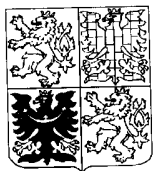


PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 30.05.1994

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 30.07.1993

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1993/100518

(33) Země priority: US

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 14.11.2001
(Věstník č. 11/2001)

(86) PCT číslo: PCT/IB94/00127

(87) PCT číslo zveřejnění: WO95/04150

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 2929

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/53

C 12 N 15/70

C 12 N 9/02

C 12 N 5/10

C 12 P 19/62

(71) Přihlašovatel:

PFIZER INC., New York, NY, US;

(72) Původce:

Denoya Claudio D., Groton, CT, US;

(74) Zástupce:

Matějka Jan JUDr., Národní 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob výroby nových avermektinů

(57) Anotace:

Způsob výroby nových avermektinů, při němž se za podmínek a ve fermentačním médiu vhodném pro produkci takových nových avermektinů fermentuje *Streptomyces avermitilis*, u něhož byla snížena nebo odstraněna exprese komplexu rozvětvená α -ketokyselina dehydrogenázy delecí, inaktivací, nahrazením nebo jinou manipulací genů zodpovědných za tuto expresi.

CZ 2000 - 2929 A3

~~PV 2010-2929~~

~~176823~~

~~01-2203-00-Ma~~

Způsob výroby nových avermektinů

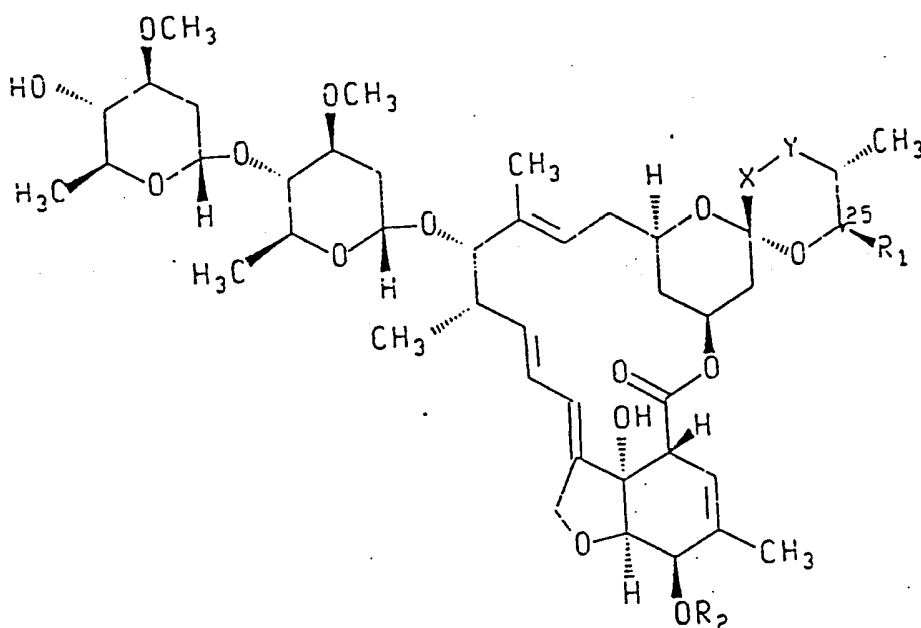
Oblast techniky

Vynález se týká způsobu výroby nových avermektinů fermentací.

Dosavadní stav techniky

Mikroorganismy produkují četné farmaceutické produkty. Z těchto mikroorganismů byla podstatná pozornost zaměřena na příslušníky rodu *Streptomyces*. Tato skupina gram-pozitivních zemních bakterií poskytla až dosud více než 90 % terapeuticky užitečných antibiotik. *Streptomyces* jsou v ohnisku intenzivního výzkumu využívajícího technik klonování rekombinantní DNA za účelem izolace antibiotických biosyntetických genů, vytvoření nových derivátů nebo hybridních sloučenin, izolace regulačních genů a zkoumání regulačních mechanismů podílejících se jak na primárním, tak na sekundárním metabolismu.

Streptomyces avermitilis produkuje osm rozdílných, ale příbuzných antiparazitických polyketidových sloučenin, které jsou označovány názvem avermektiny. Avermektinový komplex produkováný *S. avermitilis* obsahuje čtyři hlavní složky: A1a, A2a, B2a a B2a a čtyři vedlejší složky: A1b, A2b, B1b a B2b. Struktura těchto různých složek je znázorněna dále.



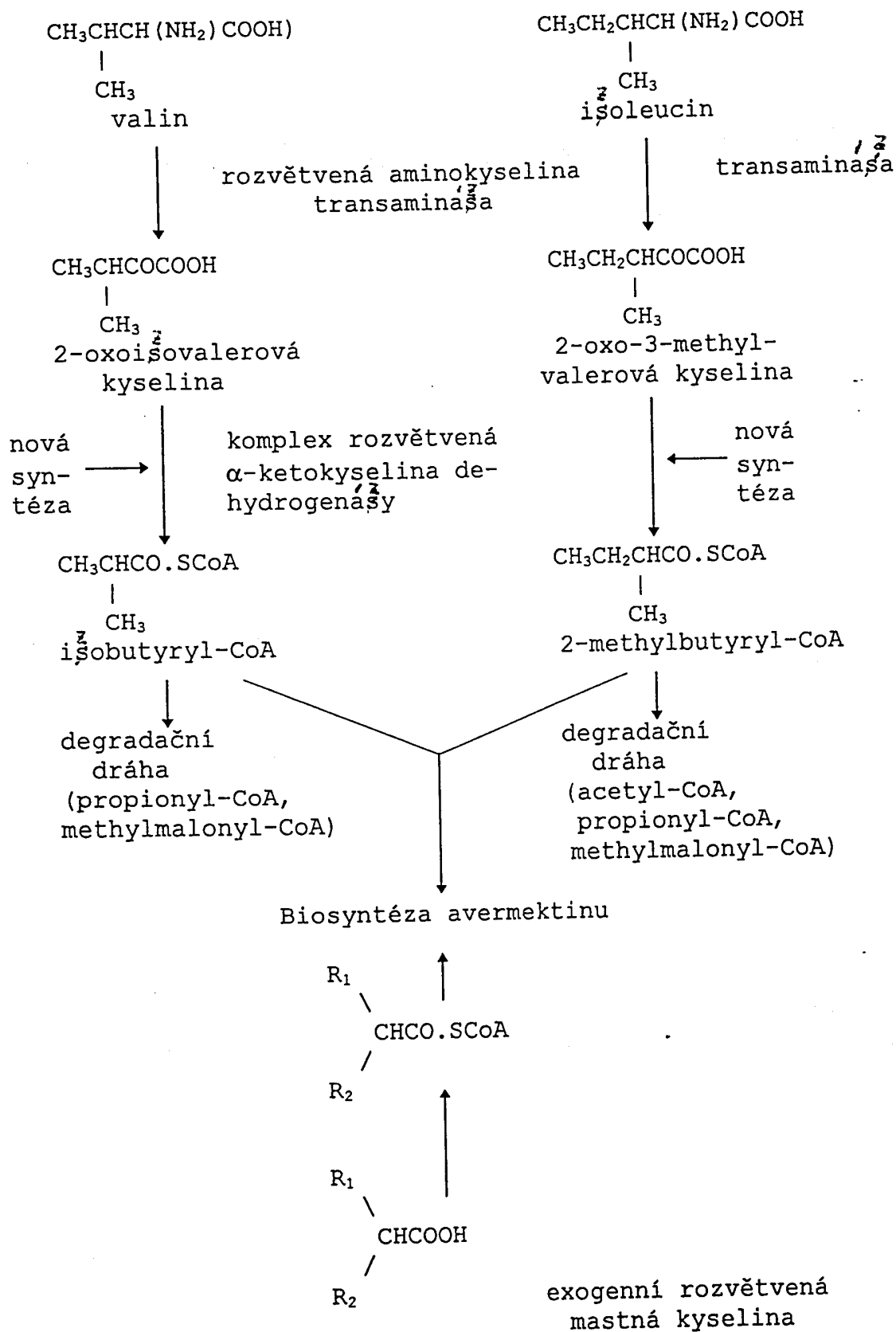
<u>Avermektin</u>	<u>R¹</u>	<u>R²</u>	<u>X-Y</u>
A1a	<u>sek</u> -butyl	Me	CH=CH
A1b	<u>iš</u> opropyl	Me	CH=CH
A2a	<u>sek</u> -butyl	Me	CH ₂ -CH(OH)
A2b	<u>iš</u> opropyl	Me	CH ₂ -CH(OH)
B1a	<u>sek</u> -butyl	H	CH=CH
B1b	<u>iš</u> opropyl	H	CH=CH
B2a	<u>sek</u> -butyl	H	CH ₂ -CH(OH)
B2b	<u>iš</u> opropyl	H	CH ₂ -CH(OH)

Polyketidová struktura avermektinu je odvozena od sedmi acetátových molekul, pěti propionátových molekul a jedné molekuly α -rozvětvené mastné kyseliny, kterou je buď S(+)-2-methylmáselná kyselina nebo išomáselná kyselina. Označení "A" se vztahuje k avermektinu, v němž je 5-substituentem methoxyskupina a označení "B" se vztahuje k avermektinu, v němž je 5-substituentem hydroxyskupina. Označení "1" se vztahuje k avermektinům, v nichž je dvojná vazba přítomna v poloze 22-23 a označení "2" k avermektinům, obsahujícím v poloze 22 vodík a v poloze 23 hydroxyskupinu. Konečně v poloze C-25 jsou možné dva substituenty: v aver-

mektinech ze série "a" je přítomna sek.butylskupina (odvozená od L-³isoleucinu) a v avermektinech ze série "b" je přítomna ³isopropylskupina (odvozená od L-valinu). Přehled viz Fisher M. H. a Mrozik H., 1984, "Macrolide Antibiotics", Academic Press, kapitola 14.

Pod označením "přírodní avermektiny" se rozumějí avermektiny produkované *S. avermitilis*, v nichž je substituentem v poloze 25, jak již bylo uvedeno, buď ³isopropylskupina nebo sek.butylskupina. Avermektiny, které v poloze 25 obsahují jinou skupinu než ³isopropylskupinu nebo sek.butylskupinu, jsou v tomto popisu označovány názvem "nové" nebo "nepřirozené" avermektiny.

Jedna metabolická dráha vedoucí k těmto α -rozvětveným mastným kyselinám ve formě CoA zahrnuje reakci s rozvětvená aminokyselina transaminašou, po níž se provede reakce s rozvětvená α -ketokyselina dehydrogenašou. (Alternativně mohou vzniknout rozvětvený alifatický acyl-CoA-deriváty novou syntézou z rozvětvených α -ketokyselin.) Tyto metabolické dráhy jsou znázorněny dále.



Nedávno byl izolován mutant *S. avermitilis*, který nevykazuje žádnou detekovatelnou aktivitu rozvětvená α -ketokyselina dehydrogenázy (BCKDH) v posledně uvedeném enzymu (Hafner et al, 1988, Evropská patentová přihláška číslo podání 88300353.5 s publikačním číslem 0284176). Tento mutant byl izolován po standardní chemické mutagenezi kmene *S. avermitilis* ATCC 31 272 za použití screeningu na nepřítomnost produkce $^{14}\text{CO}_2$ z ^{14}C -1 značené 2-oxoisokapronové kyseliny (analog leucinu), jako substrátu. Tento mutant není schopen syntetizovat přírodní avermektiny, pokud se k médiu, v němž je fermentován, nepřidá α -rozvětvená mastná kyselina nebo její prekurzor nesoucí isopropylovou nebo sek.butylovou skupinu (v S-formě). Tento mutant je dále schopen produkovat nové či nepřírozené avermektiny při fermentaci za vodných aerobních podmínek v živné půdě obsahující příslušnou alternativní karboxylovou kyselinu, jako cyklohexankarboxylovou kyselinu (CHC) nebo její prekurzor.

Klonování BCKDH z *S. avermitilis* je vysoce žádoucí. Manipulace těchto genů pomocí technik s rekombinantní DNA by měla umožnit produkci přírodních a nových avermektinů. U některých kmenů by bylo možno očekávat zvýšení titru přírodních avermektinů na základě zvýšení počtu kopií genů BCKDH. Kromě toho, vytvoření ireverzibilně blokovaného kmene bkd, vykazujícího permanentně vypuštěnou nebo modifikovanou aktivitu BCKDH prostřednictvím nahrazení genu, by představovalo zlepšenou alternativu k běžnému mutantu bkd, který byl získán, jak je uvedeno výše, chemickou mutagenezí.

Multienzymové komplexy α -ketokyselina dehydrogenázy, tj. komplex rozvětvená α -ketokyselina dehydrogenáza (BCKDH), komplex pyruvát dehydrogenáza (PDH) a komplex α -ketoglutarát dehydrogenáza (KGDH), katalyzují oxidační dekarboxylace α -ketokyselin s rozvětveným řetězcem, pyruvátu a α -ketoglutarátu, které jsou spojeny s uvolňováním oxidu

uhličitého a tvorbou odpovídajících acyl-CoA a NADH (Perham, R. N., 1991, Biochemistry 30: 8501 až 8512). Každý z těchto komplexů sestává ze tří různých katalytických enzymů: dekarboxylašy (E1), dihydrolipoamid acyltransferašy transacylašy (E2) a dihydrolipoamid dehydrogenašy (E3).

Rozvětvená α -ketokyselina dehydrogenaša (BCKDH) je multienzymovým komplexem, který se skládá ze tří funkčních složek: dekarboxylašy (E1), transacylašy (E2) a lipoamid dehydrogenašy (E3). Purifikované komplexy z *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Bacillus subtilis* se skládají ze čtyř polypeptidů. Také purifikované savčí komplexy se skládají ze čtyř polypeptidů, E1 α , E1 β , E2 a E3. Komplex α -ketokyselina dehydrogenašy byl izolován z *Bacillus subtilis* vykazujícího jak pyruvát, tak rozvětvená α -ketokyselina dehydrogenašovou aktivitu. Tento komplex s dvojí funkcí oxiduje pyruvát a poskytuje mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem pro membránové fosfolipidy.

Klonování prokaryontních rozvětvená α -ketokyselina dehydrogenašových genů bylo oznámeno v případě *Pseudomonas* a *Bacillus*, ale nikoliv v případě *Streptomyces*. Zjistilo se, že v těchto systémech vytvářejí geny kódující BCKDH shluk v operonu. Geny komplexu BCKDH *Pseudomonas putida* byly klonovány a byla stanovena nukleotidová sekvence této oblasti (Sykes et al., 1987, J. Bacteriol. 169: 1619 až 1625 a Burns et al., 1988, Eur. J. Biochem., 176: 165 až 169 a 176: 311 až 317). Molekulová hmotnost E1 α je 45 289, E1 β 37 138, E2 45 134 a E3 48 164. Tyto čtyři geny jsou spojeny do shluku o sekvenci E1 α , E1 β , E2 a E3. Analýza Northern blot ukazuje, že exprese těchto čtyř genů probíhá z jediné mRNA a že tyto geny tvoří operon. Bezprostředně před počátkem E1 α kódující oblasti je zde přítomen typický prokaryontní konvenční (consensus) promotor, který umožňuje konstitutivní expresi genů *Pseudomonas bkd*. Iniciátorový

kodon pro E1 β kódující oblast je umístěn jen 40 nukleotidů za koncem otevřeného čtecího rámce (ORF) E1 α . Naproti tomu mezi ORF E1 β a ORF E2 neexistuje žádný intergenový prostor, poněvadž stop kodon ORF E1 β představuje triplet bezprostředně předcházející iniciátorový kodon ORF E2. Intergenový prostor mezi ORF E2 a ORF E3 je redukován pouze na dva nukleotidy. Geny *Pseudomonas bkd* jsou tedy těsně spojeny. Podobně byl klonován operon kódující duální komplex *Bacillus subtilis* BCKDH/PDH (Hemila et al., 1990, J. Bacteriol., 172: 5052 až 5063). Tento operon obsahuje čtyři otevřené čtecí rámce kódující čtyři proteiny o velikosti 42, 36, 48 a 50 kilodalton (kDa), u nichž byla prokázána vysoká homologie s podjednotkami E1 α , E1 β , E2 a E3 shluku *Pseudomonas bkd*. Nedávno byly také klonovány a sekvenovány geny kódující α a β podjednotky složky E1 duálního multienzymového komplexu BCKDH/PDH z *Bacillus stearothermophilus* (odhadovaná molekulová hmotnost α podjednotky je přibližně 41 000 a β podjednotky přibližně 35 000) (Hawkins et al., 1990, Eur. J. Biochem., 191: 337 až 346).

