalmazó regenerációs táptalaj lapokra kentük. Ezt a protoplaszt regenerációs lépést azért végeztük, hogy biztosítsuk a különálló telepek izolálását, és hogy fokozzuk a plazmid vesztést (Anzai, H. és mtsi., "Replacement of *Streptomyces hygroscopicus* genomic segments

with *in vitro* altered DNA sequences", The Journal of Antibiotics, XLI (2), 226-233, 1988). Számos telepet regeneráltunk, és ötven klónt eritromicint és thiostreptont tartalmazó lemezekre helyeztünk. Az ötven klón közül 46 volt képes a thiostreptont tartalmazó táptalajon növekedni. Ez a 46 telep erm-R, tsr-R volt, s csak 4 telep volt erm-R, tsr-S. Ez utóbbi telepek azt a fenotípust képviselik, amely az integráció bekövetkezése (kettős crossover események) és a szabad replikon elveszése után várható. Ennek megfelelően, az erm-R, tsr-S fenotípust képviselő négy klónt (pp15, pp17, pp22 és pp40) két erm-R, tsr-R fenotípusú klónnal együtt (pp14 és pp21) (melyeket kontrollként használtunk) tovább analizáltuk.

D) *S. avermitilis* bkdF mutáns: a bkdF gén 5'-végét érintő kromoszomális deléciót hordozó *S. avermitilis* fenotípusa

A alábbi vizsgálatokat végeztük: (1) a mutáns egyedüli szénforrásként izoleucint, leucint és valint tartalmazó agaros minimál táptalajon (ILV) mutatott növekedési képességének vizsgálata; (2) az elágazó láncú alfa-ketosav dehidrogenáz (BCKDH) E1 aktivitás vizsgálata; (3) fermentáció során természetes és új avermektinek termelésének vizsgálata.

(1) ILV csészék

A kísérlethez a klasszikus M9 minimál tápközeg (Anderson,

E.H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 32, 120-128, 1946) változatát alkalmaztuk. A módosított M9 tápközeg összetétele (1 literre):

Agaróz (SeaKem ME, FMC BioProducts, Rockland, ME)	7,5 g
Desztillált víz	650 ml

Az agaróz-oldatot 121 °C-on 15 percig autoklávoztuk, majd lehűtés közben az alábbi steril oldatokat adtuk hozzá:

25 x M9 sóoldat	40 ml
Ásványi anyag törzsoldat	2,1 ml
0,1 M $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 ml
ILV elegy	250 ml
pH	7,0-ra állítva
Végtérfogat	1 liter

Egy csészébe hozzávetőleg 25 ml-t töltöttünk.

A 25 x M9 sóoldatot úgy készítettük, hogy az alábbi sókat ionmentesített vízben, 1,2 liter végtérfogatban oldottuk:

K_2HPO_4	125 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	55 g
NaNO_3	48 g
pH	7,0-ra állítva

A sóoldatot 160 ml-es alikvotokra osztottuk, és 121 °C-on 15 perces autoklávozással sterilizáltuk.

Az ásványi anyag törzsoldat összetétele:

1M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1M CaCl_2

0,25 M $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Az oldatot 121 °C-on 15 percig autoklávoztuk.

Az ILV elegy előállításához 10-10 g L-izoleucint, L-leucint és L-valint 1 l ionmentesített vízben oldottunk. Az oldatot szűrővel sterilizáltuk.

A csészékben a *bkd*-deficiens mutánsok képtelenek voltak a növekedésre. Az ILV-t nem felhasználó mutánsokat 29 °C-on 14 napos inkubálás után értékeltük.

(2) BCKDH E1 vizsgálat

A BCKDH E1 aktivitást a korábban leírt radiokémiai vizsgálat (Hafner, E.W. és mtsi., J. Antibiotics, 44, 349-356, 1991) módosított változatának alkalmazásával határoztuk meg. A kiválasztott izolátumokat 29 °C-on 6-7 napig YPD-2 agaros táptalajon növesztettük. A növesztés után mindegyik, az YPD-2 táptalajon növekedést mutatott telepről, steril fogpiszkálósval egy gombostűfejnyi sejtcsoportot vettünk le, s a sejtcsoportokat 15 ml-es szcintillációs fiola aljára helyeztük. A sejteket 100 μl toluol/alfa-[1- ^{14}C]-keto-izokaproát elegy hozzáadásával (elkészítését ld. később) újraszuszpendáltuk és permeabilissá tettük. A fiola száját előzetesen Solvable-lel (szövet- és gélszolubilizáló; NEN-Dupont) impregnált

Whatman 4CHR papírral (Whatman katalógusszám: 3004614) azonnal lezártuk, majd szilárdan egy műanyag tetőt helyeztünk a fiolára, és a tetőt és a fiola felső részét parafilmbe csomagoltuk, végül 29 °C-on 3,5 órán keresztül, óvatos rázatás közben inkubáltuk. Az inkubálás befejezésekor a szűrőpapírt — a radioaktivitás meghatározása érdekében — 4 ml "Ready Safe folyadékszintillációs elegyet (Beckman) tartalmazó 7 ml-es üvegfiolába helyeztük. A radioaktivitást a fenti oldatban 4 órás vagy hosszabb ekvilibrálás után mértük. A toluol/alfa-[1-¹⁴C]-keto-izokaproát elegy előállításához 5 % toluolt tartalmazó 1 ml M9 sós tápközeghez (Davis, R.W. és mtsi., 1. függelék: "Media, drug concentrations, and nutritional supplements", in: A Manual for Genetic Engineering — Advanced Bacterial Genetics, 203. old., Cold Spring Harbor Laboratory, NY) (melyet a toluol tejszerű, fehér szuszpenziójának előállítása érdekében előzetesen hangkezeltünk) 22 μ l alfa-[1-¹⁴C]-keto-izokaproát törzsoldatot adtunk. Az alfa-[1-¹⁴C]-keto-izokaproát törzsoldat előállításához 2,8 μ l 20 mM alfa-keto-izokaproátot (nátrium-só; Sigma K0629), 50 μ l alfa-[1-¹⁴C]-keto-izokaproátot (55 mCi/mmól; 50 μ Ci/ml; Amersham), és 1 ml végtérfogathoz elegendő vizet kevertünk össze. A protein-koncentrációt a Bio-Rad protein vizsgálat alkalmazásával határoztuk meg (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California), amely a Bradford-féle festék-kötési eljárásan alapul (Bradford, M., Anal. Biochem., 72, 248, 1976). Az elágazó láncú alfa-ketosav dehidrogenáz E1 komponensének specifikus aktivitását a protein egy

milligrammjából egy perc alatt felszabadult CO₂ pikomóljaiként fejezzük ki (I. táblázat).

