

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Gen und Genprodukt eines in seiner Struktur und multivalenten Funktionalität neuen Schlüsselenzyms, welches die letzte Stufe der Biosynthese von Penicillin G und Penicillin V katalysiert, in gereinigter und isolierter Form.

Bereits 1953 beobachtete Kato (J. Antibiot. Ser. Tokyo 6, 130-136, 1953) in precursorlosen Penicillinfermentationen eine Akkumulierung des Penicillinnukleus. Dieses β -Lactam wurde später von Batchelor et al. (Nature 183, 257-258, 1959) isoliert und als 6-Aminopenicillansäure (6-APA) identifiziert. 6-APA wird besonders in precursorlosen Penicillinfermentationen angehäuft. Erickson und Bennett (Appl. Microbiol. 13, 738-742, 1965) betrachteten 6-APA als Nebenmetaboliten, der durch enzymatische 7-Desacylierung von Isopenicillin N in Abwesenheit von Phenyl- oder Phenoxyessigsäure als Precursor entsteht bzw. durch enzymatische Spaltung der natürlichen hydrophoben Penicilline gebildet wird. Später konnte nachgewiesen werden, daß die letzte Stufe der Penicillinbiosynthese in einem Austausch der L- α -Aminoadipinsäureseitenkette von Isopenicillin N gegen Phenyl- oder Phenoxyessigsäure besteht, wobei die Seitenkettensäuren als Acyl-Coenzym A-Verbindungen in die Reaktion eintreten. Ein Enzym, das diesen Acyltransfer katalysiert, wurde von Loder (Postepy Hig. Med. Dosw. 26, 493-500, 1972) in Rohextrakten von *P. chrysogenum* nachgewiesen und als Penicillinacyltransferase (PAT) bezeichnet. Dieses Enzym wird in allen penicillinbildenden Pilzen gefunden und ist intrazellulär lokalisiert. Die Arbeiten von Fawcett et al. (Biochem. J. 151, 741-746, 1975) bestätigen die Transacylierung von Isopenicillin N zu Penicillin G mit Enzym-Rohextrakten aus *P. chrysogenum* in Gegenwart von Phenylacetyl-Coenzym A.