Dále byla také publikovány sekvence četných eukaryontních podjednotek E1 α a β BCKDH (humánního, hovězího a krysího původu). Nedávno bylo počítačovou analýzou provedeno srovnání všech publikovaných sekvencí známých pro E1 α a E1 β složky komplexů PDH a BCKDH z několika druhů (Wexler et al. 1991, FEBS Letters, 282: 209 až 213). Zjistila se zajímavá skutečnost, že několik identifikovaných oblastí α a β podjednotek má vysoce konzervovaný charakter nejen ve všech až dosud popsáných PDH, nýbrž i v jak prokaryontních, tak eukaryontních komplexech BCKDH.

V tomto textu se popisuje klonování rozvětvená α ketokyselina dehydrogenasašových genů ze *Streptomyces avermitilis*. Tyto nové geny byly klonovány za použití kombinace dvou technik molekulární genetiky, tj. řetězové reakce ka-

talyzované DNA polymerá²šou (PCR) a zkoušení homologie próbami (zkušebními látkami), tj. próbováním homologie (homology probing). Próbování homologie zahrnuje screening cDNA nebo genomových knihoven pomocí radioaktivně značených syntetických oligonukleotidových pr²ób odpovídajících aminokyselinovým sekvencím proteinu. Tato technika má však svá omezení, z nichž jedním je dost přísné omezení, pokud se týče degenerace oligonukleotidu, kterého lze použít. Screeningová hybridizace se kromě toho provádí za podmínek nízké stringence, takže počet falešných pozitivních výsledků je často vysoký. Pro překonání některých z těchto omezení hybridizace oligonukleotidu bylo nedávno vyvinuto variantní próbování homologie, které zahrnuje řetězovou reakci s DNA polymerá²šou (PCR) a které umožňuje použít jako pr²ób vysoce degenerovaných nukleotidů. Tato metoda vyžaduje pouze znalost aminokyselinové sekvence dvou krátkých oblastí (přibližně v délce 7 až 10 aminokyselin) v kódovaném proteinu. Jako primerů se při této reakci používá dvou oligonukleotidů odpovídajících těmto peptidovým sekvencím. Každého primeru se může použít ve formě směsi úplně degenerovaných oligonukleotidů obsahující všechny možné kodonové kombinace, které by mohly kódovat známé aminokyselinové sekvence. Jako templátu pro amplifikaci se může použít kteréhokoliv z několika zdrojů DNA, včetně genomové DNA a superhelixových forem plasmidových knihoven. Několik zpráv, které byly nedávno publikovány v literatuře, ukazuje užitečnost kombinace řetězové reakce katalyzované polymerá²šou s próbováním homologie pro identifikaci genu z několika druhů.

Technické termíny, kterých se používá v tomto popisu, jsou dobře známy odborníkům v oboru molekulární genetiky. Definice těchto termínů je možno nalézt v mnoha učebnicích a příručkách, které se věnují molekulární biologii, jako je "Genes", II. vydání, dr. Benjamin Lewin, 1985,

John Wiley & Sons, Inc. New York, USA. Definice termínů, kterých se v tomto popisu často používá, jsou uvedeny dále.

Pod označením "antibiotikum" se rozumí chemické činidlo inhibující růst bakteriálních buněk. Antibiotik se používá pro selekci rekombinantních bakteriálních buněk.

Pod označením "gen rezistence vůči antibiotiku" se rozumí sekvence DNA, která po zavedení do hostitelské buňky, jež je přirozeně senzitivní vůči určitému antibiotiku, uděluje buňce rezistenci vůči tomuto antibiotiku. Tento gen bývá také označován názvem "antibiotický marker".

Pod označením "bakteriofágy" se rozumějí viry infikující bakterie.

Pod označením "cRNA" se rozumí jednořetězcová RNA, která je komplementární vůči DNA a je z ní syntetizována transkripcí in vitro.

Pod označením "chromosom" se rozumí oddělená jednotka genomu nesoucí mnoho genů.

Pod označením "klon" se rozumí velký počet buněk nebo molekul, které jsou identické s jedním předkem.

Pod pojmem "klonovací vektor" se rozumí jakýkoliv plasmid, do kterého je možno vložit cizí DNA, jež má být klonována. Klonovací vektor vnáší při transformaci cizí DNA do hostitelské bakteriální buňky.

Pod označením "CoA" se rozumí koenzym A.

Pod označením "kohezní (lepivá) koncová sekvence" (Cos) se rozumí sekvence DNA pocházející z bakteriofágu lambda a umožňující sbalování in vitro.

Pod označením "košmid" se rozumí plasmid, do něhož byla vložena bakteriofágová lambda cos místa. V důsledku toho může dojít ke sbalení plasmidové DNA (nesoucí cizí inserty DNA) in vitro ve fágovém povlaku.

Pod označením "Dalton" se rozumí jednotka hmotnosti, které se obvykle používá ve spojení s rozměry molekul. Tato jednotka odpovídá hmotnosti jednoho atomu vodíku.

Pod označením "ligace DNA" se rozumí tvorba chemické vazby spojující dva fragmenty DNA.

Pod označením "eukaryontní buňky" se rozumějí buňky vyšších organismů, které obsahují jádro obklopené membránou.

Pod označením "shluk genů" (gene cluster) se rozumí skupina genů, které se v chromosomu nacházejí ve fyzické blízkosti.

Pod označením "genom" se rozumí celý soubor chromosomů, tj. celý soubor všech genů jednotlivce.

Pod označením "hybridizace" nebo "hybridizace kolonií" se rozumí technika, které se používá pro identifikaci bakteriálních kolonií nesoucích chimérické vektory, jejichž vložená DNA se podobá určité konkrétní sekvenci.

Pod zkratkou "kb" se rozumí tisíc bázevých párů DNA nebo RNA.

Pod označením "NADH" se rozumí redukovaný nikotinamid-adeninový dinukleotid.

Pod označením "linker" se rozumí krátký syntetický duplexní oligodeoxynukleotid obsahující cílové místo pro jeden nebo více restrikčních enzymů. Zavádí se do vektoru pro vytvoření nového polylinkeru nebo několikanásobného klonovacího místa (MCS).

Pod označením "nukleotid" se rozumí stavební kámen, či monomerní jednotka, nukleových kyselin.

Pod označením "oligonukleotid" se rozumí krátký řetězec nukleotidů.

Pod označením "operon" se rozumí úplná jednotka exprese a regulace bakteriálního genu zahrnující strukturní geny, regulátorové geny a kontrolní prvky v DNA rozpoznatelné produktem nebo produkty regulátorového genu.

Pod označením "plasmid" se rozumí autonomní extrachromosomální kružnicová DNA, která se sama replikuje.

Pod označením "počet plasmidových kopií" se rozumí počet plasmidových molekul udržovaných v bakterii pro každý hostitelský chromosom.

Pod označením "primer" se rozumí krátká sekvence DNA nebo RNA, která vytvoří pár s jedním řetězcem DNA a dodá volný 3'-OH konec, na němž může DNA polymeráza zahájit syntézu deoxyribonukleotidového řetězce.

Pod označením "prokaryotní buňka" se rozumí malá, poměrně jednoduchá buňka. Většina mikroorganismů zahrnuje tyto buňky.

Pod označením "promotor" se rozumí oblast DNA, která je zodpovědná za iniciaci nebo transkripci.

Pod označením "restrikční enzym" se rozumí enzym, který je schopen rozpoznat a rozštěpit specifickou krátkou sekvenci DNA.

Pod označením "sekvence rozpoznávání a restrikce" se rozumí sekvence DNA, která je specificky rozpoznána určitým restrikčním enzymem. Rovněž se označuje názvem "cílové místo".

Pod označením "vektor shuttle" se rozumí bifunkční klonovací vektor, který je schopen se replikovat v jednom nebo více alternativních hostitelích (například E. coli a Streptomyces).

Pod označením "Southern Blotting" se rozumí postup spočívající v přenesení denaturované DNA z agarosového gelu na nitrocelulózový filtr, kde může být hybridizována s komplementární nukleokyselinovou próbou.

Pod označením "subklonování" se rozumí přenášení klonovaných fragmentů DNA z jednoho typu vektoru do jiného, například z rekombinantního košmidu do plasmidu. Nový rekombinantní plasmid se potom transformuje do vhodné hostitelské buňky za vzniku subklonového kmene.

Pod označením "transkripce" se rozumí syntéza RNA z templátové DNA.

Pod označením "transformace bakteriálních buněk" se rozumí získání nových genetických markerů zavedením přídavné DNA.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je způsob výroby nového avermektinu, jehož podstata spočívá v tom, že se za podmínek a ve fermentačním médiu vhodném pro produkci takového nového avermektinu fermentuje *Streptomyces avermitilis*, u něhož byla snížena nebo odstraněna exprese komplexu rozvětvená α -ketokyselina dehydrogenázy, například manipulací, jako delecí, inaktivací nebo nahrazením genů zodpovědných za tuto expresi.

Předmětem vynálezu je dále způsob výroby nového avermektinu, jehož podstata spočívá v tom, že se za podmínek a ve fermentačním médiu vhodném pro produkci takového nového avermektinu fermentuje *Streptomyces avermitilis*, v němž byly vypuštěny nebo inaktivovány geny zodpovědné za expresi komplexu rozvětvená α -ketokyselina dehydrogenázy.

Přehled obr. na výkresech

Na obr. 1 je znázorněna nukleotidová sekvence primerů pro řetězovou reakci katalyzovanou polymerázou (PCR) použitých pro klonování fragmentu genu *S. avermitilis* E1- α BCKDH. Dedukovaná aminokyselinová sekvence kódovaná každým oligodeoxynukleotidem je znázorněna nad odpovídající sekvencí DNA. Šipky ukazují směr amplifikace. Na obr. 1A je znázorněn pravosměrný primer a na obr. 1B levosměrný primer.

Na obr. 2 je uvedeno porovnání sekvencí rozvětvená α -ketokyselina dehydrogenasy. Do vzájemného zákrytu jsou zde vyrovnány dedukované aminokyselinové sekvence PCR-klonovaného genomového fragmentu CD503 pro *Streptomyces avermitilis* (Sa), *Bacillus stearothermophilus* (Bs), *Pseudomonas putida* (Pp) a *Homo sapiens* (Hs). Vertikální značky označují totožnost aminokyselin. Umístění sekvencí odpovídajících pravosměrnému a levosměrnému PCR primeru použitému pro klonování je označeno nahoře nalevo a napravo.

Na obr. 3 je znázorněna genomová restriční mapa, umístění genového shluku *Streptomyces avermitilis* bkd a subklony pro tento shluk. Černé obdélníčky pod mapou označují umístění a orientaci počátečního E1- α -specifického genomového fragmentu CD503 z *S. avermitilis* klonovaného za použití PCR. Jsou zde označeny genomové subklony (deriváty pGEM-3Z). Také je zde uvedeno umístění a organizace strukturních genů bkd kódujících podjednotky E1- α (E1a), E1- β (E1b) a E2 BCKDH. Polarita identifikovaných otevřených čtecích rámců (označených obdélníčky) je zleva doprava. Používá se těchto zkratk: B = BamHI, E = EcoRI, K = KpnI, Bg = BglII a S = SphI.

Na obr. 4A, 4B, 4C, 4D, 4E a 4F jsou uvedeny nukleotidové sekvence a dedukované translační produkty

2 728bp genomového DNA fragmentu z *S. avermitilis* obsahující otevřené čtecí rámce (ORF) E1- α , E1- β a E2 (zčásti) bkd. E1- α ORF leží od polohy 403 do polohy 1548 této sekvence, E1- β ORF leží od polohy 1622 do polohy 2 626 a E2 ORF začíná v poloze 2 626. Nukleotidy jsou číslovány nad řádky sekvence. Stop kodony jsou označeny hvězdičkou. Pravděpodobné Shine-Dalgarnovy ribosomální vazebné sekvence jsou podtrženy. Sekvence rozpoznávané a štěpené restriční enzymem BamHI jsou orámovány.

Na obr. 5 je uvedena nukleotidová sekvence a dedukované translační produkty 0,8kb BglII-SphI genomového DNA fragmentu z *S. avermitilis* (pCD539) obsahujícího část E2 bkd ORF. 251 bp bylo podrobeno sekvenaci, počínaje od místa BglII (je orámováno). Nukleotidy jsou číslovány nad řádky sekvence.

Na obr. 6 je znázorněna nukleotidová sekvence PCR mutagenního (pravosměrného) a univerzálního (levosměrného) primeru použitého pro konstrukci pT7 derivátů pro heterologní expresi genů z *S. avermitilis* bkd v *E. coli*. PCR primerů bylo použito pro zavedení restričního místa NdeI v místě translačního start kodonu otevřeného čtecího rámce E1- α nebo E1- β *S. avermitilis* bkd (dvojice primerů 55 : 31 a 56 : 30). Dedukovaná aminokyselinová sekvence kódovaná každým mutagenním oligodeoxynukleotidem je uvedena nad odpovídající sekvencí DNA. Jsou zde také uvedeny restriční a rozpoznatelné sekvence. Šipkami je znázorněn směr amplifikace. Na obr. 6A jsou znázorněny pravosměrné mutagenní primery a na obr. 6B levosměrné mutagenní primery.

Následuje podrobný popis tohoto vynálezu.

Nové postupy klonování genů *S. avermitilis* bkd a stanovení primární struktury genů kódujících multienzymový komplex *S. avermitilis* BCKDH jsou popsány dále.

Nejprve se zkonstruuji dva PCR primery označené názvy "pravosměrný" a "levosměrný" (viz obr. 1) nad konzervovanými oblastmi identifikovanými ze seřazení několika dedukovaných sekvencí E1- α BCKDH peptidu z různých druhů a dostupných z literatury. PCR produkt o délce přibližně 0,2 kb se deteguje amplifikací genomové DNA z *S. avermitilis* za použití jak pravosměrného, tak levosměrného primeru. PCR-amplifikovaný fragment DNA se potom klonuje do *E. coli* vektoru pGEM-3Z za vzniku rekombinantního plasmidu pCD503. Potom se plasmid pCD503 transformuje do *E. coli* DH5- α kompetentních buněk. Jeden z transformantů se označí jako kmen CD503. Sekvenování DNA klonovaného fragmentu DNA CD503 ukazuje existenci otevřeného čtecího rámce s dedukovaným peptidem, který je vysoce homologický vzhledem k E1- α BCKDH podjednotce (viz obr. 2). Klonovaného fragmentu genomové DNA CD503 se potom použije jako próby pro screening chromosomové knihovny *S. avermitilis* hybridizací kolonií. Jsou identifikovány čtyři kosmidové klony, totiž CD518, CD519, CD520 a CD521. Restriční analýza a analýza Southern Blot ukazuje, že tyto čtyři klony nesou překrývající se genomové fragmenty. DNA sekvenování hnízdových delecí ze subklonovaných genomových DNA fragmentů (jak je to podrobně vysvětleno v příkladu 8) ukazují, že sekvence CD503 je součástí úplného shluku genů bkd. Klonované geny *S. avermitilis* bkd zahrnují oblast chromosomu o délce přibližně 15 kb (viz obr. 3). Analýza sekvence DNA ukazuje přítomnost pravděpodobných transkripčních promotorových sekvencí a strukturních genů BKD uspořádaných do shluku, který je organizován následujícím způsobem: promotorová sekvence, ORF E1- α , ORF E1- β a ORF E2 (viz obr. 4 a 5).