(3) Avermektin-termelés

Friss, módosított YPD-2 agaros táptalajon (a módosítás abból áll, hogy az acetátot kihagyjuk a szabályos YPD-2 tápközegből; ld. 1. példa) 5-7 napig növesztett *S. avermitilis* ATCC 31272 SC2 vagy *S. avermitilis* CD794 (*bkdF*) micéliumokat 8 ml minimál tápközeget (ld. lentebb) tartalmazó, 50 ml-es (1 x 6 hüvelyk) tenyésztő csőbe oltottuk. A csövet 29 °C-on, 72 óráig, 45°-os szögben, 200 percenkénti fordulattal rázattuk. Növesztés után a tenyészet 2 ml-es alikvotját 300 ml-es lombikban 25 ml minimál tápközegbe oltottuk, amelyhez különböző zsírsavak adhatók. A fermentációs tápközeget korábbi leírás szerint készítettük el (Hafner, E.W. és mtsi., J. Antibiotics, 44, 349-356, 1991), azzal a különbséggel, hogy az oldható (thinned) burgonyakeményítő helyett hidrolizált keményítőt (114 g/l) alkalmaztunk, a leucint és a NaCl-ot kihagytuk, és glicint adtunk hozzá (2 g/l). Néhány fermentációban a tápközeghez S-(+)-2-metil-vajsavat vagy ciklohexán-karbonsavat (CHC) adtunk (0,04 % végkoncentrációban). 29 °C-on 12 napig, 200-as percenkénti fordulattal végzett rázatás után a lombik tartalmát 4 térfogatnyi acetonitril:metanol (7:118) eleggyel extraháltuk, és a felülúszót nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) avermektinek jelenlétére vizsgáltuk. A HPLC-t Beckman 5 µm Ultrasphere ODS C-18

oszlop (4,6 mm x 25 cm) alkalmazásával, 0,75 ml/perc átfolyási sebességgel, a detektálást pedig 240 nm-nél az abszorbancia mérésével végeztük. A mozgó fázis víz (178 ml), acetonitril (102 ml) és metanol volt (2 liter végtérfogatra).

Az eredményeket az I. táblázatban foglaljuk össze. A négy thiostrepton-szenzitív klón, melyek elvesztették a szabad replikont, tipikus *bkd*-deficiens fenotípust mutattak. Ezek szerint, a négy klón egyike sem volt képes ILV minimál táptalajon növekedni, és a BCKDH komplex E1 komponensére vizsgálva nem mutattak aktivitást. A fermentációs vizsgálatok azt mutatták, hogy a blokkolt tenyészetek nem voltak képesek természetes avermektineket szintetizálni. Ráadásul, amikor S-(+)-2-metil-vajsavat adtunk a fermentációs tápközeghez (0,04 % végkoncentrációban), az avermektin természetes "a" alakjai szintetizálódtak; hasonlóan, a ciklohexán-karbonsav (CHC) hozzáadása új CHC-avermektinek kialakulásához vezetett. Ezek a fermentációs eredmények azt bizonyítják, hogy a *bkd* blokkolás nem befolyásolja az avermektin bioszintézisének celluláris mechanizmusát. E négy klón egyikét (pp15; ld. I. táblázat) hivatalosan *S. avermitilis* CD794 törzsnek neveztük el, és a találmány példaként az American Culture Type Collection-nél helyeztük letétbe. (A deponálásra vonatkozó információk az RO/134 számú PCT nyomtatványon találhatók.)

I. TABLÁZAT

Különböző *S. avermitilis* törzsek E1 elágazó láncú
alfa-ketosav dehidrogenáz aktivitása

<i>S. avermitilis</i> törzs ^a	Rezisztencia fenotípus ^b	Növekedés ILV-n ^c	E1 BCKDH spec. akt. ^{d,e}	Term. avermektinek termelése ^f
ATCC 31272 CS2	Erm-S, Tsr-S	+	69	+
PF 402-77	Erm-S, Tsr-S	-	0 ^g	-/+ ¹
CD783	Erm-R, Tsr-R	+	67	+
pp14	Erm-R, Tsr-R	+	65	+
pp21	Erm-R, Tsr-R	+	50	+
pp15 (CD794)	Erm-R, Tsr-S	-	0 ^g	-/+ ¹
pp17	Erm-R, Tsr-S	-	0 ^g	NTh
pp22	Erm-R, Tsr-S	-	0 ^g	-/+ ¹
pp40	Erm-R, Tsr-S	-	0 ^g	NTh

^a Az alábbi *S. avermitilis* törzseket alkalmaztuk: ATCC 31272 SC2 (az ATCC 31272 egyedi telepizolátuma); PF402-77, az ATCC 31272 SC2 törzs *bkd*-deficiens mutáns származéka, melyet kémiai mutagenézissel hoztunk létre; CD783, az ATCC 31272 SC2 törzs pCD768 plazmiddal transzformált származéka (ld. 9. példa); pp14-40: a CD783 protoplasztképzés és regenerálás után izolált különálló telepizolátumai (ld. 9. példa).

^b Erm-R: eritromicin-rezisztens; Tsr-R; thiostrepton-rezisztens.

- c Kizárólagos szénforrásként izoleucinnal, leucinnal és valinnal kiegészített minimál táptalajon növekedésre képes (+), illetve nem képes (-)
- d Az elágazó láncú alfa-ketosav dehidrogenáz E1 komponensének specifikus aktivitása (a protein egy milligrammjára vonatkoztatva egy perc alatt felszabadult CO₂ pikomóljainak száma).
- e Az eredmények kétszeri ismétléssel végzett vizsgálat eredményeinek átlagai.
- f + vagy - = a természetes avermektinek termelődése vagy nem termelődése fermentációval.
- g 0 = nem detektálható.
- h NT = nem teszteltük.
- i -/+ = a természetes avermektinek fermentációval nem termelődnek, azonban, ha S-(+)-metil-vaajsavat adtunk a fermentációs tápközeghez, termelődtek természetes avermektinek, és ha CHC-t adtunk a tápközeghez, új CHC-avermektinek termelődtek.