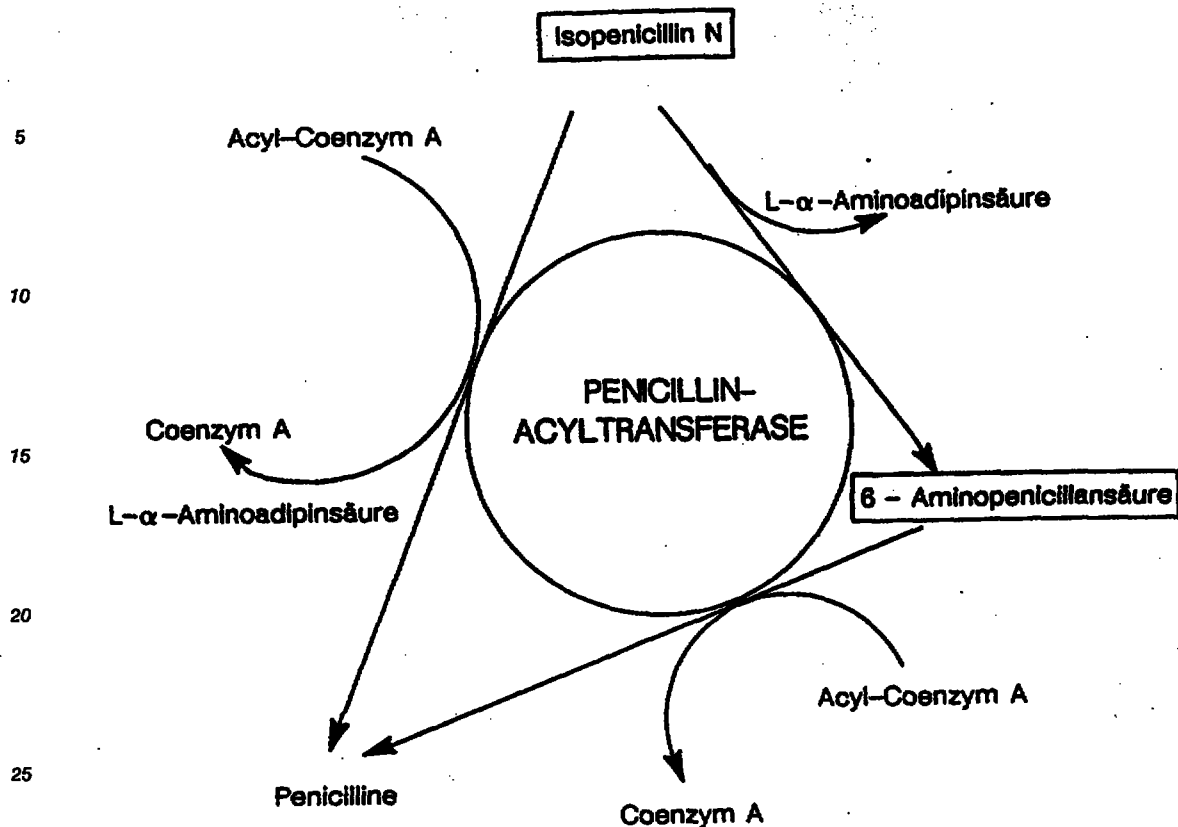
Die Bedeutung der PAT für die Biosynthese von Penicillin G oder V ist durch die Beobachtungen von Brunner et al. (Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 95-103, 1968), Spencer (Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 170-175, 1968), Gatenback und Brunsberg (Acta Chem. Scand. 22, 1059-1061, 1968), Spencer und Maung (Biochem. J. 118, 29-30, 1970), Meesschaert et al. (J. Antibiotics 33, 722-730, 1980), Kogekar et al. (Indian J. of Biochem. and Biophys. 20, 208-212, 1983), Frederiksen et al. (Biotechn. Letters 6, 549-554, 1984), Abraham (in Regulation of Secondary Metabolite Formation, Kleinkauf et al., eds., Proceedings of the 16th Workshop Conferences Hoechst, Gracht Castle, 12.-16.5.85, Vol. 16, Weinheim, p. 115-132, 1986), Luengo et al. (J. Antibiotics 39, 1565-1573 sowie 1754-1759, 1986) sowie Alvarez et al. (Antimicrob. Agents and Chemotherapy 31, 1675-1682, 1987) erhärtet. Das thiolabhängige Enzym kann auch den Acyltausch innerhalb verschiedener Penicilline katalysieren und ist in Penicillinstämmen mit hoher Syntheseleistung im vermehrten Maße gegenüber niedrig produzierenden Stämmen anzutreffen (Pruess und Johnson, J. Bact. 94, 1502-1508, 1967).

Die vorliegende Erfindung betrifft die Isolierung, Charakterisierung und Aufklärung der Sequenz von Gen und Genprodukt dieses wichtigen Biosyntheseenzym, womit wesentliche Voraussetzungen für gentechnologische Arbeiten sowohl in Richtung Titersteigerung als auch in Richtung Hybrid- bzw. Mutasyntese bzw. Erschließung neuer enzymatischer β -Lactam-Transformationswege gegeben sind.

Die Proteinsequenzierung ist nach Laursen, Methods Enzymology 25, 344-359 (1972) bekannt. Ebenfalls ist es heute Stand der Technik, die für Proteine kodierenden Gene zu lokalisieren (Rothstein et al., Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. XLV, 99-105, 1981) und zu sequenzieren (Maxam and Gilbert, Methods Enzymology 65, 499-560, 1980). Das gezielte Ankoppeln eines Gens an einen starken, gegebenenfalls induzierbaren Promotor ist nach Pribnow, Biolog. Regulation and Development. Bd.1, 231-277, Plenum Press No.4 (Goldberger et al., 1979) bekannt.