Konečně se úplný shluk genů *S. avermitilis* bkd klonuje za silný promotor T7 z *Escherichia coli* pro expresi v hostiteli *E. coli*. Podobně se také klonují otevřené čtecí rámce pro $E1-\alpha$ a $E1-\beta$, a to buď odděleně nebo dohromady za promotor T7 a každý ze získaných konstruktů se zkouší na expresi. Nové PCR mutagenní primery použité pro zavedení jediného restrikčního místa NdeI na ATG translačním startu ORF $E1-\alpha$ a ORF $E1-\beta$ jsou podrobně popsány v příkladu 9 (viz též obr. 6). Studie s duálním plasmidovým T7 expresním systémem ukazuje, že alespoň dva otevřené čtecí rámce shluku genů ($E1-\alpha$ a $E1-\beta$) z *S. avermitilis* bkd CD503 jsou plně přeložitelné při expresi v *E. coli*. Kromě toho enzymatická stanovení zaměřená na specifickou analýzu složky E1 komplexu BCKDH jednoznačně potvrzují, že dva z rekombinantních klonů *E. coli* (jeden, který nese celý shluk genů bkd, a druhý, který nese společně otevřený čtecí rámec $E1-\alpha$ a $E1-\beta$) obsahují BCKDH-specifickou enzymatickou aktivitu (viz tabulka I).

V tomto popisu se uvádí izolace genů bkd z producentu avermektinu, kterým je *Streptomyces avermitilis*. Genom *streptomyces* je rozměrný (asi 10^4 kb), což je více než dvojnásobek ve srovnání s genomem *Escherichia coli*. Genom *streptomyces* se skládá z DNA s velmi vysokým celkovým obsahem guanosinu a cytosinu (G + C), který činí v průběhu až 73 % a v některých oblastech více než 90 %, což je hodnota blíží se horní mezi pozorované v přírodě. Tyto výrazné charakteristiky vyžadují vývoj rekombinantní DNA techniky specificky přizpůsobené *streptomyces*. Příklady takového úsilí je možno nalézt v patentové přihlášce USA s pořadovým číslem 08/048719, podané 16. dubna 1993 a v patentové přihlášce USA s pořadovým číslem 08/032925 podané 18. března 1993. Uvedené přihlášky jsou zde citovány náhradou za přenesení jejich celého obsahu do popisu tohoto vynálezu.

Jiné techniky, které jsou specificky optimalizovány pro účely tohoto vynálezu, jako je PCR, amplifikace genomové DNA, tvorba hnízdových delecí, sekvenování DNA a heterologická exprese genů *S. avermitilis* bkd v *E. coli*, jsou podrobně popsány v příkladové části tohoto popisu.

Úplný popis experimentálních stupňů prováděných při klonování genů *S. avermitilis* bkd a dosažené výsledky jsou uvedeny dále:

- (a) Identifikace konzervovaných oblastí v podjednotce peptidu E1- α BCKDH, které by mohly sloužit jako potenciální místa pro navázání PCR primerů

Čtyři peptidové sekvence E1- α BCKDH, tj. z člověka (Fisher et al., 1989, J. Biol. Chem. 264:3448-3453), krysy (Zhang et al., 1987.. J. Biol. Chem. 262: 15220-15224), *Pseudomonas putida* (Sokatch et al., 1988, Eur. J. Biochem. 176: 311-317) a *Bacillus stearothermophilus* (Perham et al., 1990, Eur. J. Biochem., 191: 337-346) se seřadí do zákrytu, aby bylo možno identifikovat konzervované oblasti, které by mohly sloužit jako potenciální sekvence pro konstrukci odpovídajících PCR primerů. Počítačová analýza pro identifikaci oblastí podjednotky E1- α , které jsou vysoce konzervovány jak v prokaryontních, tak eukaryontních komplexech BCKDH, se provádí za použití programů LineUp a Pretty z balíku programů pro analýzu GCG sekvence (Madison, WI, USA). Ze seřazení těchto čtyř E1- α BCKDH peptidů je zřejmé, že existuje několik oblastí s prodlouženou homologií (Wexler, I. D., et al., 1991, FEBS Letters, 282: 209-213). Thiaminpyrofosfátový vazebný motiv (Perham et al., 1989, FEBS Letters, 255: 77-82), umístěný mezi humánními E1- α aminokyselinami 182 až 229 a oblast zahrnující fosforylační místa 1 a 2 v rozmezí aminokyselin 245 až 289 jsou pozoruhodně konzervovány ve všech čtyřech analyzovaných peptidech E1- α BCKDH. Také je

zde přítomna již dříve popsaná oblast s vysokou homologií, která leží v rozmezí aminoyseliny 291 až 307. Tato oblast se zdá být jedinečnou pro α -ketokyselina dehydrogenázy, které obsahují jak α -, tak β -podjednotky a není homologická s žádnou sekvencí v *E. coli* PDC E1 nebo ve složkách E1 α -ketoglutarát dehydrogenázových komplexů *E. coli* a kvasinek, což jsou dimery, které se skládají pouze z jediného E1 polypeptidu. Z výše uvedených důvodů se předpokládá, že posledně uvedená oblast homologie bude hrát roli při interakci podjednotky (Patel et al., 1991, FEBS Letters, 282: 209 až 213). Konzervované oblasti zvolené pro konstrukci PCR primeru kódují aminokyselinové zbytky 192 až 200 a 370 až 376 humánního E1- α BCKDH proteinu.

- (b) Konstrukce nových oligonukleotidů vyrobených na konzervovaných oblastech E1- α BCKDH, kterých má být použito jako PCR primeru

Jak již bylo uvedeno výše, při studii seřazení čtyř E1- α BCKDH peptidových sekvencí se zvolí dvě konzervované oblasti. Pravosměrný PCR primer (obr. 1) se zkonstruuje na oblasti zahrnující aminokyseliny 192 až 200 z humánní E1- α BCKDH podjednotky, které se použije jako reprezentativního modelu E1- α BCKDH podjednotky. Tyto aminokyseliny jsou umístěny v thiaminpyrofosfátovém vazebném motivu. Levosměrný PCR primer (obr. 1) se zkonstruuje na oblasti zahrnující aminokyseliny 370 až 376 E1- α BCKDH podjednotky. Posledně uvedená aminokyselinová sekvence je umístěna v blízkosti C-terminální oblasti peptidu. Používá se přiřazení kodonu genu *Streptomyces* (F. Wright a M. J. Bibb, 1992, Gene, 113: 55 až 65). U 5' konce každého primeru je umístěna sekvence rozpoznávaná restrikcí enzymem (*EcoRI* u pravosměrného primeru a *XbaI* u levosměrného primeru), která usnadňuje klonování PCR produktů. Úplná sekvence pravosměrného PCR primeru je

5'-GAATTCGGCGACGGCGCCACCTCCGAGGGCGAC-3'

a úplná sekvence levosměrného PCR primeru je

5'-TCTAGACCGCAGGTGGTCCGGCATCTC-3'.

Sekvence, které nejsou homologické vzhledem k *E. coli* genům, zavedené do primerů pro účely klonování jsou podtrženy (viz obr. 1).

(c) PCR amplifikace fragmentu genomové DNA *S. avermitilis*

Genomová DNA *S. avermitilis* se enzymaticky amplifikuje za reakčních podmínek vhodných pro DNA s vysokým obsahem GC, které umožňují účinnou a specifickou amplifikaci DNA ze streptomycetes (viz příklad 2). PCR se provádí za použití kombinace primerů popsané výše (pravosměrný primer: 5'-GAATTCGGCGACGGCGCCACCTCCGAGGGCGAC-3' a levosměrný primer: 5'-TCTAGACCGCAGGTGGTCCGGCATCTC-3'). Amplifikační produkty se frakcionují podle velikosti elektroforézou na agarosovém gelu. Za PCR podmínek popsaných výše a za použití výše uvedené kombinace primerů se detekuje jediný pás DNA (o délce přibližně 250 bázových párů).

(d) Klonování amplifikovaného fragmentu genomové DNA do klonovacího vektoru *Escherichia coli* a následující transformace do hostitele *E. coli*

Jak již bylo uvedeno výše, do pravosměrného PCR primeru se pro usnadnění klonování zavede restriční místo *EcoRI*, přičemž u 5' konce levosměrného primeru je přítomno restriční místo *XbaI*. Pokusy o klonování 0,25 kb PCR fragmentu za použití ligačního postupu, při němž se jak *in*sert, tak klonovací vektor štěpí *EcoRI* a *XbaI*, však nejsou

úspěšné. Proto se pro klonování 0,25 kb PCR fragmentu pokusně použije alternativního postupu zahrnujícího použití fragmentu Klenow DNA polymerázy I za účelem vytvoření tupých konců ve fragmentu PCR. Po vložení fragmentu s tupými konci do SmaI-linearizovaného *E. coli* vektoru s tupými konci (pGEM-3Z[f+]) se izoluje jediný rekombinantní klon tvořený rekombinantním plasmidem pCD503. Plasmid pCD503 se potom transformací zavede do *E. coli* DH5- α -kompetentních buněk. Zvolený transformant se označí jako kmen CD503. Potvrzující restriční analýza ukazuje, že plasmid pCD503 izolovaný z *E. coli* kmene CD503 skutečně obsahuje 0,25kb inšert z *S. avermitilis*.

- (e) Subklonování 0,25kb PCR-amplifikovaného DNA inšertu do bakteriofágu M13, sekvenování DNA klonovaného fragmentu a identifikace bkd-specifických sekvencí

0,25kb inšert přítomný v plasmidu pCD503 se subklonuje do bakteriofágu M13. Při tom se nejprve inšert uvolní z *E. coli* vektoru štěpením pCD503 pomocí EcoRI a PstI, tj. dvěma restričními enzymy, jimiž rozpoznatelné sekvence jsou přítomny v několikanásobném klonovacím místě vektoru pGEM na obou stranách klonovaného inšertu. Tento specifický fragment se potom klonuje do EcoRI a PstI zpracovaných vektorů M13 mp18 a mp19. Klonování do obou vektorů zajišťuje možnost produkovat jednořetězcovou DNA obou řetězců inšertu DNA pro sekvenování. Jeden klon obsahující specifický inšert vybraný z mp18 transfekčního experimentu se označí jako kmen CD505. Jiný klon, který také obsahuje specifický inšert, ale vybraný z mp19 transfekčního experimentu, se označí jako CD506. Sekvenování DNA se provádí metodou zahrnující terminaci dideoxynukleotidových řetězců. Za použití jednořetězcového DNA templátu a soupravy TaqTrack kit (Promega) ve všech případech se sekvenují oba řetězce DNA, tj. jeden získaný z klonu CD505 a komplementární řetězec získaný z klonu CD506.

Kodonová preferenční analýza (balík software programů GCG Sequence Analysis, Madison, WI, USA) sekvenčních dat získaných z klonů CD505 a CD506 ukazuje přítomnost otevřeného čtecího rámce vykazujícího správné použití v kodonu u genu *streptomycetes*.

Potom se pravděpodobný otevřený čtecí rámec přeloží do aminokyselinové sekvence za použití programů Seq and Translate, IntelliGenetics Suite software (IntelliGenetics Inc. Mountain View, California, USA). Nakonec se provede zjišťování podobnosti zkoumané peptidové sekvence pomocí databanky a programu FASTDB ze software IntelliGenetics. Všechny rešerše v databance, ať již se prohledávají databanky DNA (GenBank a EMBL) nebo proteinové databanky (PIR a Swiss-Prot) neomylně ukazují, že sekvence získaná z klonu CD503 je vysoké homologická, ale nová a odlišná od všech ostatních E1- α BCKDH peptidů uvedených v těchto databankách, ať již se jedná o peptidy prokaryontního nebo eukaryontního původu. Na obr. 2 jsou do vzájemného zákrytu vyrovnány E1- α BCKDH peptidové sekvence z člověka, krysy, *Pseudomonas putida* a *Bacillus stearothermophilus*, a je zde znázorněna nová peptidová sekvence *Streptomyces avermitilis* E1- α BCKDH CD503. Z výše uvedených dat je možno učinit závěr, že 250 bp genomový PCR produkt z *S. avermitilis* klonovaný v *E. coli* kmene CD503 skutečně představuje nový E1- α bkd genový fragment.

(f) Klonování úplného genového shluku z *S. avermitilis* bkd, restrikce a analýza Southern Blot a konstrukce chromozomové mapy

Přibližně 0,25 kb dlouhý BamHI/EcoRI DNA fragment z pCD503 nesoucí E1- α bkd specifickou sekvencí DNA z *S. avermitilis* se použije jako radioaktivně značené próby pro screening genomové ^zkošmidové knihovny *S. avermitilis* pro-

střednictvím hybridizace kolonií. Jsou identifikovány a získány čtyři klony (CD518, CD519, CD520 a CD521). Analýza restrikcí a hybridizací Southern Blot ukazuje, že tyto čtyři klony obsahují překrývající se sekvence pocházející ze stejné chromosomové oblasti. Stejně próby se použije za podmínek vysoké stringence proti Southern blotům štěpené chromosomové DNA z *S. avermitilis* ATCC 31272. Posledně uvedená analýza potvrzuje totožnost těchto klonů získaných z genomové knihovny. Restrikční mapa genomové oblasti obsahující sekvenci *S. avermitilis* CD503 je znázorněna na obr. 3.

- (g) Subklonování genomových DNA fragmentů získaných z klonů CD518 a CD521 a sekvenování DNA z chromosomální oblasti z *S. avermitilis* nesoucí bkd genový shluk

Genomové fragmenty (o délce 1 až 2 kb) pokrývající celou oblast CD503 bkd chromosomu *S. avermitilis* se subklonují z klonů CD521 a CD518 z DNA knihovny do *E. coli* vektoru pGEM-3Z. Seznam subklonů zkonstruovaných během této práce zahrnuje následující krátký popis každého plasmidu: 1. plasmid pCD528 obsahuje 7kb BamHI fragment subklonovaný z pCD518; 2. plasmid pCD545 obsahuje 2,3kb SphI fragment subklonovaný z pCD528; 3. plasmid pCD550 obsahuje 6kb SphI fragment subklonovaný z pCD521; 4. plasmid pCD559 obsahuje 7kb BamHI fragment subklonovaný z pCD521; 5. plasmid pCD574 obsahuje 4,2kb SphI-BglII fragment subklonovaný z pCD550; a plasmid pCD577 obsahuje přibližně 10,4kb insert. Tento insert obsahuje dva znovu spojené sousední genomové fragmenty: 4,2kb SphI/BglII fragment subklonovaný z pCD550 a 6,2kb BglII/BamHI fragment subklonovaný z pCD559. Totožnost každého subklonu se potvrdí pomocí restrikčního mapování, hybridizace Southern a analýzy PCR plasmidu. Pro stanovení nukleotidové sekvence se použije Sangerovy metody terminace řetězců. K tomuto účelu se genomové fragmenty *S. avermitilis* subklonují do bakteriofágů M13mp18 a M13mp19 za

účelem stanovení sekvence obou řetězců DNA. Z pGEM-odvozených klonů uvedených výše se izoluje několik DNA restrikčních fragmentů a ty se ligují do M13mp18 a M13mp19, za vzniku následujících rekombinantních fágů:

CD535: 0,40kb S. avermitilis DNA fragment klonovaný PCR za použití pCD528 DNA jako templátu, specifického primeru 29-PCR-EX (5'-aaGAATTCTCGAGCTGGCCCACAAGGCCGTCGGCTAC-3') a univeršálního primeru 31-PCR-BP (viz příklad 9 a obr. 6). Amplifikovaný fragment se štěpí EcoRI a PstI a klonuje do EcoRI/PstI linearizované M13mp18 DNA.

CD536: podobný DNA fragment, jaký je popsán výše, klonovaný do M13mp19 DNA.

CD537: 1,15kb SalI DNA fragment nesoucí sekvenci CD503 subklonovanou z pCD528 do M13mp18.