E) A *bkd*-deficiens genotípus igazolása érdekében végzett Southern hibridizációs vizsgálatok

Két *erm*-R, *tsr*-S klónnal (pp15, CD794; és pp22, CD798) Southern hibridizációs vizsgálatokat végeztünk. A vizsgálatok eredményeként kimutattuk, hogy az *ermE* marker kromoszómális integrációja, és a a *bkdF* nyitott leolvasási keretének (ORF-1) 5'-végét hordozó 1,4 kb-os BamHI genomiális fragment velejáró deléciója kettős crossover

eredménye. A kromoszomális DNS restrikciós fragmentjeit 1 %-os agaróz gélen végzett elektroforézissel bontottuk fel, és lényegében Southern (1975) eljárásával (ld. 5. példa) nylon membránra másoltuk.

10. példa

S. avermitilis *bkd*ABCF mutáns kialakítása

Ebben a példában stabil *S. avermitilis* többszörös mutáns kialakítását írjuk le, melyekben a mutációk a *bkdA*, *bkdB*, *bkdC* és *bkdF* gént érintik. A *bkdA*, *bkdB* és *bkdC* gén az elágazó láncú alfa-ketosav dehidrogenáz komplex E1-alfa, E1-béta, illetve E2 alegységét kódolja. Ezek a gének a *bkdABC* gén-cluster részei (ld. Denoya, C.D., 08/100,518 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, 1993. július 30.) A *bkdF* gén a fentebb leírt *bkdFGH* gén-clusterben helyezkedik el, és az elágazó láncú alfa-ketosav dehidrogenáz komplex E1-alfa alegységét kódolja.

A) Szelektálható antibiotikum-rezisztencia markerrel (*ermE*) jelölt kromoszomális célrégiót (*bkdC*) hordozó szállító vektor tervezése és konstruálása

Először a 6,5 kb-os *SphI* *S. avermitilis* 31272 genomiális fragmentet (amely a *bkdABC* gén-clustert hordozza) a pCD500 szállító/ingázó vektor (ld. Denoya, C.D., "Novel Bacterial Plasmid Shuttle Vectors for Streptomyces and *Escherichia*

coli", 08/032,925 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, 1993. március 18.) SphI klónozó helyére szubklónoztuk, miáltal a pCD544 plazmidot kaptuk (ld. 9. ábra). Ezután az *ermE* markert hordozó 1,7 kb-os BglII pIJ4026 fragmentet a pCD544 inszertben lévő egyetlen BglII helyre inszertáltuk. A pIJ4026 plazmid a pUC18 *E. coli* klónozó vektor származéka, amely a *Saccharomyces erythraea* (korábban *Streptomyces erythraeus*) *ermE* génjét hordozza (ld. M. Bibb és mtsi., *Gene*, 41, 357-368, 1985; és D.A. Hopwood és mtsi., *Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual*, The John Innes Foundation, Norwich, U.K., 1985). A kapott konstrukció (pCD547) a *bkdC* gén inszerció következtében inaktivált példányával rendelkezik.

B) Genetikailag jelölt *bkdC* mutáns törzs kialakítása

Szállító vektorként a pCD547 plazmidot (ld. előző szakasz) és gazdasejtként a *S. avermitilis* ATCC 31272 SC2 törzset alkalmazva, standard génhelyettesítési eljárások (ld. 9. példa) szerint 12 protoplaszt-képzett, majd regenerált különálló telepet szelektáltunk, melyek eritromicin-rezisztens és thiostrepton-szenzitív fenotípust mutattak. E 12 telep egyikét hivatalosan *S. avermitilis* CD570 törzsnek neveztük el (ld. 9. ábra), és ezt alkalmaztuk gazdaként a következő génhelyettesítési lépésekhez.

C) Mutált (deletált) *bkdABC* célrégiót hordozó szállító vektor tervezése és konstruálása

A pCD728 plazmid a pCD262 ingázó vektor származéka (ld. Denoya, C.D., "Novel Bacterial Plasmid Shuttle Vectors for *Streptomyces* and *Escherichia coli*", 08/032,925 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, 1993. március 18.), amely két *S. avermitilis* kromoszómális fragmentet (a pCD528 szubklónból készített 7 kb-os BamHI fragmentet, és a pCD559 szubklónból készített 6,5 kb-os BglII/BamHI fragmentet; ld. 9. ábra) hordoz. Az itt alkalmazott szubklónok részletes leírását illetően ld. Denoya, C.D., 08/100,518 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, 1993. július 30.

D) Jelöletlen *bkdABC* deletált törzs kialakítása

A pCD728 plazmidot *S. avermitilis* CD570 törzs protoplasztjaiba transzformáltuk, és feltételezett transzformánsokat nyertünk ki. A CD570 törzsbe transzformációval inszertáltunk egy kontroll plazmidot is, amely a genomiális fragmentek egyikét rossz orientációban tartalmazta. Sok rekombinánsot kaptunk, melyekben az *ermE* markert a *bkdABC* deletált konstrukció helyettesítette, és a pCD262 szállító plazmid elveszett a sejtekből. Összegzésül: a pCD728 — transzformáció és kettős crossover eredményeként — a *S. avermitilis* kromoszóma 2 kb-os delécióját eredményezte, amely a *bkdA* (E1-alfa), *bkdB* (E1-béta) és *bkdC*

(E2) géneket érinti. A kinyert integránsok fenotípusa Erm-S, Tsr-S volt. Southern blot analízissel alátámasztottuk, hogy az *ermE* markert a deletált szekvencia helyettesítette. A további munkához kiválasztottunk egy e csoportra jellemző, különálló telepet, melyet CD757 törzsként regisztráltunk (ld. 9. ábra).