Mehrere Enzyme der β -Lactambiosynthese wurden bereits in reiner Form isoliert und strukturmäßig charakterisiert. Ebenfalls wurden die kodierenden Genregionen mehrerer dieser Enzyme inzwischen isoliert, sequenziert, in entsprechende, für die Transformation geeignete Expressionsvektoren eingebaut und kloniert (z.B. die Isopenicillin N Synthetase aus *Cephalosporium acremonium*: Samson et al., Nature 318, 191-194, 1985; Baldwin et al., J. Antibiotics 40(5), 652-659, 1987; EP 200 425, Eli Lilly, 1985; die Isopenicillin N Synthetase aus *Penicillium chrysogenum*: Carr et al., Gene 48, 257-266, 1986; EP 225 128, Eli Lilly, 1985; die Expandase aus *Cephalosporium acremonium*: Samson et al., Biotechn. 5, 1207-1214, 1987; sowie mehrere, die β -Lactambiosynthese katalysierende Enzyme aus *Streptomyces clavuligerus*: EP 233 715, Beecham, 1986). Die erste mit solchen Expressionsvektoren durchgeführte Transformation eines β -Lactam produzierenden Mikroorganismus ist ebenfalls bereits beschrieben (Skatrud et al., Curr. Genet. 12(5), 337-348, 1987).

Die PAT, welche den letzten Schritt in der Penicillinbiosynthese, nämlich die Transacylierung von Isopenicillin N. bzw. dessen Spaltung zu 6-APA sowie deren Acylierung zu Penicillin nach folgendem Reaktionsschema



katalysiert, wurde in penicillinproduzierenden Pilzstämmen bereits früher (siehe oben) nachgewiesen und in
 30 ihrer multivalenten katalytischen Funktionalität beschrieben, konnte jedoch bisher infolge ihrer extremen
 Instabilität nicht nachweisbar rein isoliert und strukturmäßig charakterisiert werden. Die in penicillinbildenden
 Stämmen von *Penicillium chrysogenum* zwischen 40 und 100 Stunden Fermentationsdauer vermehrt gebildete,
 hoch instabile und leicht saure, thiolabhängige PAT katalysiert einerseits den Acyltransfer von
 35 Coenzym A aktivierten fermentativen Seitenketten (z.B. Acyl-Coenzym A-Verbindungen der hydrophoben
 Precursorsubstanzen Phenoryessigsäure, Phenylessigsäure, Hexansäure, Octansäure usw.) auf natürliche
 Penicilline (z.B. Isopenicillin N, Penicillin V, Penicillin G, 6-APA usw.), sowie andererseits zwischen
 natürlichen Penicillinen untereinander, d.h., bei dem über einen Acylenzymkomplex laufenden Acyltransfer
 fungieren die natürlichen Penicilline sowohl als Acyldonator wie auch als Acylakzeptor, während die
 40 Coenzym A aktivierten hydrophoben Precursorverbindungen nur als Acyldonator in die enzymatische
 Reaktion eintreten können. Da der Acyltransfer im wässrigen Milieu stattfindet, konkurriert auch Wasser als
 Nucleophil mit dem Acylenzymkomplex, wobei die energiereichen Acyldonatoren einfach hydrolytisch
 gespalten werden. Daher findet man im Kulturbrei von Penicillinfermentationen immer auch 6-APA, den β -
 Lactamkern der natürlichen Penicilline.

Der Nachweis der PAT kann mit üblichen Analysenverfahren, wie radioaktiven, mikrobiologischen oder
 45 chromatographischen Testmethoden, durchgeführt werden. So wurden z.B. für die Bestimmung der 6-APA-
 Phenoxyacetyl-Coenzym A-Acyltransferaseaktivität der PAT, welche die enzymatische Reaktion



50 katalysiert, folgende drei verschiedenen Testmethoden ausgearbeitet:

- Nachweis von Penicillin V über mikrobiologischen Agardiffusionstest mit spezifisch produktsensitiven Teststämmen, z.B. hat *Micrococcus luteus* ATCC 9341 gegenüber Penicillin eine um mehr als drei Zehnerpotenzen größere antibakterielle Sensitivität als gegenüber 6-APA.
- Bei Einsatz von S 35-markierter 6-APA (enzymatisch aus S 35-Penicillin G) Nachweis des extrahierbaren S 35-Penicillin V im β -Counter.
- Nachweis des extrahierten Penicillin V mittels HPLC.