CD538: 1,15kb SalI pCD528 DNA fragment (umístěný před 1,15kb SalI fragmentem popsáným výše) klonovaný do M13mp18.

CD539: 1,5kb BamHI/BglIII DNA fragment subklonovaný z pCD550 do M13mp18.

CD540: podobný DNA fragment, jaký je popsán výše, ale klonovaný do M13mp18 s opačnou orientací.

CD541: 0,35kb SalI/BamHI DNA fragment subklonovaný z pCD528 do M13mp18.

CD542: 0,35kb SalI/BamHI DNA fragment subklonovaný z pCD528 do M13mp19.

CD553: 0,8kb BamHI/BglIII DNA fragment subklonovaný z pCD550 do M13mp18.

CD554: 1,1kb BamHI DNA fragment subklonovaný z pCE550 do M13mp18.

CD555: podobný DNA fragment, jako je fragment popsáný výše, ale klonovaný do M13mp18 s opačnou orientací.

CD558: 0,8kb BamHI/HindIII DNA fragment subklonovaný z pCD553 do M13mp19.

CD561: 1,15 kb SalI DNA fragment subklonovaný z pCD537 do M13mp18 (opačná orientace ve srovnání s orientací přítomnou v konstruktě CD537).

CD565: 1,15kb SalI DNA fragment subklonovaný z pCD537 do M13mp19.

CD566: 1,15kb SalI DNA fragment subklonovaný z pCD537 do M13mp19 (opačná orientace než je přítomna v konstruktě CD565).

CD567: 1,15kb SalI DNA fragment subklonovaný z pCD538 do M13mp19.

CD582: 0,8kb BamHI/BglIII DNA fragment subklonovaný z pCD550 do M13mp18 (opačná orientace než je přítomna v konstruktě CD553).

Genomové in^zserty *S. avermitilis* nesené těmito klony se potom zkrátí působením enzymu Exonuclease III za vzniku série subklonů ("hnízdové delece", viz příklad 8).

- (h) Počítačová analýza dat ze sekvenování DNA získaných při analýze klonovaných fragmentů DNA a identifikace otevřených čtecích rámců *S. avermitilis* E1- α , E1- β a E2 bkd

Nukleotidová sekvence 2,7kb genomové oblasti *S. avermitilis* obsahující geny bkd je znázorněna na obr. 4. Klouzavá analýza složení (sliding base composition analysis) 2,7kb genomové oblasti obsahující otevřené čtecí rámce (ORF) *S. avermitilis* E1- α , E1- β a E2 (zčásti) bkd se provede na použití software "DNA Inspector". Tato analýza poskytuje profil zahrnující běžný průměrný obsah (running average) G+C za použití protažené délky (stretch length) 30 bází a přesahové hodnoty (offset value) 20. Celkový obsah G+C odpovídající této oblasti chromosomu *S. avermitilis* je 72 %. Nízká sedlová hodnota "valley" G+C (obsah G+C asi 50 %) indikativní pro promotorovou oblast leží bezprostředně před otevřenými čtecími rámci bkd.

Také se analyzuje obsah G+C v závislosti na poloze kodonu. Otevřené čtecí rámce se detegují za použití programu "CodonPreference" (Genetics Computer Group, Madison, WI, USA) a za použití tabulky "Streptomyces codon usage" pro 64 genů (F. Wright a M. J. Bibb, 1992, Gene, 113: 55 až 65). Program CodonPreference je rámcově specifický hledač genů, který se snaží rozpoznat kódující sekvence proteinu na základě jejich podobnosti s tabulkou kodonových frekvencí nebo na základě kompoziční tendence (obvykle GC) ve 3. poloze každého kodonu. Otevřené čtecí rámce jsou znázorněny jako čtverečky pod grafem příslušných čtecích rámců. Také se detegují všechny start kodony (ATG) a stop kodony (vertikální čárky). Pod každým grafem ORF jsou také označeny vzácné kodony nalezené v každém otevřeném čtecím rámci. Obsah G+C se vypočítá za použití klouzavého okénka (sliding window) 25 kodonů, takže se očekává interval (lag) asi 25 kodonů před kódující oblastí proteinu. Získají se násle-

dující tři profily: 1. první poloha v tripletu; 2. druhá poloha v tripletu a 3. třetí poloha v tripletu. Na základě této analýzy se lokalizují tři otevřené čtecí rámce bkd, které odpovídají následujícím podjednotkám BCKDH: E1- α , E1- β , E2 (obr. 4 a 5).

- (i) Konstrukce nových oligonukleotidů pro použití jako primerů při místně orientované mutagene^zsi na bázi PCR

Pro zavedení restrikčního místa NDEI v počátečním místě translace (ATG) otevřeného čtecího rámce E1- α a E1- β se použije místně orientované mutagene^zse na bázi linkerové nebo PCR techniky. Zkonstruuji se následující nové oligonukleotidy (viz příklad 9 a obr. 6):

Levosměrné univer^zšální (vektorové) primery:

30-PCR-BP: 5'-AAGGATCCTGCAGCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGA-3'

31-PCR-BP: 5'-AAGGATCCTGCAGACAGCTATGACCATGATTACGCCA-3'

Pravosměrné mutagenní primery:

55-PCR: 5'-AAGAGATCTCATATGACGGTCATGGAGCAGCGG-3'

56-PCR: 5'-AAGAGATCTCATATGACCACCGTTGCCCTGAAG-3'

- (j) Místně orientovaná mutagene^zse genů *S. avermitilis* bkd za účelem vytvoření nového restrikčního místa NDEI před otevřeným čtecím rámcem

Jako expresních pla^zsmidů se použije derivátů pla^zsmidu pt7-7 (viz S. Tabor, 1990, Current Protocols in Molecular Biology str. 16.2.1 až 16.2.11, Greene Publishing and Wiley - Interscience, New York) nesoucích otevřené čtecí rámce E1- α , E1- β nebo E1- α + E1- β nebo úplný shluk genů *S. avermitilis* bkd. Restrikční místa NdeI se vytvoří místně

orientovanou mutagenes^z_{*)}í na bázi PCR. Pro tuto studii se zkonstruuje následujících pět expresních plas^z_{**)}midů:

Plas^z_{**)}mid pCD670: derivát pt7-7 nesoucí otevřený čtecí rámec *S. avermitilis* E1- α bkd (ORF1). Do genu *S. avermitilis* E1- α bkd se zavede restriční místo NdeI u start kodonu ATG amplifikací a současnou mutagenes^zí za použití PCR mutagenního primeru 55-PCR (viz příklad 9 a obr. 6).

Plasmid pCD666: derivát pt7-7 nesoucí otevřený čtecí rámec *S. avermitilis* E1- β bkd (ORF2). Do genu *S. avermitilis* E1- β bkd se zavede restriční místo NdeI u start kodonu ATG amplifikací a současnou mutagenesí za použití PCR mutagenního primeru 56-PCR (viz příklad 9 a obr. 6) pro dosažení optimální exprese tohoto otevřeného čtecího rámce se třetí poloha kodonu 7 změni z C na G za vzniku synonymního kodonu podobajícího se kodonu použitému v *E. coli*. Sekvence peptidu E1- β není touto změnou ovlivněna.

Plasmid pCD736: derivát pt7-7 nesoucí společně jak otevřený čtecí rámec E1- α (ORF 1), tak E1- β (ORF 2), kteréžto ORF jsou pod kontrolou T7-promotoru.

Plasmid pCD705: tento plasmid se podobá plasmidu pCD736, ale obsahuje 3' polovinu otevřeného čtecího rámce E1- β ve špatné orientaci. Tohoto konstruktu se používá jako negativní kontroly při experimentální expresi.

Plasmid pCD785: derivát pt7-7 nesoucí úplný shluk genů *S. avermitilis* bkd.

(k) Expresse otevřených čtecích rámců *S. avermitilis* bkd v *E. coli* za použití duálního plasmidového expresního systému T7

*) Dále v textu vždy „mutagenze”.
**) Dále v textu vždy „plazmid”.

Expres genů *S. avermitilis* bkd v *E. coli* se provede za použití duálního plasmidového systému T7 RNA polymeráza/promotor v podstatě, jak je popsán v S. Tabor, 1990 v Current Protocols in Molecular Biology, str. 16.2.1 až 16.2.11, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, USA. Analyzují se deriváty *E. coli* C600 (pGP-1) obsahující odlišné konstrukce pT7-7. Pro monitorování exprese otevřených čtecích rámců z *S. avermitilis* v hostiteli *E. coli* po tepelné indukci se použije elektroforézy na polyakrylamidovém gelu za použití natriumdodecylsulfátu (SDS-PAGE). Analýza metodou SDS-PAGE proteinového profilu po indukci vykazuje nadexpresi indukovaných peptidů, které mají velikost podobnou předvídané hodnotě (na základě dedukce z odpovídající sekvence DNA) pro otevřený čtecí rámec E1- α a E1- β :

	Předvídaná velikost (Da)	Pozorovaná velikost (Da)
ORF1 (E1- α)	41 000	41 000
ORF2 (E1- β)	35 000	34 000

- (1) Detekce aktivity E1 *S. avermitilis* BCKDH pomocí specifického stanovení v surovém extraktu rekombinantního klonu *E. coli*

Výsledky (příklad 11) jsou sumarizovány v tabulce I. E1-specifická stanovení BCKDH prováděná na surových extraktech buněk *E. coli* nesoucích pCD736 vykazují významnou E1-aktivitu po indukci promotoru T7. Podobná kultura nesoucí konstrukt, v němž je část inšertu umístěna ve špatné orientaci (pCD705) vykazuje aktivitu, jejíž úroveň odpovídá pozadí.

Kromě toho enzymatická stanovení ukazují, že surové extrakty z kmene *E. coli* obsahujícího plasmid pCD685 také vykazují významnou aktivitu E1 BCKDH (více než desetinásobnou, vzhledem k úrovni pozadí). Analyzuje se také neindukovaná kultura tohoto klonu, a zjistí se, že základní úroveň aktivity je o dvojnásobek hodnoty pozadí vyšší než hodnota pozadí. Tento výsledek je očekáván, poněvadž o systému T7 je známo, že umožňuje nízkou konstitutivní expresi klonovaných genů i za neindukovaných podmínek.

Klonovaný shluk genů *Streptomyces avermitilis* bkd je užitečný při zlepšování přirozené produkce avermektinu prostřednictvím zvýšení počtu kopií těchto genů nebo optimalizace jejich exprese v produkčních kmenech. Jeden z možných přístupů pro dosažení účinné exprese klonovaných genů bkd zahrnuje vložení těchto genů do mnohakopiového *E. coli*/streptomycetes shuttle vektoru (například plasmidu pCD262, Denoya C. D., 1993, "Novel Bacterial Plasmids Shuttle Vectors for Streptomyces and Escherichia coli" US patentová přihláška č. 08/032,925, podaná 18. března 1993) tak, že jsou geny transkribovány ze silného promotoru. Tento postup zajišťuje účinnou transkripci genů. Kromě toho lze navrhnout určité strategie zaručující účinnou expresi. Tyto strategie zahrnují následující faktory: a) sílu promotoru, b) stabilitu mRNA, c) přítomnost nebo nepřítomnost regulačních faktorů, d) indukovatelnost a e) místně orientovanou mutagenesi pro zlepšení rozpoznání ribosomu a translace signálů iniciace. Expresi genů bkd by také bylo možno optimalizovat nahrazením promotoru divokého typu a regulačních oblastí odlišnými promotory za použití technik výměny genů. V literatuře je uvedeno mnoho příkladů užitečných promotorů, kterých by bylo možno použít pro optimalizaci exprese nových genů *S. avermitilis* bkd popsanych v tomto textu, například silný ermE promotor (Hopwood et al., 1985, "Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual",

The John Innes Foundation, Norwich, Velká Británie) a thio-streptonem indukovatelný tipA promotor (Murakami et al., 1989, J. Bacteriol, 171, 1459-1466). Kromě toho inaktivací bkd genů s průvodní absencí aktivity BCKDH, které se dosahuje vypuštěním místně orientované mutagenese za použití technik výměny genů, se vyvinou zlepšené nevratně blokové kmeny *Streptomyces avermitilis* bkd, které jsou užitečné při produkci nových avermektinů.

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech provedení. Tyto příklady mají výhradně ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádném směru neomezují.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady představují podrobné příklady experimentálních postupů použitých pro klonování a analýzu genů bkd z *S. avermitilis*, které jsou rovněž ilustrovány v přiložených výkresech. Přídavné podrobnosti standardních technik, které jsou dobře známy odborníkům v oboru molekulární biologie a označování specifických enzymů je například popsáno v laboratorní příručce "Molecular Cloning, Maniatis et al. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

P ř í k l a d 1

Příprava genomové DNA z *S. avermitilis*

Mycelium *S. avermitilis* ATCC 31272 se napěstuje v podobě konfluentního porostu na agarovém médiu YPD-2 v průběhu 7 dnů při 29^oC. Toto médium obsahuje:

kvasinkový extrakt Difco	10 g
baktopepton Difco	10 g
dextrósu	5 g

baktoagar Difco	20 g
octan sodný	2 g
MOPS	10 g

hodnota pH přizpůsobena na 7,0
konečný objem: 1 litr
médiu zpracováno v autoklávu 25 minut při 121°C

Narostlého mycélia se potom použije pro inokulaci 30 ml média AS-7 (viz Hafner et al., 1988, evropská patentová přihláška č. 88300353.5, publikační číslo 0 284 176) ve 300ml baňce s narážkami, která se třepe (230 min^{-1}) při 29°C po dobu 24 hodin. Toto médium obsahuje:

modifikovaný škrob ¹	20 g
Ardamin pH ²	5 g
Pharmamedia ³	15 g
uhličitan vápenatý (CaCO_3)	2 g

pH nastaveno hydroxidem sodným na 7,2
konečný objem: 1 litr
médiu zpracováno v autoklávu 25 minut při 121°C

¹ vyrobí se hydrolýzou škrobu působením α -amylázy z *Bacillus licheniformis* do dextrósového ekvivalentu přibližně 40 %

² od firmy Yeast Products Inc., Clifton, NJ 07012, USA

³ od firmy Traders Protein, Memphis, TN 38108, USA.

Přibližně 0,3 ml výše uvedené kultury se použije pro inokulaci další 300ml baňky s narážkami s obsahem 30 ml modifikovaného kapalného média s kvasinkovým a sladovým extraktem (Yeast Extract Malt Extract (YEME) medium) (Bibb, M. J., Freeman, R. F. a D. A. Hopwood, 1977, Mol. Gen. Genetics, 154: 155-166). Modifikované médium YEME obsahuje v 1 litru

kvasinkový extrakt Difco	3 g
baktopepton Difco	5 g
sladový extrakt Oxoid	3 g
sacharo ^{1/2} sa	300 g
gluko ^{1/2} sa	10 g

Médium se 40 minut zpracovává v autoklávu při 121^{1/2}°C a potom se k němu přidají 2 ml 2,5M roztoku hexahydrátu chloridu hořečnatého a výsledný objem se nastaví na 1 litr.

Kultury se nechají růst 48 až 72 hodin při 29^{1/2}°C. Mycelium se oddělí centrifugací a genomová DNA se připraví podle protokolu "Isolation of Streptomyces Total DNA by Cesium Chloride Gradient Centrifugation: Procedure 2", uvedeného v příručce "Genetic Manipulation of Streptomyces, A. Laboratory Manual", The John Innes Foundation, Norwich, Velká Británie, 1985, autoři Dr. D. A. Hopwood et al. Pelety DNA se resuspendují ve 3 ml pufru TE (10mM tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA).