E) A *bkdF* génehelyettesítő vektor tervezése és konstruálása

E vektor kialakítását a 9. példa (A) szakaszában írtuk le. Röviden; a pCD768 plazmid a pCD262 ingázó vektor származéka, amely két *S. avermitilis* genomiális fragmentet hordoz (2,3 kb-os és 4,1 kb-os BamHI), melyek a vad típusú kromoszómán az 1,4 kb-os BamHI fragment mindkét végével szomszédosak. A pCD768 ezenkívül *ermE* markert is tartalmaz, amely a 2,3 kb-os és 4,1 kb-os BamHI fragment között helyezkedik el. Az *ermE* marker az ORF-1-hez (*bkdF*) képest ellenkező orientációban fekszik, hogy elkerüljük a downstream génnek által okozott esetleges letalitást. Ez a konstrukció a gazda genomjában (rekombináció hatására) 1,4 kb-os deléciót eredményez, amely a *bkdF* gén 5'-végét érinti.

F) Több *bkd* (*bkdABCF*) mutációt hordozó *S. avermitilis* mutáns létrehozása

A pCD768 plazmidot (lényegében a 9. példában leírtak szerint) CD757 *S. avermitilis* törzs (*bkdABCF*; ld. (D) lépés) protoplasztjaiba transzformáltuk. Sok transzformánst

nyertünk, és a feltételezett integránsokat standard eljárással szelektáltuk. Az e csoportra jellemző, Erm-R, Tsr-S fenotípust mutató egyik integránst CD797 törzsnek neveztük el, és tovább vizsgáltuk (ld. 9. ábra). A CD797 tenyészet tipikus *bkd*-deficiens fenotípust mutatott, az alábbiak szerint: ILV minimál táptalajon képtelen volt növekedni (ld. 9. példa), és a BCKDH komplex E1 komponensére vizsgálva nem mutatott aktivitást. Fermentációs vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a blokkolt tenyészet csak akkor volt képes természetes avermektineket szintetizálni, ha a tápközeget S-(+)-2-metil-vajsavval vagy izovajsavval egészítettük ki. A ciklohexán-karbonsav (CHC) hozzáadása új CHC-avermektinek kialakulását eredményezte. Ezek a fermentációs eredmények azt bizonyítják, hogy az összetett *bkd* blokkolás, ami négy *bkd* gén (*bkdA*, *bkdB*, *bkdC* és *bkdF*) felbontását vagy delécióját jelenti, nem befolyásolja az avermektin bioszintézisének celluláris mechanizmusát.

SZEKVENCIALISTA

Szekvenciák száma: 14

TUDNIVALÓK AZ 1. SZAMÚ SZEKVENCIAHOZ**(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:**

- (A) HOSSZÚSÁG: 501 bázispár
- (B) TIPUS: nukleinsav
- (C) SZÁL: kétszálú
- (D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TIPUSA: cDNS**(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 1. SZ. SZEKV.**

```
TACGTCTTCC CGACCTACCG CGAGCACGGC GTCGCCTGGT CCGGCGGGGT CGACCCCACC 60
AACCTGCTCG GCATGTTCCG CGGCGTGAAC AACGGCGGGCT GGGATCCCAA CAGCAACAAC 120
TTCCACCTCT ACACGATCGT CATCGGCTCG CAGACGCTGC ACGCCACCGG CTACGCCATG 180
GGTATCGCCA AGGACGGCGC CGACTCGGCC GTGATCGCGT ACTTCGGTGA CGGCGCCTCC 240
AGCCAGGGTG ACGTCGCCGA ATCGTTCGCC TTCTCCGCGG TCTACAACGC CCCTGTCGTC 300
TTCTTCTGCC AGAACAACCA GTGGGCGATC TCGAGCCCCA CCGAGAAGCA GACCCGCGTC 360
CCGCTCTACC AGCGCGCGCA GGGCTACGGC TTCCCGGGCG TCCGCGTCGA CGGCAACGAC 420
GTACTGGCCT GCCTCGCCGT CACCAAGTGC CTCGAGCGGG CCCGCCGGGG CGAGGGGGCCC 480
ACGTTGGTCG AGGCGTTCAC G 501
```

TUDNIVALÓK A 2. SZAMÚ SZEKVENCIAHOZ**(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:**

- (A) HOSSZÚSÁG: 201 bázispár
- (B) TIPUS: nukleinsav
- (C) SZÁL: kétszálú
- (D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TIPUSA: cDNS

(xi) SZEKVENCIA LEIRAS: 2. SZ. SZEKV.

```
CTCGCCGAGT CGGGCATCGT CGGCACGGCG ATCGGTCTCG CCCTGCGCGG CTACCGGCCG 60
GTGGTGGAGA TCCAGTTCGA CGGCTTCGTC TTCCCGGCGT ACGACCAGAT CGTCACGCAG 120
CTCGCGAAGA TGCACGCGCG GCGGTCGGGC AAGATCAAGC TCCCGGTTGT CGTCCGCATC 180
CCGTACGGCG GCGGCATCGG C 201
```

TUDNIVALÓK A 3. SZAMÚ SZEKVENCIAHOZ

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZÚSÁG: 217 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁL: kétszálú

(D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TIPUSA: cDNS

(xi) SZEKVENCIA LEIRAS: 3. SZ. SZEKV.

```
CGCCGGTGTT CCTGGGCGGC GGGCCGCCGG AGATCGCCGC CCGCATCACG GAGCGCTGCT 60
TCTACCACCT GGAGGCACCC GTGCTGAGGG TCGGCGGCTA CCACGCCCCG TATCCGCCGG 120
CGCGTCTGGA AGAGGAGTAC CTTCCGGGCC TTGACCGGGT GCTCGATGCC GTCGACCGCT 180
CGCTGGCGTA CTGAGGAGAG GGTCGTGACG ACGATGA 217
```

TUDNIVALÓK A 4. SZAMÚ SZEKVENCIAHOZ

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZÚSÁG: 453 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁL: kétszálú

(D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TIPUSA: cDNS

(xi) SZEKVENCIA LEIRAS: 4. SZ. SZEKV.

AACCAGGAGA TCGTCCTCAA GCACTATGTG AACCTGGGCA TCGCGGCGGC CACCCCGCGC 60
 GGTCTGATCG TCCCGAACAT CAAGGACGCC CACGCCAAGA CCGTGCCGCA ACTGGCCGAG 120
 TCACTGGGTG AGTTGGTGTC GACGGCCCGC GAGGGCAAGA CGTCCCCGAC GGCCATGCAG 180
 GGCGGCACGG TCACGATCAC GAACGTCGGC GTTCTTCGGC GTCGACACGG GCACGCCGAT 240
 CCTATCCTCA ACCCCGGCGA GTCCGCGATC CTCGGCTTCG GCGCGATCAA GCTCCAGCCG 300
 TGGGTCCACA AGGGCAAGGT CAAGCCCCGA CAGGTCACCA CGCTGGCGCT CAGCTTCGAC 360
 CATCGCCTGG TCGACGGCGA GCTGGGCTCC AAGGTGCTGG CCGACGTGGC GGCGATCCTG 420
 GAGCAGCCGA AGCGGCTGAT CACCTGGGCC TAG 453

TUDNIVALÓK AZ 5. SZÁMÚ SZEKVENCIAHOZ

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZÚSÁG: 167 aminosav

(B) TIPUS: aminosav

(C) SZÁL: egyszálú

(D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 5. SZ. SZEKV.

Tyr	Val	Phe	Pro	Thr	Tyr	Arg	Glu	His	Gly	Val	Ala	Trp	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	
Val	Asp	Pro	Thr	Asn	Leu	Leu	Gly	Met	Phe	Arg	Gly	Val	Asn	Asn	Gly
				20					25					30	
Gly	Trp	Asp	Pro	Asn	Ser	Asn	Asn	Phe	His	Leu	Tyr	Thr	Ile	Val	Ile
				35					40					45	
Gly	Ser	Gln	Thr	Leu	His	Ala	Thr	Gly	Tyr	Ala	Met	Gly	Ile	Ala	Lys
				50					55					60	
Asp	Gly	Ala	Asp	Ser	Ala	Val	Ile	Ala	Tyr	Phe	Gly	Asp	Gly	Ala	Ser
65						70					75				80

Ser Gln Gly Asp Val Ala Glu Ser Phe Ala Phe Ser Ala Val Tyr Asn
 85 90 95
 Ala Pro Val Val Phe Phe Cys Gln Asn Asn Gln Trp Ala Ile Ser Ser
 100 105 110
 Pro Thr Glu Lys Gln Thr Arg Val Pro Leu Tyr Gln Arg Ala Gln Gly
 115 120 125
 Tyr Gly Phe Pro Gly Val Arg Val Asp Gly Asn Asp Val Leu Ala Cys
 130 135 140
 Leu Ala Val Thr Lys Cys Leu Glu Arg Ala Arg Arg Gly Glu Gly Pro
 145 150 155 160
 Thr Leu Val Glu Ala Phe Thr
 165

TUDNIVALÓK A 6. SZÁMÚ SZÉKVENCIAHOZ

(i) SZÉKVENCIA JELLEMZŐK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 67 aminosav
- (B) TÍPUS: aminosav
- (C) SZÁL: egyszálú
- (D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TÍPUSA: peptid

(xi) SZÉKVENCIA LEÍRÁS: 6. SZ. SZÉKV.

Leu Ala Glu Ser Gly Ile Val Gly Thr Ala Ile Gly Leu Ala Leu Arg
 1 5 10 15
 Gly Tyr Arg Pro Val Val Glu Ile Gln Phe Asp Gly Phe Val Phe Pro
 20 25 30
 Ala Tyr Asp Gln Ile Val Thr Gln Leu Ala Lys Met His Ala Arg Ala
 35 40 45

Ser Gly Lys Ile Lys Leu Pro Val Val Val Arg Ile Pro Tyr Gly Gly
 50 55 60
 Gly Ile Gly
 65

TUDNIVALÓK A 7. SZÁMÚ SZEKVENCIAHOZ

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 63 aminosav
- (B) TIPUS: aminosav
- (C) SZÁL: egyszálú
- (D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) SZEKVENCIA LEÍRAS: 7. SZ. SZEKV.

Pro Val Phe Leu Gly Gly Gly Pro Pro Glu Ile Ala Ala Arg Ile Thr
 1 5 10 15
 Glu Arg Cys Phe Tyr His Leu Glu Ala Pro Val Leu Arg Val Gly Gly
 20 25 30
 Tyr His Ala Pro Tyr Pro Pro Ala Arg Leu Glu Glu Glu Tyr Leu Pro
 35 40 45
 Gly Leu Asp Arg Val Leu Asp Ala Val Asp Arg Ser Leu Ala Tyr
 50 55 60

TUDNIVALÓK A 8. SZÁMÚ SZEKVENCIAHOZ

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

- (A) HOSSZÚSÁG: 150 aminosav
- (B) TIPUS: aminosav
- (C) SZÁL: egyszálú
- (D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TIPUSA: peptid

(xi) SZEKVENCIA LEIRAS: 8. SZ. SZEKV.

Asn	Gln	Glu	Ile	Val	Leu	Lys	His	Tyr	Val	Asn	Leu	Gly	Ile	Ala	Ala
1				5					10					15	
Ala	Thr	Pro	Arg	Gly	Leu	Ile	Val	Pro	Asn	Ile	Lys	Asp	Ala	His	Ala
			20					25					30		
Lys	Thr	Val	Pro	Gln	Leu	Ala	Glu	Ser	Leu	Gly	Glu	Leu	Val	Ser	Thr
		35					40					45			
Ala	Arg	Glu	Gly	Lys	Thr	Ser	Pro	Thr	Ala	Met	Gln	Gly	Gly	Thr	Val
	50					55					60				
Thr	Ile	Thr	Asn	Val	Gly	Val	Leu	Arg	Arg	Arg	His	Gly	His	Ala	Asp
65				70					75					80	
Pro	Ile	Leu	Asn	Pro	Gly	Glu	Ser	Ala	Ile	Leu	Gly	Phe	Gly	Ala	Ile
			85						90					95	
Lys	Leu	Gln	Pro	Trp	Val	His	Lys	Gly	Lys	Val	Lys	Pro	Arg	Gln	Val
		100						105					110		
Thr	Thr	Leu	Ala	Leu	Ser	Phe	Asp	His	Arg	Leu	Val	Asp	Gly	Glu	Leu
		115					120					125			
Gly	Ser	Lys	Val	Leu	Ala	Asp	Val	Ala	Ala	Ile	Leu	Glu	Gln	Pro	Lys
	130					135						140			
Arg	Leu	Ile	Thr	Trp	Ala										
145					150										

TUDNIVALÓK A 9. SZAMÚ SZEKVENCIAHOZ

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZÓSÁG: 41 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁL: kétszálú

(D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TIPUSA: cDNS

(xi) SZEKVENCIA LEÍRAS: 9. SZ. SZEKV.