P ř í k l a d 2

Amplifikace genomové DNA z *S. avermitilis* řetězovou reakcí za použití polymera^{1/2}šy

Genomová DNA z *S. avermitilis* se enzymaticky amplifikuje za použití tepelného cyklovače Perkin-Elmer Cetus. Reakce PCR se provádí za použití polymera^{1/2}šy Taq (Perkin-Elmer Cetus) a pufru dodaného výrobcem za přítomnosti 200 µM dNTP, 15% glycerolu, 0,5 µM každého z primerů, 50 ng templátové DNA (v tomto případě genomové DNA z *S. avermitilis*) a 2,5 jednotky enzymu v konečném objemu 100 µl v celkem 30 cyklech. Tepelný profil prvního cyklu je následující: 95^{1/2}°C po dobu 3 minut (denaturační stupeň), 55^{1/2}°C po dobu 2 minut (stupeň tepelné hybridizace) a 72^{1/2}°C po dobu 2

minut (prodlužovací stupeň). Následujících 29 cyklů má podobný tepelný profil, pouze s tím rozdílem, že denaturační stupeň je zkrácen na 1,5 minuty. DNA primery jsou dodány od firmy Genosys Biotechnologies Inc. (Texas, USA). Pravosměrný primer (viz obr. 1) má sekvenci

5'-GAATTCGGCGACGGCGCCACCTCCGAGGGCGAC-3'

a úplná sekvence levosměrného PCR primeru (obr. 1) je

5'-TCTAGACCGCAGGTGGTCCGGCATCTC-3'.

Amplifikační produkty se frakcionují podle velikosti elektroforézou na agarosovém gelu. Vzorek PCR se zpracovává elektroforézou na horizontálním 1,5% agarosovém gelu v 1X TBE pufru (90mM Tris-HCl, pH 8,5, 90mM kyselina boritá, 2,5mM ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)), 1,5 hodiny při 100 V (viz výše uvedená citace Maniatis et al.). Oddělené PCR DNA produkty se na gelu lokalizují barvením ethidium-bromidem a vizualizují jako fluorescentní pásy v ultrafialovém světle 365 nm. Za podmínek PCR uvedených výše a za použití výše uvedené kombinace primerů se detekuje jediný pás DNA (přibližně o délce 250 bp).

P ř í k l a d 3

Klonování 0,25kb PCR-amplifikovaného fragmentu genomové DNA z *S. avermitilis* do vektoru *E. coli* a následující transformace do hostitele *E. coli*

A. Izolace 0,25kb PCR produktu

Jak již bylo uvedeno výše, 0,25kb fragment DNA se amplifikuje PCR za použití genomové DNA z *S. avermitilis* jako templátu a výše uvedené kombinace pravosměrného a levo-

směrného primeru. Jak je zřejmé z obr. 1, pravosměrný primer obsahuje místo rozpoznávané restriční enzymem EcoRI u 5' konce a levosměrný primer obsahuje místo rozpoznávané restriční enzymem XbaI u 5' konce. Pokusy klonovat 0,25kb PCR fragment za použití ligačního postupu, při němž se jak inšert, tak klonovací vektor štěpí EcoRI a XbaI, však nebyly úspěšné. Proto se vyzkouší alternativní pokus klonovat 0,25kb PCR fragment za použití Klenowova fragmentu DNA polymerázy I za vzniku tupých konců v PCR fragmentu. Po amplifikaci, která se provádí způsobem popsaným v příkladu 2 se přibližně 80 µl PCR reakční směsi extrahuje dvakrát směsí fenolu a chloroformu, dvakrát etherem a potom se PCR DNA produkt vysráží ethanolem, jak to bylo popsáno výše. DNA se resuspenduje v 18,5 µl vody, k suspenzi se přidá 2,5 µl 10x translačního pufru "nick" (0,5M Tris-HCl, pH 7,2, 0,1M síran hořečnatý, 1mM dithiothreitol, 500 mg/ml hovězí sérový albumin) (Maniatis et al., výše uvedená citace z roku 1989) a 21 jednotek Klenowova fragmentu E. coli DNA polymerázy I (Boehringer Mannheim Biochemicals) a směs se 5 minut inkubuje při 37°C. Potom se přidá 1 µl 2µM dNTP (2 mM každého ze čtyř dNTP) a reakční směs se dále inkubuje 15 minut při teplotě místnosti. Opravná reakce se zastaví přidáním 1 µl 0,5M kyseliny ethylendiamintetraoctové o pH 8,0 a celá reakční směs se nanese na 1,5% agarosový gel, kde se podrobí elektroforéze. 0,25kb DNA fragment se vizualizuje způsobem popsaným výše a izoluje elektroelucí, která se provádí takto: 0,25kb DNA pás se sejme holicí čepelkou a DNA se izoluje z agarosového gelu 35minutovou elektroelucí při 80 V do jímký tvaru písmene V naplněné 10M octanem amonným za použití jednosměrného elektroelutoru (International Biotechnology Inc. New Haven, CT, USA). Potom se DNA vysráží ethanolem, peletizuje a nakonec znovu rozpustí ve 20 µl DNA pufru (10mM Tris-HCl, 4mM chlorid sodný, 0,1mM EDTA, pH 7,5).

B. Štěpení SmaI a defosforylace plasmidového vektoru pGEM-3Z

Přibližně 1 µg plasmidu pGEM-3Zf(+) (Promega Corp. Madison, WI, USA) a 2 jednotky restriční enzymu SmaI (všechny restriční enzymy byly zakoupeny od firmy Boehringer Mannheim Biochemicals) se inkubují v pufru pro stanovení (specifikovaném dodavatelem) při 25°C po dobu 3,5 hodiny v celkovém reakčním objemu 40 µl. Tak se získají lineární molekuly s tupými konci. Potom se SmaI-linearizovaný vektor defosforyluje za použití alkalické fosfatázy z telecího střeva (CIAP) (zakoupena od firmy Promega Corp. Madison, WI, USA) podle instrukcí dodavatele. Reakční směs se 35 minut inkubuje při 37°C a potom se DNA extrahuje dvakrát stejným objemem směsi fenolu a chloroformu, dvakrát stejným objemem etheru a nakonec se DNA vysráží přidáním dvou objemů absolutního ethanolu. Vysrážená DNA se izoluje 10minutovou centrifugací při 10 000 x g a vysuší se za vakua. Získaná peleta se znovu rozpustí ve 20 µl DNA-pufu.

C. Ligace za vzniku pCD503

Přibližně 10 µl 0,25kb PCR DNA produktu zpracovaného Klenowovým fragmentem a asi 1 µl SmaI-linearizovaného CIAP-defosforylovaného pGEM-3Zf(+) s tupými konci se inkubuje přes noc s 1 jednotkou liga²zy (New England BioLabs, IC, Beverly, MA, USA) za podmínek specifikovaných dodavatelem při 14°C v celkovém reakčním objemu 20 µl. Reakce se ukončí tím, že se mikrozku²mavka, ve které se stanovení provádí, vloží do ledu. Získaných 15 µl reakční směsi se potom použije pro transformaci kompetentních buněk E. coli JM109 za použití standardního postupu popsáno²ho ve výše uvedené citaci Maniatis et al. z roku 1989. Získá se mnoho ampicilin-rezistentních transformantů. Plasmidový vektor p-GEM-3Zf(+) obsahuje segment DNA pocházející z lac operonu Escherichia coli, který kóduje aminotermi²ální fragment β-galaktosida²zy

(Yanisch-Perron, C., Vieira, J. a J. Messing, 1985, Gene, 33, 103). Tento fragment, jehož syntézu je možno indukovat isopropylthio- β -D-galaktosidem (IPTG) je schopen intra-allelové (α) komplementace s defektní formou β -galaktosidašy kódovanou hostitelem. Buňky E. coli po expozici indukčnímu IPTG syntetizují oba fragmenty enzymu a na miskách s médiem obsahujícím chromogenní substrát 5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid (X-gal) vytvářejí modré kolonie. Vložení cizí DNA do polyklonovacího místa plasmidu inaktivuje aminotermiální fragment β -galaktosidašy a ruší α -komplementaci. Bakterie nesoucí rekombinantní plasmidy proto vytvářejí bílé kolonie. Při tomto transformačním pokuse se izolují četné bílé kolonie. Tyto kolonie by měly obsahovat plasmid pCD503. Tato skutečnost se potvrdí následujícím pokusem. Vybere se jedna kolonie, která se označí jako kmen CD503, a podrobí se další analýze. Jediná bakteriální kolonie E. coli kmene CD503 se inokuluje na kapalně médium Luria-Bertani (LB) s obsahem 50 mg/ml ampicilinu za použití standardních mikrobiologických postupů. Použité LB médium obsahuje:

baktotrypton	10 g
bakto-kvasinkový extrakt	5 g
chlorid sodný	10 g
hodnota pH nastavena na 7,0 5N roztokem hydroxidu sodného	
konečný objem roztoku nastaven na 1 liter	
médium sterilizováno v autoklávu 20 minut při 121°C	

Kultura se inkubuje přes noc při 35°C. Následujícího rána se bakteriální buňky sklídí 5minutovou centrifugací při frekvenci otáčení 10 000 min⁻¹ a teplotě 4°C. Plasmidový vektor se izoluje z čerstvě sklizených buněk Escherichia coli CD503 za použití modifikace Birnboimovy a Dolyho metody (Nucleic Acids Res., 1979, 7: 1513); tato modifikace je popsána v Denoya et al., 1985, Microbios Lett.

29: 87. Izolovaná plasmidová DNA se potom rozpustí v DNA pufru (10mM Tris-HCl, 4mM chlorid sodný, 0,1mM kyselina ethylendiamintetraoctová, pH 7,5) na koncentraci přibližně 1 µg pCD503 v 10 µl pufru. Potvrzující restriční analýza za použití restričních enzymů EcoRI a PstI ukazuje, že podle očekávání pCD503 nese 0,25kb inšert DNA.

P ř í k l a d 4

Příprava radioznačených DNA a RNA prób

A. Příprava rovnoměrně značených dvouřetězcových DNA prób

Dvouřetězcové DNA próby se připraví translací "nick" (obecný postup této techniky je popsán v publikaci Maniatis et al. z roku 1989 citované výše). Nejprve se připraví specifický fragment DNA nesoucí cílovou sekvenci vhodným restričním štěpením a tento fragment se purifikuje elektroelucí v podstatě za podmínek uvedených v příkladu 1. Přibližně 1 µg DNA se vždy označí za použití [α - 32 P]dCTP ([α - 32 P]-značená tetra(triethylamoniová) sůl deoxycytidin-5'-trifosfátu), zakoupené od firmy NEN-Dupont, a systému BRL Nick Translation System (výrobek zakoupen od firmy BRL Life Technologies Inc.) podle instrukcí získaných od dodavatele. Obvykle se tato reakce provádí v objemu 50 µl. Po přidání 5 µl Stop pufru (jak je to popsáno v doporučeném postupu od firmy BRL) se značená DNA oddělí od neinkorporovaných nukleotidů pomocí protlačovacího sloupce Stratagene způsobem uvedeným v instrukčním manuálu dodavatele. Těmito postupy se

vždy rutinním způsobem získá 32 P-značená DNA se specifickou aktivitou zaručeně vyšší než 10^8 cpm/µg.

B. Příprava značených jednořetězcových RNA prób

^{32}P -značené RNA próby se připraví in vitro transkripcí za použití transkripčního systému Riboprobe Gemini (Promega). Purifikovaný fragment cílové DNA se klonuje do transkripčního vektoru pGEM-3Z za použití standardních postupů. Příprava templátové plasmidové DNA pro in vitro transkripční reakce se provádí způsobem popsáným v příkladu 3, ale zahrnuje srážecí stupeň za použití polyethylenglykolu (PEG) za účelem selektivního odstranění malých nukleotidů, které by mohly kontaminovat tyto přípravky. Posledně uvedený stupeň se provádí takto: Po stupni srážení ethanolem se peleta resuspenduje v 520 μl vody. K suspenzi se přidá 100 μl 5M roztoku chloridu sodného a 620 μl 13% polyethylenglykolu o molekulové hmotnosti 6 000 až 8 000. Po promíchání se zkumavka jednu hodinu inkubuje na ledu a DNA se peletizuje 15minutovým odstředováním při 10 000 $\times g$ a teplotě 4°C. Získaná peleta se promyje jednou 500 μl 80% chladného ethanolu a potom obvyklým způsobem resuspenduje. Přibližně 1 μg templátové plasmidové DNA se linearizuje za použití restrikčního enzymu SacI nebo HindIII a potom se podrobí in vitro transkripci za použití SP6 nebo T7 bakteriofagová DNA-dependentní RNA polymerasy. Při této reakci se použije [α - ^{32}P]-značené tetra(triethylamoniové) soli cytidin-5'-trifosfátu (CTP), zakoupené od firmy NEN-Dupont. Pracuje se za reakčních podmínek doporučených dodavatelem. Po inkubaci se na reakční směs působí jednou jednotkou RQ1-DNáse (Promega), za účelem degradace DNA templátu, reakční směs se extrahuje dvakrát směsí fenolu a chloformu a potom se produkt standardními technikami srazí ethanolem. Peleta se vysuší a resuspenduje ve 20 μl vody neobsahující RNáse (RNase-free Water, Promega). Malý alikvot značeného RNA transkriptu se analyzuje elektroforézou na polyakrylamid-agarosovém gelu způsobem popsáným v Denoya et al., 1987, J. Bacteriol, 169: 3857 až 3860. Za výše uvedených

podmínek je rutinním způsobem možno získat značené transkripty s úplnou délkou.

P ř í k l a d 5

Analýza genomové DNA z *S. avermitilis* hybridizací Southern

Přibližně 10 µg purifikované genomové DNA z *S. avermitilis* se štěpí 2 jednotkami restriktčního enzymu BamHI při 37°C nejméně po dobu 2 hodin. Na konci štěpení se fragmenty DNA oddělí elektroforézou na 1% agarosovém gelu (viz příklad 1A) a přes noc se přenesou na nylonovou membránu o velikosti pórů 0,45 µm (Schleicherovy a Schuell Nytranovy membrány) za použití kapilární přenosové metody (Southern, E.M. 1975, J. Mol. Biol. 98: 503). Následujícího dne se nylonové membrány zabalí do plastového obalu a ta strana každé membrány, která obsahuje DNA, se exponuje zdroji ultrafialového záření (302 nm), aby se DNA fixovala k membráně. Hybridizace radioznačených RNA a DNA práb k DNA imobilizované na nylonové membráně se provádí podle protokolu popsaného ve výše uvedené publikaci Maniatis et al. z roku 1989. Prehybridizace a hybridizace se provádí při 42°C. Hybridizační roztok obsahuje: 6x SSC (1x: 0,15M chlorid sodný, 15mM citran sodný, pH 7,0), 10x Denhardtovo činidlo (1x: 0,02% ficoll, 0,02% polyvinylpyrrolidon, 0,02% hovězí sérový albumin), 1% SDS (natriumdodecylsulfátu), 100 µg/ml denaturovanou fragmentovanou DNA z lososího sperma, 100 µg/ml *E. coli* tRNA a 50% formamid (Fluka). Hybridizace se provádí přes noc a potom se membrány opláchnou následujícím způsobem: dva oplachy 1 x SSC, 0,1% SDS při teplotě místnosti po dobu 15 minut a 2 oplachy 0,1 x SSC, 0,1% SDS při 42°C po dobu 15 minut. Při některých pokusech se hybridizace provádí při 65°C za nepřítomnosti formamidu a používá se SSPE (1x: 0,18M chlorid sodný, 10mM fosforečnan sodný

(NaPO_4), pH 7,7, 1mM EDTA) místo SSC. Nakonec se membrány exponují na rentgenografický film, by se získal autoradiografický obraz.