AAGAATTCGA GCTCGGCGAC GCGGCCACCT CCGAGGGCGA C

41

TUDNIVALÓK A 10. SZÁMÚ SZEKVENCIAHOZ

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZÚSÁG: 38 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁL: kétszálú

(D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TIPUSA: cDNS

(xi) SZEKVENCIA LEÍRAS: 10. SZ. SZEKV.

AAGGATCCTC TAGAGGTSSW GTGGKGGCCG ATSCGGWA

38

TUDNIVALÓK A 11. SZÁMÚ SZEKVENCIAHOZ

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZÚSÁG: 37 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁL: kétszálú

(D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TIPUSA: cDNS

(xi) SZEKVENCIA LEÍRAS: 11. SZ. SZEKV.

AAGGATCCTG CAGCCCAGTC ACGACGTTGT AAAACGA

37

TUDNIVALÓK A 12. SZÁMÚ SZEKVENCIAHOZ

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZÚSÁG: 37 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁL: kétszálú

(D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TIPUSA: cDNS

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 12. SZ. SZEKV.

AAGGATCCTG CAGACAGCTA TGACCATGAT TACGCCA

37

TUDNIVALÓK A 13. SZÁMÚ SZEKVENCIAHOZ

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZÓSÁG: 17 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁL: kétszálú

(D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TIPUSA: cDNS

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 13. SZ. SZEKV.

GTAGGGAGCC TGATATG

17

TUDNIVALÓK A 14. SZÁMÚ SZEKVENCIAHOZ

(i) SZEKVENCIA JELLEMZŐK:

(A) HOSSZÓSÁG: 17 bázispár

(B) TIPUS: nukleinsav

(C) SZÁL: kétszálú

(D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TIPUSA: cDNS

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 14. SZ. SZEKV.

GCTATCCGCG CATCCAT

17

Szabadalmi igénypontok

1. Izolált DNS-szegment, amely *Streptomyces* nemzetségbe tartozó organizmus elágazó szénláncú alfa-ketosav dehidrogenáz komplexét kódolja.

2. Egy 1. igénypont szerinti izolált DNS-szegment, amely a *Streptomyces avermitilis* elágazó szénláncú alfa-ketosav dehidrogenáz komplexét kódolja.

3. Egy 1. igénypont szerinti izolált DNS-szegment, amely tartalmaz egy, az említett elágazó szénláncú alfa-ketosav dehidrogenáz komplex expresszióját szabályozó DNS-régiót is.

4. Egy 2. igénypont szerinti izolált DNS-szegment amely tartalmaz egy, az említett elágazó szénláncú alfa-ketosav dehidrogenáz komplex expresszióját szabályozó DNS-régiót is.

5. DNS-szegment, amely az 1. számú szekvencia, 2. sz. szekv., 3. sz. szekv. vagy 4. sz. szekv. DNS-szekvenciáját vagy az ilyen szekvencia allélváltozatát tartalmazza.

6. DNS-szegment, amely egy 5. igénypont szerinti DNS-szegment alegysége, illetve funkcionális megfelelője.

7. Rekombináns DNS, amely egy 5. igénypont szerinti DNS-szegmentet tartalmaz.

8. Gazdasejt, azzal jellemezve, hogy egy 7. igénypont szerinti DNS-szegmentet juttatunk belé.

9. Plazmid, amely egy 7. igénypont szerinti rekombináns DNS-t tartalmaz.

10. DNS-szegment, amely a pCD713, pCD740, pCD747 v vagy pCD854 valamelyike.

11. Gazdasejt, azzal jellemezve, hogy egy 10. igénypont szerinti DNS-szegmentet juttatunk belé.

12. Egy 5. igénypont szerinti DNS-szegment, amely az 1. számú szekvencia, 2. sz. szekv., 3. sz. szekv. vagy 4. sz. szekv. DNS-szekvenciájának vagy az ilyen szekvencia allélváltozatának transzkripcióját vagy transzlációját szabályozó DNS-szegmentet tartalmaz.

13. Az elágazó szénláncú alfa-ketosav dehidrogenáz komplexet kódoló gének, amelyek a 10. igénypont szerinti DNS-szegmentben helyezkednek el.

14. DNS-szegment, amely olyan DNS-szekvenciát tartalmaz, amely az 1. számú szekvencia, 2. sz. szekv., 3. sz. szekv. vagy 4. sz. szekv. DNS-szekvenciájának vagy annak allélváltozatának alegysége, és amely próbaként alkalmazva képes az 1. számú szekvenciához, 2. sz. szekvenciához, 3. sz. szekvenciához, illetve 4. sz. szekvenciához vagy

allélváltozatához hibridizálni, illetve polimeráz láncreakcióban primerként alkalmazva képes az említett szekvenciák egészét vagy részét amplifikálni.

15. Lényegében tisztított polipeptid, amely az 5. sz. szekv., 6. sz. szekv., 7. sz. szekv. vagy 8. sz. szekv. aminosav-szekvenciájából áll.

16. Polipeptid, amely egy 8. igénypont szerinti gazdasejtben expresszállódva termelődik.

17. Eljárás természetes avermektin előállítására, azzal jellemezve, hogy az említett természetes avermektin előállításához alkalmas feltételek és fermentációs tápközeg alkalmazásával olyan *S. avermitilis*-t fermentálunk, melyben a *bkdF*, *bkdG* és *bkdH* gének közül egyet vagy többet tartalmazó genomiális fragment kópiaszámát megnöveltük.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan *S. avermitilis*-t fermentálunk, melyben a *bkdF*, *bkdG* és *bkdH* géneket tartalmazó genomiális fragment kópiaszámát növeltük meg.

19. Eljárás természetes avermektin előállítására, azzal jellemezve, hogy az említett természetes avermektin előállításához alkalmas feltételek és fermentációs tápközeg alkalmazásával olyan *S. avermitilis*-t fermentálunk, melyben a *bkdF*, *bkdG* és *bkdH* gének közül egyet vagy többet

tartalmazó genomiális fragment expresszióját az ilyen expresszió szabályozásáért felelős gének manipulációjával vagy helyettesítésével fokoztuk.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan *S. avermitilis*-t fermentálunk, melyben a *bkdF*, *bkdG* és *bkdH* géneket tartalmazó genomiális fragment expresszióját fokoztuk.

21. Eljárás új avermektin előállítására, azzal jellemezve, hogy az említett új avermektin előállításához alkalmas feltételek és fermentációs tápközeg alkalmazásával olyan *S. avermitilis*-t fermentálunk, melyben a *bkdF*, *bkdG* és *bkdH* gének közül egyet vagy többet tartalmazó genomiális fragment expresszióját az ilyen expresszióért felelős gének deléciójával, inaktiválásával, helyettesítésével vagy egyéb manipulációjával csökkentettük vagy megszüntettük.

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan *S. avermitilis*-t fermentálunk, melyben a *bkdF*, *bkdG* és *bkdH* géneket tartalmazó genomiális fragment expresszióját az ilyen expresszióért felelős gének deléciójával, inaktiválásával, helyettesítésével vagy egyéb manipulációjával csökkentettük vagy megszüntettük.

23. A 21. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az expresszióért felelős génekként enhancer, inhibitor, aktivátor vagy represszor géneket deletálunk, inaktiválunk,

helyettesítünk vagy más módon manipulálunk.

24. A 21. igénypont szerinti eljárás új avermektin előállítására, azzal jellemezve, hogy az említett új avermektin előállításához alkalmas feltételek és fermentációs tápközeg alkalmazásával olyan *S. avermitilis*-t fermentálunk, amelyben a *bkdF*, *bkdG* és *bkdH* gének közül egyet vagy többet tartalmazó genomiális fragmentet deletáltuk vagy inaktiváltuk.

25. A 24. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan *S. avermitilis*-t fermentálunk, amelyben a *bkdF*, *bkdG* és *bkdH* géneket tartalmazó genomiális fragmentet deletáltuk vagy inaktiváltuk.

26. Eljárás új avermektin előállítására, azzal jellemezve, hogy az említett új avermektin előállításához alkalmas feltételek és fermentációs tápközeg alkalmazásával olyan *S. avermitilis*-t fermentálunk, melyben a *bkdA*, *bkdB* és *bkdC* gének közül egyet vagy többet, illetve a *bkdF*, *bkdG* és *bkdH* gének közül egyet vagy többet tartalmazó genomiális fragment expresszióját az ilyen expresszióért felelős gének deléciójával, inaktiválásával, helyettesítésével vagy egyéb manipulációjával csökkentettük vagy megszüntettük.

27. A 26. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan *S. avermitilis*-t fermentálunk, melyben a *bkdA*, *bkdB*, *bkdC* és *bkdF* géneket tartalmazó genomiális fragmentet

deletáltunk vagy inaktiváltunk.

A meghatalmazott:

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
8.



94 oldal
9 ábra oldal

103 oldal bevez

P3601644

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

18163

9/1

1A. ábra

5' - AAGAATTCGAGCTCGGCGACGGCGCCACCTCCGAGGGCGAC - 3'

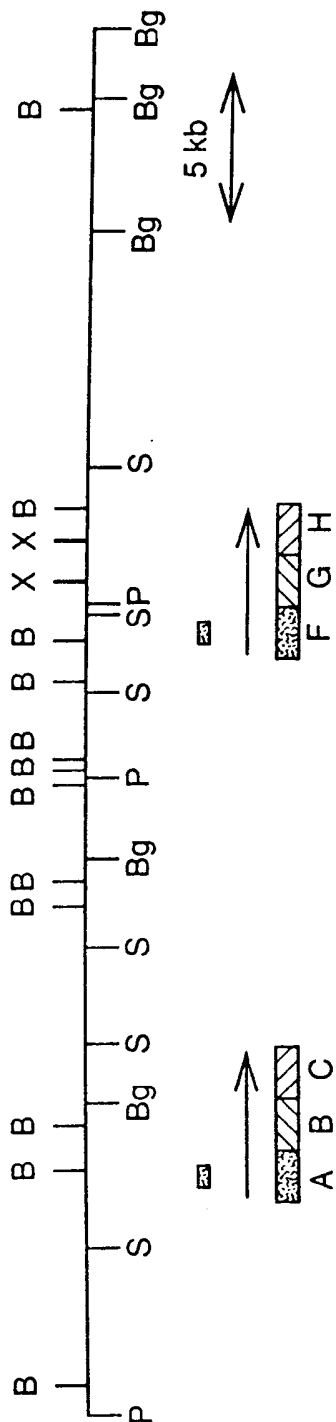
EcoRI SacI

1B. ábra

5' - AAGGATCCTCTAGAGGTSSWGTGGKGGCCGATSCGGWA - 3'

BamHI XbaI

2. ábra



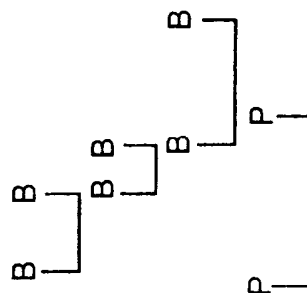
Szubklónok:

pCD740

pCD854

pCD713

pCD747



3. ábra

[illegible]

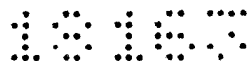
4. ábra

CTC	GCC	GAG	TCG	GGC	ATC	GTC	GGC	ACG	GGC	ATC	GGT	CTC	GCC	CTG	CGC	GGC	TAC	54
L	A	E	S	G	I	V	G	T	A	I	G	L	A	L	R	G	Y	
CGG	CCG	GTG	GTG	GAG	ATC	CAG	TTC	GAC	GGC	TTC	GTC	TTC	CCG	GGC	TAC	GAC	CAG	108
R	P	V	V	E	I	Q	F	D	G	F	V	F	P	A	Y	D	Q	
ATC	GTC	ACG	CAG	CTC	GGC	AAG	ATG	CAC	GGC	CGG	GGC	TCG	GGC	AAG	ATC	AAG	CTC	162
I	V	T	Q	L	A	K	M	H	A	R	A	S	G	K	I	K	L	
CCC	GTT	GTC	GTC	CGC	ATC	CCG	TAC	GGC	GGC	GGC	ATC	GGC						189
P	V	V	V	R	I	P	Y	G	G	G	I	G						