P ř í k l a d 6

Klonování 0,25kb genomového fragmentu CD503 z *S. avermitilis* do bakteriofágu M13 a sekvenování DNA

0,25kb fragment DNA CD503 z *S. avermitilis* se klonuje do bakteriofágu M13mp18 M13mp19 za účelem přípravy jednořetězcových rekombinantních DNA pro použití jako templátů při Sangerově dideoxy-sekvenační metodě (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463 až 5467). Asi 2 μg plasmidu pCD503 vyrobeného minipreparačním postupem popsaným výše se štěpí restrikcčními enzymy EcoRI a PstI za účelem uvolnění 0,25kb genomového inšertu *S. avermitilis*. Restrikcční analýza ukazuje, že pCD503 štěpený samotným enzymem EcoRI nebo PstI je lineární. Tato analýza také ukazuje, že 0,25kb inšert neobsahuje specifická místa pro EcoRI nebo PstI. Po štěpení se směs podrobí elektroforéze na 1,2% agarosovém gelu a 0,25kb fragment se podrobí elektroeluci a vysráží se výše uvedeným způsobem. Kromě toho se asi 1 μg každé purifikované dvouřetězcové replikační formy (RF) DNA z M13mp18 a M13mp19 dvojnásobně štěpí EcoRI a PstI, defosforyluje alkalickou fosfatá^zšou z telecího střeva (CIAP) (enzym zakoupen od firmy Promega Corp., Madison, WI, USA) a nakonec liguje k 0,25kb DNA fragmentu způsobem popsaným výše. Purifikované klonovací vektory RF M13 jsou zakoupeny od firmy New England BioLabs. Ligačních směsí se použije pro transfekci kompetentních buněk *E. coli* JM109. Z mp18 a mp19 transfekce se vždy vybere jeden bílý plak, podrobí se fágovému růstu a jednořetězcová DNA se připraví způsobem popsaným ve výše uvedené citaci Maniatis et al. z roku 1989. Sekvenování DNA každého jednořetězcového DNA templátu se

provádí za použití M13-specifického -40 sekvenačního primeru (New England Biolabs, katalogové číslo 1212), deoxyadenosin-5'-(α -thio)trifosfátu, [^{35}C](NEN-Dupont) a sekvenační soupravy TaqTrack (Promega) podle instrukcí dodavatele, tj. Promega. DNA sekvenační data pCD503 *S. avermitilis* genomového fragmentu jsou uvedena na obr. 4.

P ř í k l a d 7

Klonování úplného shluku genů z *S. avermitilis* bkd a sestrojení chromo^zomální mapy

Přibližně 5 μg purifikovaného pCD503 se dvakrát štěpí za použití restriktčního enzymu BamHI a EcoRI. Fragmenty DNA se oddělí elektroforézou na 1,2% agarosovém gelu, elektroelucí se získá přibližně 0,25 kb dlouhý DNA fragment nesoucí sekvenci specifickou pro gen E-1 α z *E. avermitilis* bkd a ten se značí nick translací v podstatě způsobem popsaným výše. Získaného [^{32}P]-značeného DNA fragmentu se potom použije jako próby pro screening genomové košmidové knihovny *S. avermitilis*. Podrobný obecný popis přípravy genomových knihoven je možno nalézt v příručce Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Maniatis et al., (1989). Úplný popis přípravy chromo^zomální knihovny streptomycetes je uveden v příručce Genetic Manipulation of Streptomyces - A Laboratory Manual, Hopwood et al. (1985). Popis košmidového vektoru je možno nalézt v americké patentové přihlášce č. 08/048,719, podané 16. dubna 1993 o názvu "Cosmid Vectors for Streptomyces Genomic DNA Cloning" původce Denoya C. D. Při screeningu více než 2200 rekombinantních klonů v knihovně jsou identifikovány čtyři klony. Tyto čtyři hybridizující klony (označené jako klony *E. coli* CD518, CD519, CD520 a CD521) se nechají růst na LB médiu za ampicilínového selekčního tlaku. Z každé kultury se výše uvedeným způsobem připraví plasmid. Restriktční analýza a hybridi-

zační analýza Southern blot ukazuje, že tyto čtyři klony jsou příbuzné a obsahují překrývající se chromosomové oblasti. Standardními postupy se také získá restriční mapa genomu *S. avermitilis* pokrývající celou chromosomovou oblast včetně sekvence CD503 (tato restriční mapa je znázorněna na obr. 3).

P ř í k l a d 8

Vytvoření hnízdových souborů delečních mutantů pro orientované sekvenování DNA oblasti chromosomu nesoucí shluk genů *bkd* z *S. avermitilis*

Hnízdové soubory delečních mutantů, kterým chybí postupně stále větší počet nukleotidů na jednom nebo druhém konci cílové DNA z *S. avermitilis bkd* se vytvoří za použití enzymu Exonuklease III v podstatě za použití postupů, které se podobají postupům popsaným S. Henikoffem (S. Henikoff, 1987, *Methods Enzymol*, 155:156). Pro vytvoření jednosměrných delečních mutantů se dvouřetězcová DNA každé rekombinantní bakteriofágové M13 replikační formy DNA štěpí dvěma restričními enzymy, přičemž obě obsahují místa štěpení mezi jedním koncem cílové DNA a vazebným místem primeru. Restriční enzym, který štěpí ve větší blízkosti k cílové sekvenci, vytváří tupý konec nebo "zahloubený" 3' konec. Zbývající enzym vytváří "vystupující" 3' konec. Enzym Exonuclease III katalyzuje postupné odštěpování 5' mononukleotidů od zahloubeného nebo tupého 3' hydroxylového konce dvouřetězcové DNA. Vystupující 3' konce jsou však vůči této enzymatické aktivitě úplně rezistentní. Vůči Exonuclease III je tedy susceptibilní pouze jeden konec výsledné lineární DNA a štěpení probíhá jednosměrně od místa štěpení do cílových DNA sekvencí.

Jako příklad je možno uvést popis přípravy hnízdo-
vých delecí pCD565. Plasmid pCD565 je M13mp19 RF derivát
nesoucí 1,15kb SalI fragment, který obsahuje část otevře-
ného čtecího rámce El- α S. avermitilis bkd. Plasmid pCD565 se
purifikuje rovnovážnou centrifugací v gradientu chloridu
cesného a ethidiumbromidu způsobem popsáným ve výše uvedené
publikaci Maniatis et al. z roku 1989. Enzym Exonuclease
III je schopen iniciovat štěpení od jednořetězcových nicků,
takže je důležité použít přípravku obsahujícího méně než 10
% relaxovaných kružnicových molekul. Přibližně 10 μ g
plasmidu pCD565 (viz část zabývající se podrobným popisem
tohoto vynálezu) se dvakrát štěpí restrikcími enzymy SacI a
XbaI při 37 $^{\circ}$ C po dobu 4 hodin, vzniklá směs se extrahuje
směsí fenolu a chloroformu a etherem a potom se výše
uvedeným způsobem produkt srazí ethanolem. Vzniklá peleta se
resuspenduje v 60 μ l reakčního pufru s Exonuclease III (10x
reakční pufr s Exonuclease: 0,66M Tris-HCl, pH 8,0, 66mM
chlorid horečnatý (MgCl₂)). Roztok DNA se potom při 37 $^{\circ}$ C
inkubuje za přítomnosti 300 jednotek Exonuclease III (Ambion
Inc.) a ve 30sekundových intervalech se odebírají 2,5 μ l
aliquoty. Odebrané vzorky se potom inkubují s nukleázou S1 a
aliquoty každého vzorku se analyzuje elektroforézou na agar-
osovém gelu. Vzorky obsahující fragmenty DNA požadované délky
se spojí, DNA se opraví za použití Klenowova fragmentu DNA
polymerázy I, přes noc se provede ligace a potom následuje
transfekce do kompetentních buněk E. coli JM109. Velikost
in²sertu v získaných klonech se analyzuje restrikcí
EcoRI/HindIII a elektroforézou na agarosovém gelu. Pro
sekvenování se vybere 5 klonů: 565-D19 (1,1 kb), 565-D7
(0,88 kb), 565-d24 (0,77 kb), 565-D1 (0,51 kb) a 565-D16
(0,36 kb). Z každého z těchto klonů se pří^ppraví jednořetěz-
cová DNA, která se výše uvedeným způsobem sekvenuje.

P ř í k l a d 9

Sestrojení plasmidů pCD670, pCD666, pCD736 a pCD685 pro použití při expresi genů *S. avermitilis* bkd v *E. coli*

Expresí genů *S. avermitilis* bkd v *E. coli* se provede za použití duálního plasmidového systému T7 RNA polymeráza/promotor v podstatě, jak je popsán v S. Tabor, 1990 v Current Protocols in Molecular Biology, str. 16.2.1 až 16.2.11, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, USA.

A. Sestrojení pCD670 nesoucího otevřený čtecí rámec *S. avermitilis* El- α bkd

Postupem založeným na PCR se do *S. avermitilis* bkd El- α genu zavede restrikční místo pro NdeI oddělující ATG start kodon. Templátem pro PCR je plasmid pCD528, pGEM-3Z derivát nesoucí 7kb *S. avermitilis* genomový inšert obsahující aminotermiální polovinu otevřeného čtecího rámce El- α . Jako primerů se při PCR reakci použije dvou oligonukleotidů (viz obr. 6), kterými jsou

1. levosměrný univerzální (vektorový) primer
31-PCR-BP: 5'-AAGGATCCTGCAGACAGCTATGACCATGATTACGCCA-3',
který mapuje za místem pro HindIII pGEM-3Z MCS (polohy 91 až 114). Na 5' konci tohoto primeru jsou dva zbytky As a dvě restrikční místa (BamHI a PstI) pro usnadnění klonování PCR produktů;

2. mutagenní primer
55-PCR: 5'-AAGAGATCTCATATGACGGTCATGGAGCAGCGG-3',
na jehož 5' konci jsou dva zbytky As, jeden G a dvě restrikční místa (BglII a NdeI). Místo NdeI se překrývá s kodonem ATG iniciátoru otevřeného čtecího rámce El- α .

Řetězová reakce působením polymera^{1,2}sy se provádí výše popsaným způsobem. Reakční produkty se analyzují na elektroforézou na 0,8% agarosovém gelu. PCR-amplifikovaný DNA fragment o správné velikosti (délka asi 1,1 kb) se elektroeluuje, štěpí restričními enzymy NdeI a BamHI a subklonuje do NdeI/BamHI-linearizovaného plasmidu pT7-7, z něhož se ligací a transformací do buněk E. coli DH-5- α získá plasmid pCD663. Přibližně 1 μ g plasmidu pCD663 (připraveného z buněk E. coli kmene CD663 za použití minipreparačního postupu pro plasmid) se linearizuje působením BamHI, defosforyluje a nakonec liguje za přítomnosti asi 0,5 μ g elektroeluovaného purifikovaného 1,1kb BamHI fragmentu izolovaného z reakční směsi po štěpení plasmidu pCD550 působením BamHI, čímž se získá plasmid pCD670. Správná orientace 1,1kb BamHI fragmentu v posledně uvedeném konstrukt²u se určí mapováním míst SalI v in²sertu. Nakonec se plasmid pCD670 zavede do E. coli kmene C600 neso²ujícího plasmid pGP1-2 (plasmid obsahující gen pro T7 RNA polymera^{1,2}su) (viz Tabor, výše uvedená citace z roku 1990). Pro další práci se vybere jeden transformant, který se označí jako CD676.

B. Sestrojení pCD666 neso²ujícího otevřený čtecí rámec S. avermitilis E1- β bkd

Postupem založeným na PCR se do S. avermitilis bkd E1- β genu zavede restriční místo pro NdeI oddělující ATG start kodon. Templátem pro PCR je plasmid pCD574, pGEM-3Z derivát neso²ující 4,5kb S. avermitilis genomový in²sert obsahující otevřený čtecí rámec E1- α . Jako primerů se při PCR reakci použije dvou oligonukleotidů (viz obr. 6), kterými jsou

1. levosměrný univer²zální (vektorový) primer
30-PCR-BP: 5'-AAGGATCCTGCAGCCCAGTCACGACGTTGTAAACGA-3',
který mapuje před místem pro EcoRI pGEM-3Z MCS (polohy 2689 až

2712). Na 5' konci tohoto primeru jsou dva zbytky As a dvě restrikční místa (BamHI a PstI) pro usnadnění klonování PCR produktů;

2. pravosměrný mutagenní primer

56-PCR: 5'-AAGAGATCTCATATGACCACCGTTGCCCTGAAG-3',

na jehož 5' konci jsou dva zbytky As, jeden G a dvě restrikční místa (BglIII a NdeI). Místo NdeI se překrývá s kodonem ATG iniciátoru otevřeného čtecího rámce E1-β.

Řetězová reakce působením polymerázy¹² se provádí výše popsaným způsobem. Reakční produkty se analyzují na elektroforézou na 0,8% agarosovém gelu. PCR-amplifikovaný DNA fragment o správné velikosti (délka asi 1,9 kb) se elektroeluuje, štěpí restrikčními enzymy NdeI a EcoRI a subklonuje do NdeI/EcoRI-linearizovaného plasmidu pT7-7, z něhož se ligací a transformací do buněk E. coli DH-5-α získá plasmid pCD666. Nakonec se plasmid pCD666 zavede do E. coli kmene C600 nesoucího plasmid pGP1-2 (plasmid obsahující gen pro T7 RNA polymerázu¹²) (viz Tabor, výše uvedená citace z roku 1990). Pro další práci se vybere jeden transformant, který se označí jako CD673.

C. Sestrojení pCD736 nesoucího otevřeného čtecího rámce S. avermitilis E1-α a 41-β bkd

Přibližně 2 µg plasmidu pCD670 se linearizují částečným štěpením BamHI. Pro získání lineární formy plasmidu pCD670 se odebírají alikvotní vzorky směsi štěpené BamHI po jedné, třech, pěti, deseti a dvaceti minutách. Alikvoty se podrobí elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu. Lineární forma (o délce asi 4,3 kb) se izoluje elektroelucí a defosforyluje se působením CIAP (viz výše). Potom se polovina defosforylované lineární formy plasmidu pCD670 liguje s 0,8kb BamHI/BglIII fragmentem izolovaným z plasmidu

pCD577. Ligační směsi se použije pro transformaci kompetentních buněk *E. coli* DH5- α . Izoluje se deset klonů, které se analyzují restrikční analýzou plasmidové DNA získané při minipreparačním postupu. Jeden klon označený jako CD736 obsahuje správně uspořádaný plasmid pCD736. Nakonec se plasmid pCD736 zavede do *E. coli* kmene C600 nesoucího plasmid pGP1-2. Pro další práci se zvolí jeden transformant, který se označí jako kmen CD737. Jiný klon označený jako kmen CE705 obsahuje plasmid pCE705 nesoucí 0,8kb BamHI/BglIII fragment v nesprávné orientaci. Konstrukt pCD705 se použije jako negativní kontroly při pokusech o expresi.

D. Sestrojení pCD685 nesoucího shluk genů *S. avermitilis* bkd

Zbývající polovina defosforylované lineární formy plasmidu pCD670 získaná výše uvedeným způsobem částečným štěpením pomocí restrikčního enzymu BamHI se liguje s 7kb BamHI fragmentem izolovaným z plasmidu pCD577. Ligační směs se použije pro transformaci kompetentních buněk *E. coli* DH5- α . Získá se mnoho klonů a 16 z nich se zvolí pro další analýzu. Extrahuje se plasmidová DNA, a ta se analyzuje restrikční analýzou. Jeden z klonů označený jako kmen CD685 obsahuje správně uspořádaný plasmid pCD685. Nakonec se plasmid pCD685 zavede do *E. coli* kmene C600 nesoucího plasmid pCG1-2. Jeden transformant se vybere pro další práci a označí se jak kmen CD687.

P ř í k l a d 1 0

Expresí genů z *S. avermitilis* bkd v *Escherichia coli* za použití duálního plasmidového systému T7

Deriváty *E. coli* C600 (pGP-1) obsahující různé konstrukce pT7-7 (kmeny CD676, CD673, CD737 a CD687) se

nechají růst v 5 ml LB média obsahujícího kanamycin (60 $\mu\text{g/ml}$) a ampicilin (60 $\mu\text{g/ml}$) přes noc při 30 $^{\circ}\text{C}$. Noční kultury se zředí v poměru 1 : 40 (0,25 : 10,00 ml) a převedou do kultivační zkumavky (25 x 150 mm) obsahující čerstvé LB médium s ampicilinem a kanamycinem. Kultura se nechá růst za provzdušňování protřepáváním při 30 $^{\circ}\text{C}$ až do naměřené optické hustoty (OD_{590}) přibližně 0,4. Gen pro T7 RNA polymerázu se indukuje zvýšením teploty na 42 $^{\circ}\text{C}$ na dobu 30 minut, čímž dojde k indukci genů, které jsou pod kontrolou T7 promotoru (jak to popisuje S. Tabor ve výše uvedené publikaci z roku 1990). Nakonec se teplota sníží na 37 $^{\circ}\text{C}$ a buňky se nechají dalších 90 minut růst za protřepávání. Neindukované kontrolní kultury se vždy udržují při 30 $^{\circ}\text{C}$. Proteiny se analyzují elektroforézou na polyakrylamidovém gelu s natriumdodecylsulfátem (SDS) způsobem popsáným v C. D. Denoya et al., 1986, J. Bacteriol. 168: 1133 až 1141. Enzymatická účinnost se analyzuje způsobem popsáným v příkladu 11.

P ř í k l a d 1 1

Stanovení BCKDH aktivity El *S. avermitilis* v surových extraktech rekombinantních kmenů *E. coli*

A. Příprava buněčného lyzátu

Buňky (získané z 8ml kultur) se oddělí centrifugací (5 minut při 5 000 min^{-1} , asi 3 000 x g, za použití rotoru Sorvall SS-34 a chlazení na 4 $^{\circ}\text{C}$) a resuspendují v 5 ml "rozbíjecího pufru" [0,05M pufr na bázi fosforečnanu draselného o pH 7,0 obsahující 3% Tritonu X-100, 15% glycerolu, dithiothreitol (3mM) a trypsinový inhibitor z krůtího vaječného bílku (1 mg/ml), EDTA (5mM) a TPP[thiaminpyrofosfát] (0,04mM)]. Resuspendované buňky se převedou do francouzského lisu a rozbijí se jedním průchodem za tlaku

34,3 MPa. Alikvot o objemu 1,5 ml produktu prošlého lisem se převede do mikrocentrifugační zkumavky a čeří se 30sekundovou centrifugací při frekvenci otáčení $14\,000\text{ min}^{-1}$.

Alikvotu každého supernatantu (100 μl) se použije pro enzymatické stanovení. Koncentrace proteinu se stanoví za použití soupravy pro stanovení proteinu Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA), která je založena na Bratfordově postupu vazby barviva (Bratford, M., Anal. Biochem. 72: 248, 1976).

B. Stanovení E1 komponenty komplexu rozvětvená

α -ketokyselina dehydrogenázy (BCKDH) z *S. avermitilis*

Aktivita BCKDH E1 se stanoví modifikovaným postupem radiochemického stanovení popsaného výše (Chuang D. T., 1988, Methods Enzymol., 166: 146-154 a Hafner E. W. et al., 1995, J. Antibiotics 44: 349). Na dno 15ml skleněné scintilační nádoby se přidá 0,148 ml 0,25M pufru na bázi fosforečnanu draselného o pH 6,5; 0,002 ml 0,1M ethylendiamintetraoctové kyseliny (dvojsodné soli EDTA); 0,004 ml 0,1M chloridu draselného (MgCl_2); 0,02 ml 3,7mM thiaminpyrofosfátu (TPP); 0,02 ml 37mM arženitanu sodného NaAsO_2 ; 0,01 ml 37mM 2,6-dichlorfenolindofenolu (sodná sůl, Sigma D-1878); 0,008 ml α -[1- ^{14}C]ketoišokaproátového zásobního roztoku (vyrobeného dále popsáním způsobem); 0,058 ml vody; a 0,1 ml vyčereného bezbuněčného extraktu. Hrdlo lahvičky se ihned zakryje papírem Whatman 4CHR (Whatman katalogové číslo 3004614), který je napuštěn prostředkem Solvable (tkáňový a gelový solubilizátor zakoupený od firmy NEN-Dupont). Lahvička se potom těsně uzavře plastovým uzávěrem, přičemž jak uzávěr, tak horní polovina lahvičky se obalí parafilmem. Inkubace za mírného protřepávání se provádí 2 hodiny při 30°C . Po skončení inkubace se filtrační papír přeneseme do 7ml skleněné scintilační kyvety obsahující 4 ml kapalného scin-

tilačního koktejlu "Ready Safe" (Beckman) za účelem stanovení radioaktivity.

α -[1- ^{14}C]ketoišokaproátový zásobní roztok se vyrobí tak, že se smíchá 5,6 μl 20mM α -ketoišokaproátu (sodná sůl, Sigma, K-0629), 50 μl α -[1- ^{14}C]ketoišokaproátu (50 mCi/mmol, 50 $\mu\text{Ci/ml}$, Amersham) a dostatečným množstvím vody do celkového objemu 1 ml.

Specifická aktivita E1 složky rozvětvená α -ketokyselina dehydrogenasy se uvádí v pmol oxidu uhličitého uvolněného na minutu na 1 mg proteinu (viz tabulka I).

T a b u l k a I

Aktivita rozvětvená α -ketokyselina dehydrogenasy z E1 *Streptomyces avermitilis* v surových extraktech rekombinantních buněk *E. coli*

Konstrukce	Plasmid	Kmen	Indukce	Specifická aktivita ^{1,2} E1 BCKDH
žádný inšert	pT7-7	CD677	+	0,9
E1-a	pCD670	CD676	- +	0,6 0,8
E1-b	pCD666	CD673	- +	0,5 0,7
E1-[a+b]	pCD736	CD637	- +	2,0 13,7
E1-[a+b] ³	pCD705	CD705	- +	0,9 0,5
E1-[a+b]- E2-E3	pCD685	CD687	- +	2,9 6,0

- ¹ Specifická aktivita složky E1 rozvětvená α -ketokyselina dehydrogenázy je vyjádřena v pmol oxidu uhličitého uvolněného za minutu, vztaženo na 1 mg proteinu.
- ² Výsledky jsou střední hodnoty ze dvou stanovení.
- ³ Tento konstrukt nese C-terminální část E1- β otevřeného čtecího rámce ve špatné orientaci a používá se ho jako negativní kontroly.

Popis sekvencí podle čísel

SEQ ID NO: 1 představuje sekvenci DNA kódující E1- α podjednotku *S. avermitilis* BCKDH. Tato sekvence je také znázorněna na obr. 4 (báze 403 až 1548).

SEQ ID NO: 2 představuje sekvenci DNA kódující E1- β podjednotku *S. avermitilis* BCKDH. Tato sekvence je také znázorněna na obr. 4 (báze 1622 až 2626).

SEQ ID NO: 3 představuje sekvenci DNA, která zahajuje otevřený čtecí rámec kódující aminotermiální oblast E2 podjednotku *S. avermitilis* BCKDH. Tato sekvence je také znázorněna na obr. 4 (báze 2626 až 2727).

SEQ ID NO: 4 představuje sekvenci DNA zahrnující báze 3 až 251 z pCD539. Jedná se o částečnou vnitřní sekvenci genu kódujícího E2 podjednotku *S. avermitilis* BCKDH. Tato sekvence je také znázorněna na obr. 5.

SEQ ID NO: 5 představuje 2728 bp fragmentu genomové DNA *S. avermitilis* znázorněného na obr. 4 a zahrnuje otevřené čtecí rámce E1- α , E1- β a E2 (částečně) podjednotek *S. avermitilis* BCKDH.

SEQ ID NO: 6 představuje aminokyselinovou sekvenci E1- α podjednotky S. avermitilis BCKDH. Tato aminokyselinová sekvence je kódována sekvencí DNA SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 7 představuje aminokyselinovou sekvenci E1- β podjednotky S. avermitilis BCKDH. Tato aminokyselinová sekvence je kódována sekvencí DNA SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 8 představuje aminokyselinovou sekvenci aminoterminální části E2 podjednotky S. avermitilis BCKDH. Tato aminokyselinová sekvence je kódována sekvencí DNA SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 9 představuje aminokyselinovou sekvenci kódovanou sekvencí DNA reprezentovanou bázemi 3 až 251 z pCD539 (SEQ ID NO: 4). Tato aminokyselinová sekvence představuje vnitřní peptidový fragment E2 podjednotky S. avermitilis BCKDH.

SEZNAM SEKVENCÍ

(1) OBECNÉ INFORMACE:

- (i) PŘIHLAŠOVATEL (pro všechny designované státy s výjimkou USA):
 - (A) JMÉNO: Pfizer Inc.
 - (B) ULICE: 235 East 42nd Street, 20th Floor
 - (C) MĚSTO: New York
 - (D) STÁT: New York
 - (E) ZEMĚ: USA
 - (F) PSČ: 10017-5755
- (ii) PŘIHLAŠOVATEL (pouze pro USA):
 - (A) JMÉNO: Claudio D. Denoya
 - (B) ULICE: 80 Spyglass Circle
 - (C) MĚSTO: Groton
 - (D) STÁT: Connecticut
 - (E) ZEMĚ: USA
 - (F) PSČ: 06340
- (iii) NÁZEV VYNÁLEZU: Geny kódující komplex rozvětvená
 α -ketokyselina dehydrogenázy z
Streptomyces avermitilis
- (iv) ADRESA PRO KORESPONDENCI:
 - (A) ADRESÁT: Peter C. Richardson
 - (B) ULICE: Pfizer Inc., 235 East 42nd Street,
20th Floor
 - (C) MĚSTO: New York
 - (D) STÁT: New York
 - (E) ZEMĚ: USA
 - (F) PSČ: 10017-5755
- (v) DATA VZTAHUJÍCÍ SE K TÉTO PŘIHLÁŠCE:
 - (A) ČÍSLO PŘIHLÁŠKY: 08/100,518
 - (B) DATUM PODÁNÍ: 30. července 1993
 - (C) ZATŘÍDĚNÍ:
- (vi) DATA VZTAHUJÍCÍ SE K DŘÍVĚJŠÍ PŘIHLÁŠCE:
 - (A) ČÍSLO PŘIHLÁŠKY: US 08/100,518

- (B) DATUM PODÁNÍ: 30. července 1993
- (vii) INFORMACE O ZÁSTUPCI:
- (A) JMÉNO: Sheyka, Robert F.
 - (B) ČÍSLO LICENCE: 31,304
 - (C) SPISOVÁ ZNAČKA: PC8346
- (viii) INFORMACE O TELEKOMUNIKAČNÍM SPOJENÍ
- (A) TELEFON: (212)573-1189
 - (B) TELEFAX: (212)573-1939
 - (C) TELEX: N/A
- (ix) POČET SEKVENCÍ: 9
- (x) STROJNĚ ČITELNÁ FORMA:
- (A) TYP MEDIA: Disketa
 - (B) POČÍTAČ: IBM PC kompatibilní
 - (C) OPERAČNÍ SYSTÉM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, verze #1.25
- (2) INFORMACE O SEQ ID NO:1:
- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 1 146 bázových párů
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) ŘETĚZCOVOST: dvojitá
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
 - (ii) TYP MOLEKULY: cDNA
 - (iii) HYPOTETICKÁ: ne
 - (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:1:

```
ATGACGGTCA TGGAGCAGCG GGGCGCTTAC CGGCCACAC CGCCGCCCGC CTGGCAGCCC 60
CGCACCGACC CCGCGCCACT GCTGCCCGAC GCGCTGCCCC ACCGCGTCCT GGGCACCGAG 120
GCGGCCGCGG AGGCCGACCC GCTACTGCTG CGCCGCTGT ACGCGGAGCT GGTGCGCGGC 180
CGCCGCTACA ACACGCAGGC CACGGCTCTC ACCAAGCAGG GCCGGCTCGC CGTCTACCCG 240
TCGAGCACGG GCCAGGAGGC CTGCGAGGTC GCCGCCGCGC TCGTGCTGGA GGAGCGCGAC 300
TGGCTCTTCC CCAGCTACCG GGACACCCTC GCCGCCGTCG CCCGCCGCCT CGATCCCGTC 360
CAGGCGCTCA CCCTCCTGCG CGGCGACTGG CACACCGGGT ACGACCCCCG TGAGCACCGC 420
ATCGCGCCCC TGTGCACCCC TCTCGCGACC CAGCTCCCGC ACGCCGTCGG CCTCGCGCAC 480
GCCGCCCGCC TCAAGGGCGA CGACGTGGTC GCGCTCGCCC TGGTCGGCGA CGGCGGCACC 540
AGCGAGGGCG ACTTCCACGA GGCACTGAAC TTCGCCGCCG TCTGGCAGGC GCCGGTCGTC 600
```

TTCCTCGTGC AGAACAACGG CTTCGCCATC TCCGTCCCCG TCGCCAAGCA GACCGCCGCC	660
CCGTCGCTGG CCCACAAGGC CGTCGGCTAC GGGATGCCGG GCCGCCTGGT CGACGGCAAC	720
GACGCGGCGG CCGTGCACGA GGTCTCAGC GACGCCGTGG CCCACGCGCG CGCGGGAGGG	780
GGGCGGACGC TCGTGGAGGC GGTGACCTAC CGCATCGACG CCCACACCAA CGCCGACGAC	840
GCGACGCGCT ACCGGGGGGA CTCCGAGGTG GAGGCCTGGC GCGCGCACGA CCGATCGCG	900
CTCCTGGAGC ACGAGTTGAC CGAACGCGGG CTGCTCGACG AGGACGGCAT CCGGGCCGCC	960
CGCGAGGACG CCGAGGCGAT GGCCGCGGAC CTGCGCGCAC GCATGAACCA GGATCCGGCC	1020
CTGGACCCCA TGGACCTGTT CGCCCATGTG TATGCCGAGC CCACCCCCCA GCTGCGGGAG	1080
CAGGAAGCCC AGTTGCGGGC CGAGCTGGCA GCGGAGGCCG ACGGGCCCCA AGGAGTCGGC	1140
CGATGA	1146

(2) INFORMACE O SEQ ID NO:2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1 005 bázových párů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZCOVOST: dvojitá
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:2:

ATGACCACCG TTGCCCTCAA GCCGGCCACC ATGGCGCAGG CACTCACACG CGCGTTGCGT	60
GACGCCATGG CCGCCGACCC CGCCGTCCAC GTGATGGGCG AGGACGTCCG CACGCTCGGC	120
GGGGTCTTCC GGGTCACCGA CGGGCTCGCC AAGGAGTTCG GCGAGGACCG CTGCACGGAC	180
ACGCCGCTCG CCGAGGCAGG CATCCTCGGC ACGGCCGTCT GCATGGCGAT GTACGGGCTG	240
CGGCCGGTCG TCGAGATGCA GTTCGACGCG TTGCGGTACC CGGCGTTCGA GCAGCTCATC	300
AGCCATGTCT CGCGGGATGC GCAACGCACC CGCGGGGCGA TGCCGCTGCC GATCACCATC	360
CGTGTCCCCT ACGGCGGCGG AATCGGCGGA GTCGAACACC ACAGCGACTC CTCCGAGGCG	420
TACTACATGG CGACTCCGGG GCTCCATGTC GTCACGCCCC CCACGGTCGC CGACGCGTAC	480
GGGCTGCTGC GCGCCGCCAT CGCCTCCGAC GACCCGGTCG TCTTCCTGGA GCCCAAGCGG	540
CTGTACTGGT CGAAGGACTC CTGGAACCCG GACGAGCCCG GGACCGTTGA ACCGATAGGC	600
CGCGCGGTGG TGCGGCGCTC GGGCCGGAGC GCCACGCTCA TCACGTACGG GCCTTCCCTG	660

```

CCCGTCTGCC TGGAGGCGGC CGAGGCGGCC CGGGCCGAGG GCTGGGACCT CGAAGTCGTC      720
GATCTGCGCT CCCTGGTGCC CTTCGACGAC GAGACGGTTG TCGCGCTCGG TCGCGGGACC      780
GGACGCGCCG TCGTCGTGCA CGAGTCGGGT GGTACGGCG GCGCGGGCGG GGAGATCGCC      840
GCGGGCATCA CCGAGCGCTG CTCCACCAT CTGGAGGCGC CGGTGCTGCG CGTCGCCGGG      900
TTCGACATCC CGTATCCGCC GCCGATGCTG GAGCGCCATC ATCTGCCCCG TGTCGACCGG      960
ATCCTGGACG CGGTGGGGCG GCTTCAGTGG GAGGCGGGGA GCTGA                        1005