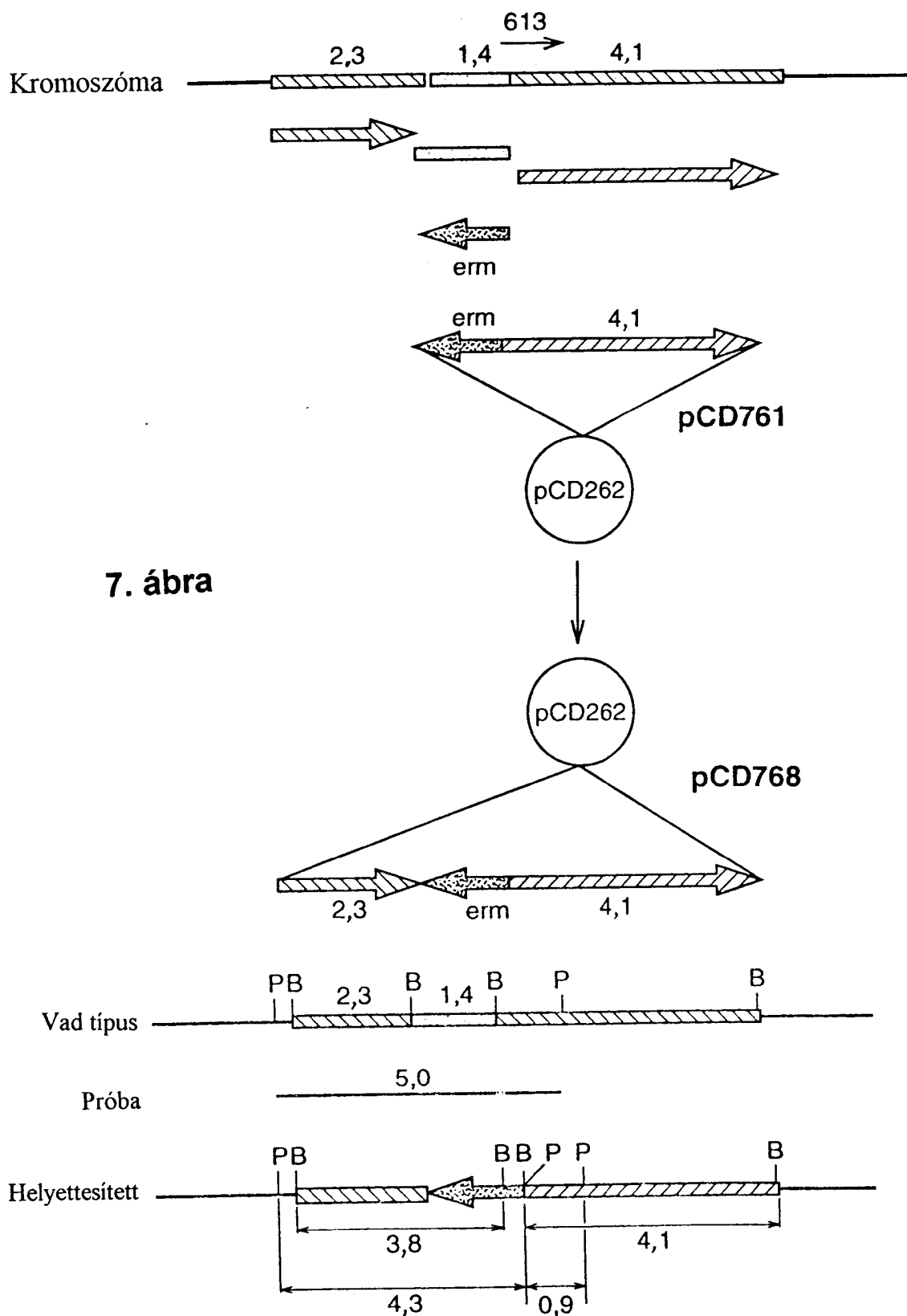
5. ábra

[illegible]

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



56	AAC CAG GAG ATC GTC CTC AAG CAC TAT GTG AAC CTG GGC ATC GCG GCG GCC ACC	29	GTG AAC CTG GGC ATC GCG GCG GCC ACC	56
	N Q E I V L K H Y V N L G I A A T			
110	CCG CGC GGT CTG ATC GTC CCG AAC ATC AAG GAC GCC CAC GGC AAG ACC GTG CCG	83	AAG GAC GCC CAC GGC AAG ACC GTG CCG	110
	P R G L I V P N I K D A H A K T V P			
164	CAA CTG GCC GAG TCA CTG GGT GAG TTG GTG TCG ACG GCC GCG GAG GGC AAG ACG	137	GTG TCG ACG GCC GCG GAG GGC AAG ACG	164
	Q L A E S L G E L V S T A R E G K T			
218	TCC CCG ACG GCC ATG CAG GGC GGC ATC GTC ACG AAC GTC GGC GTT CTT	191	GTG ACG ATC ACG AAC GTC GGC GTT CTT	218
	S P T A M Q G G G T V T I T N V G V L			
272	CGG CGT CGA CAC GGC CAC GCC GAT CCT ATC CTC AAC CCC GGC GAG TCC GCG ATC	245	ATC CTC AAC CCC GGC GAG TCC GCG ATC	272
	R R R H G H A D P I L N P G E S A I			
326	CTC GGC TTC GGC GCG ATC AAG CTC CAG CCG TGG GTC CAC AAG GGC AAG GTC AAG	299	CCG TGG GTC CAC AAG GGC AAG GTC AAG	326
	L G F G A I K L Q P W V H K G K V K			
380	CCC CGA CAG GTC ACC ACG CTG GCG CTC AGC TTC GAC CAT CGC CTG GTC GAC GGC	353	AGC TTC GAC CAT CGC CTG GTC GAC GGC	380
	P R Q V T T L A L S F D H R L V D G			
434	GAG CTG GGC TCC AAG GTG CTC GGC GAC GTG GCG GCG ATC CTG GAG CAG CCG AAG	407	GTG GCG GCG ATC CTG GAG CAG CCG AAG	434
	E L G S K V L A D V A A I L E Q P K			
	CGG CTG ATC ACC TGG GCC TAG			
	R L I T W A .			



7. ábra

8. ábra