```

(2) INFORMACE O SEQ ID NO:3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 102 bázových párů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZCOVOST: dvojitá
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:3:

```

ATGGCCCAGG TGCTCGAGTT CAAGCTCCCC GACCTCGGGG AGGGCCTGAC CGAGGCCGAG      60
ATCGTCCGCT GGCTGGTGCA GGTGCGCGAC GTCGTGGCGA TC                        102

```

(2) INFORMACE O SEQ ID NO:4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 249 bázových párů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZCOVOST: dvojitá
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:4:

```

ATCTCCCTCA TCGCGCTGCT CGCCAGGATC TGCACCGCCG CACTGGCCCG CTCCTCCGAG      60
CTCAACTCCA CCGTCGACAT GGACGCCCCG GAGGTCGTAC GGCTCGACCA GGTGCACCTG      120
GGCTTCGCCG CGCAGACCGA ACGGGGGCTC GTCGTCCCGG TCGTGCGGGA CGCGCACGCG      180
CGGGACGCCG AGTCGCTCAG CGCCGAGTTC GCGCGGCTGA CCGAGGCCCG CCGGACCGGC      240
ACCCTCACA                                     249

```

(2) INFORMACE O SEQ ID NO:5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 2 728 bázových párů

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) ŘETĚZCOVOST: dvojitá

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:5:

GTCGACGCGG GCTCCGAAAC CGCGGATCAC GCCGTCGTCG ATGAGCCCGGT TGATTGCGGC	60
GTAGGCATTG GCACGCGACA CGTGGGCGCG CTCGGCCACG GACCGTATCG AGGCGCGGCC	120
GTCCGCCTGG AGCATCTGGA GGATGTCCTG ATCGATGGCG TCCAGCGGGC GGGCGGGCGG	180
CAGGGGTACC CCGGGCTCCG CTCCCTCGGC CATTGTTCG GGTGCCATGT CCTCCGGCCT	240
CCTTACCATG GACGTAGTGC GTTCATTCCA GGCTGTGGAG AACCGTTTGT CCACAGCCTG	300
ACGGTGCCTG TAGCCAAAAT GTGCCGACGA CCGAACAATC GGTAGGTGAG GCGCCTCACA	360
CCCGTGGCGC GCCCAAAGCC GCTCCCACGA GGAGGTGCCG TCATGACGGT CATGGAGCAG	420
CGGGGCGCTT ACCGGCCCCAC ACCGCCGCCG GCCTGGCAGC CCCGCACCGA CCCCAGGCCA	480
CTGCTGCCCCG ACGCGCTGCC CCACCGCGTC CTGGGCACCG AGGCGGCCGC GGAGGCCGAC	540
CCGCTACTGC TCGCGCCGCT GTACGCGGAG CTGGTGCGCG GCCGCCGCTA CAACACGCAG	600
GCCACGGCTC TCACCAAGCA GGGCCGGCTC GCCGTCTACC CGTCGAGCAC GGGCCAGGAG	660
GCCTGCGAGG TCGCCGCCGC GCTCGTGCTG GAGGAGCGCG ACTGGCTCTT CCCCAGCTAC	720
CGGGACACCC TCGCCGCCGT CGCCCGCGGC CTCGATCCCG TCCAGGCGCT CACCCTCCTG	780
CGCGGCGACT GGCACACCGG GTACGACCCC CGTGAGCACC GCATCGCGCC CCTGTGCACC	840
CCTCTCGCGA CCCAGCTCCC GCACGCCGTC GGCCTCGCGC ACGCCGCCCG CCTCAAGGGC	900
GACGACGTGG TCGCGCTCGC CCTGGTCCGC GACGGCGGCA CCAGCGAGGG CGACTTCCAC	960
GAGGCACTGA ACTTCGCCGC CGTCTGGCAG GCGCCGGTCG TCTTCCTCGT GCAGAACAAC	1020
GGCTTCGCCA TCTCCGTCCC GCTCGCCAAG CAGACCGCCG CCCCCTCGCT GGCCCACAAG	1080
GCCGTCGGCT ACGGGATGCC GGGCCGCCTG GTCGACGGCA ACGACGCGGC GGCCGTGCAC	1140
GAGGTCCTCA GCGACGCCGT GGCCACGCG CGCGCGGCAG GGGGGCCGAC GCTCGTGGAG	1200
GCGGTGACCT ACCGCATCGA CGCCACACC AACGCCGACG ACGCGACGCG CTACCGGGGG	1260
GACTCCGAGG TGGAGGCCTG GCGCGCGCAC GACCCGATCG CGCTCCTGGA GCACGAGTTG	1320
ACCGAACGCG GGCTGCTCGA CGAGGACGGC ATCCGGGCCG CCCGCGAGGA CGCCGAGGCC	1380
ATGGCCGCGG ACCTGCGCGC ACGCATGAAC CAGGATCCGG CCCTGGACCC CATGGACCTG	1440
TTCGCCCATG TGTATGCCGA GCCCACCCCC CAGCTGCGGG AGCAGGAAGC CCACTTGCGG	1500
GCCGAGCTGG CAGCGGAGGC CGACGGGCCC CAAGGAGTCG GCCGATGAAG AGAGTTGACC	1560

ATCGGGCCCC GAGAAGCGGG CCGATGACCT CCGTTGGCCT TTGGCCGGAA GGAGCCGGGC 1620
 GATGACCACC GTTGCCCTCA AGCCGGCCAC CATGGCGCAG GCACTCACAC GCGCGTTGCG 1680
 TGACGCCATG GCCGCCGACC CCGCCGTCCA CGTGATGGGC GAGGACGTCG GCACGCTCGG 1740
 CGGGGTCTTC CGGGTCACCG ACGGGCTCGC CAAGGAGTTC GGCGAGGACC GCTGCACGGA 1800
 CACGCCGCTC GCCGAGGCAG GCATCCTCGG CACGGCCGTC GGCATGGCGA TGTACGGGCT 1860
 GCGGCCGGTC GTCGAGATGC AGTTCGACGC GTTCGCGTAC CCGGCGTTTC AGCAGCTCAT 1920
 CAGCCATGTC GCGCGGGATG CGCAACGCAC CCGCGGGGCG ATGCCGCTGC CGATCACCAT 1980
 CCGTGTCCCC TACGGCGGCG GAATCGGCGG AGTCGAACAC CACAGCGACT CCTCCGAGGC 2040
 GTACTACATG GCGACTCCGG GGCTCCATGT CGTCACGCCC GCCACGGTCG CCGACGCGTA 2100
 CGGGCTGCTG CGCGCCGCCA TCGCCTCCGA CGACCCGGTC GTCTTCCTGG AGCCCAAGCG 2160
 GCTGTACTGG TCGAAGGACT CCTGGAACCC GGACGAGCCG GGGACCGTTG AACCGATAGG 2220
 CCGCGCGGTG GTGCGGCGCT CGGGCCGGAG CGCCACGCTC ATCACGTACG GGCCTTCCCT 2280
 GCCCCGTCTGC CTGGAGGCGG CCGAGGCGGC CCGGGCCGAG GGCTGGGACC TCGAAGTCGT 2340
 CGATCTGCGC TCCCTGGTGC CCTTCGACGA CGAGACGGTT GTGCGCGTCG GTGCGCGGAC 2400
 CGGACGCGCC GTCGTCGTGC ACGAGTCGGG TGGTTACGGC GGCCCCGGCG GGGAGATCGC 2460
 CGCGGGCATC ACCGAGCGCT GCTTCCACCA TCTGGAGGCG CCGGTGCTGC GCGTCGCCGG 2520
 GTTCGACATC CCGTATCCGC CGCCGATGCT GGAGCGCCAT CATCTGCCCG GTGTGACCG 2580
 GATCCTGGAC GCGGTGGGGC GGCTTCAGTG GGAGGCGGGG AGCTGATGGC CCAGGTGCTC 2640
 GAGTTCAAGC TCCCCGACCT CGGGGAGGGC CTGACCGAGG CCGAGATCGT CCGCTGGCTG 2700
 GTGCAGGTCG GCGACGTCGT GGCGATCG 2728

(2) INFORMACE O SEQ ID NO:6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 381 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZCOVOST: jednoduchá

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:6:

Met Thr Val Met Glu Gln Arg Gly Ala Tyr Arg Pro Thr Pro Pro Pro
 1 5 10 15

Ala Trp Gln Pro Arg Thr Asp Pro Ala Pro Leu Leu Pro Asp Ala Leu
20 25 30

Pro His Arg Val Leu Gly Thr Glu Ala Ala Ala Glu Ala Asp Pro Leu
35 40 45

Leu Leu Arg Arg Leu Tyr Ala Glu Leu Val Arg Gly Arg Arg Tyr Asn
50 55 60

Thr Gln Ala Thr Ala Leu Thr Lys Gln Gly Arg Leu Ala Val Tyr Pro
65 70 75 80

Ser Ser Thr Gly Gln Glu Ala Cys Glu Val Ala Ala Ala Leu Val Leu
85 90 95

Glu Glu Arg Asp Trp Leu Phe Pro Ser Tyr Arg Asp Thr Leu Ala Ala
100 105 110

Val Ala Arg Gly Leu Asp Pro Val Gln Ala Leu Thr Leu Leu Arg Gly
115 120 125

Asp Trp His Thr Gly Tyr Asp Pro Arg Glu His Arg Ile Ala Pro Leu
130 135 140

Cys Thr Pro Leu Ala Thr Gln Leu Pro His Ala Val Gly Leu Ala His
145 150 155 160

Ala Ala Arg Leu Lys Gly Asp Asp Val Val Ala Leu Ala Leu Val Gly
165 170 175

Asp Gly Gly Thr Ser Glu Gly Asp Phe His Glu Ala Leu Asn Phe Ala
180 185 190

Ala Val Trp Gln Ala Pro Val Val Phe Leu Val Gln Asn Asn Gly Phe
195 200 205

Ala Ile Ser Val Pro Leu Ala Lys Gln Thr Ala Ala Pro Ser Leu Ala
210 215 220

His Lys Ala Val Gly Tyr Gly Met Pro Gly Arg Leu Val Asp Gly Asn
225 230 235 240

Asp Ala Ala Ala Val His Glu Val Leu Ser Asp Ala Val Ala His Ala
245 250 255

Arg Ala Gly Gly Gly Pro Thr Leu Val Glu Ala Val Thr Tyr Arg Ile
260 265 270

Asp Ala His Thr Asn Ala Asp Asp Ala Thr Arg Tyr Arg Gly Asp Ser
275 280 285

Glu Val Glu Ala Trp Arg Ala His Asp Pro Ile Ala Leu Leu Glu His
290 295 300

Glu Leu Thr Glu Arg Gly Leu Leu Asp Glu Asp Gly Ile Arg Ala Ala
305 310 315 320

Arg Glu Asp Ala Glu Ala Met Ala Ala Asp Leu Arg Ala Arg Met Asn
325 330 335

Gln Asp Pro Ala Leu Asp Pro Met Asp Leu Phe Ala His Val Tyr Ala
340 345 350

Glu Pro Thr Pro Gln Leu Arg Glu Gln Glu Ala Gln Leu Arg Ala Glu
355 360 365

Leu Ala Ala Glu Ala Asp Gly Pro Gln Gly Val Gly Arg
370 375 380

(2) INFORMACE O SEQ ID NO:7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 334 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) ŘETĚZCOVOST: jednoduchá

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:7:

```

Met Thr Thr Val Ala Leu Lys Pro Ala Thr Met Ala Gln Ala Leu Thr
1          5          10          15
Arg Ala Leu Arg Asp Ala Met Ala Ala Asp Pro Ala Val His Val Met
20          25          30
Gly Glu Asp Val Gly Thr Leu Gly Gly Val Phe Arg Val Thr Asp Gly
35          40          45
Leu Ala Lys Glu Phe Gly Glu Asp Arg Cys Thr Asp Thr Pro Leu Ala
50          55          60
Glu Ala Gly Ile Leu Gly Thr Ala Val Gly Met Ala Met Tyr Gly Leu
65          70          75          80
Arg Pro Val Val Glu Met Gln Phe Asp Ala Phe Ala Tyr Pro Ala Phe
85          90          95
Glu Gln Leu Ile Ser His Val Ala Arg Asp Ala Gln Arg Thr Arg Gly
100         105         110
Ala Met Pro Leu Pro Ile Thr Ile Arg Val Pro Tyr Gly Gly Gly Ile
115         120         125
Gly Gly Val Glu His His Ser Asp Ser Ser Glu Ala Tyr Tyr Met Ala
130         135         140
Thr Pro Gly Leu His Val Val Thr Pro Ala Thr Val Ala Asp Ala Tyr
145         150         155         160
Gly Leu Leu Arg Ala Ala Ile Ala Ser Asp Asp Pro Val Val Phe Leu
165         170         175
Glu Pro Lys Arg Leu Tyr Trp Ser Lys Asp Ser Trp Asn Pro Asp Glu
180         185         190
Pro Gly Thr Val Glu Pro Ile Gly Arg Ala Val Val Arg Arg Ser Gly
195         200         205
Arg Ser Ala Thr Leu Ile Thr Tyr Gly Pro Ser Leu Pro Val Cys Leu
210         215         220
Glu Ala Ala Glu Ala Ala Arg Ala Glu Gly Trp Asp Leu Glu Val Val
225         230         235         240
Asp Leu Arg Ser Leu Val Pro Phe Asp Asp Glu Thr Val Val Arg Val
245         250         255

```

Gly Ala Arg Thr Gly Arg Ala Val Val Val His Glu Ser Gly Gly Tyr
 260 265 270

Gly Gly Pro Gly Gly Glu Ile Ala Ala Gly Ile Thr Glu Arg Cys Phe
 275 280 285

His His Leu Glu Ala Pro Val Leu Arg Val Ala Gly Phe Asp Ile Pro
 290 295 300

Tyr Pro Pro Pro Met Leu Glu Arg His His Leu Pro Gly Val Asp Arg
 305 310 315 320

Ile Leu Asp Ala Val Gly Arg Leu Gln Trp Glu Ala Gly Ser
 325 330

(2) INFORMACE O SEQ ID NO:8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 34 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) ŘETĚZCOVOST: jednoduchá
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:8:

Met Ala Gln Val Leu Glu Phe Lys Leu Pro Asp Leu Gly Glu Gly Leu
 1 5 10 15

Thr Glu Ala Glu Ile Val Arg Trp Leu Val Gln Val Gly Asp Val Val
 20 25 30

Ala Ile

(2) INFORMACE O SEQ ID NO:9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 83 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) ŘETĚZCOVOST: jednoduchá

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:9:

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

~~75K~~
~~PV 2000-2929~~
~~176823~~

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby nových avermektinů, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že se za podmínek a ve fermentačním médiu vhodném pro produkci takových nových avermektinů fermentuje Streptomyces avermitilis, u něhož byla snížena nebo odstraněna exprese komplexu rozvětvená α -ketokyselina dehydrogenázy^{1,2} delecí, inaktivací, nahrazením nebo jinou manipulací genů zodpovědných za tuto expresi.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že geny, které jsou vypuštěny, inaktivovány, nahrazeny nebo jinak manipulovány, jsou geny enhanceru, inhibitoru, aktivátoru nebo represoru.

3. Způsob výroby nových avermektinů podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se za podmínek a ve fermentačním médiu vhodném pro produkci takových nových avermektinů fermentuje Streptomyces avermitilis, v němž byly vypuštěny nebo inaktivovány geny zodpovědné za expresi komplexu rozvětvená α -ketokyselina dehydrogenázy^{1,2}.

~~01-2203-00-Ma~~

~~K~~