Die enzymatische Transacylierungsreaktion erfolgt in Mikrotiterplatten mit folgendem Ansatzschema:

6-APA (2,5 mg/ml im Reaktionspuffer)	20 µl
PaCoA (ca. 15-20 mg/ml in Wasser bidest.)	30 µl
Enzym bzw. Reaktionspuffer (0,1 M Phosphatpuffer pH 7,8 inkl. 1 mM DTT)	150 µl

5

Sofort bzw. zu verschiedenen Zeiten innerhalb einer einstündigen stationären Inkubation werden vom Ansatz jeweils 20 µl Aliquots entnommen, in derselben Mikrotiterplatte 1:5 mit 50% wäßrigem Ethanol (= Stoppen der Enzymreaktion) bzw. 1:5 mit 5 U/ml Penicillinase (= β -Lactamkontrolle) verdünnt und im Agardiffusionstest auf mit *Micrococcus luteus* ATCC 9341 bzw. mit dem lactamsupersensitiven Stamm

10 *Pseudomonas aeruginosa* BC 248 beimpften Testplatten (Einsaat 0,5%, Antibiotic Medium 1 von DIFCO, 50 µl pro Näpfchen, Bebrütung 15 Stunden bei 37 °C) gegen Penicillin V getestet.

Zu verschiedenen Zeiten werden vom enzymatischen Transacylierungsansatz (gleicher Ansatz wie oben mit 2 ml Gesamtvolumen) Aliquots entnommen, 1:1 mit Diisopropylether bei pH 2,0 (HCl) extrahiert, die organische Phase mit Stickstoff abgedampft, der Rückstand im gleichen Volumen Reaktionspuffer resuspendiert und über HPLC (Bedingungen wie bei der PaCoA Gehaltsbestimmung, nur als Eluens 40% Methanol und 60% 0,01 M TBAS in 0,025 M Phosphatpuffer pH 7,0) auf Penicillin V getestet.

15

Retentionszeiten (min)	Phenoxyessigsäure	1,10
	Penicillosäure G	1,62
	Penicillosäure V	1,92
	Penicillin G	3,00
	Penicillin V	4,92
	3-Desacetoxycephalosporin V	2,46
	Cephalosporin V	3,24

20

25

Die anderen Aktivitäten des multispezifischen PAT-Enzyms können ebenfalls über HPLC bestimmt werden, wobei als Eluens für die polaren Substrate bzw. Produkte 0,01 M TBAS in 0,025 M Phosphatpuffer pH 7,0 alleine Verwendung findet.

30

Retentionszeiten (min)	Isopenicillin N	1,67
	6-APA	4,00
	DTT red.	2,41
	DTT oxid.	4,60

35

Isopenicillin N kann aus precursorlosen Penicillinfermentationen über Adsorberharz (DIAION-HP 20) und Reverse Phase Chromatographie (Nucleosil C 18, 10 µm) gewonnen werden.

Je nach Enzympräparation ist dabei besonders auf die Wahl der Indikatorreaktion zu achten, mit der die eigentliche Aktivität des multispezifischen Biosyntheseenzymen erfaßt werden soll. So ist es beispielsweise nicht besonders zielführend, als Indikatorreaktion für die PAT im Rohextrakt die 6-APA-Phenoxyacetyl-Coenzym A Acyltransferase-Aktivität zu verwenden, da in dieser rohen Enzympräparation anwesende Störaktivitäten sowohl Phenoxyacetyl-Coenzym A (= PaCoA) und Penicillin V rasch hydrolysieren als auch 6-APA mit dem energiereichen Seitenkettenderivat PaCoA zu Penicillin V acylieren, was z.B. auch bekannte proteolytische Enzyme wie Chymotrypsin katalysieren. Diese interferierenden Aktivitäten unterscheiden sich jedoch deutlich von der eigentlichen thiolabhängigen PAT. Sie zeigen z.B. ein anderes chromatographisches Elutionsverhalten, Stabilitätsprofil und Inhibierungsmuster. Diese interferierenden Störaktivitäten erklären einerseits die bisher in Rohpräparationen gefundenen sehr niedrigen spezifischen PAT-Aktivitäten (um 1-10 µU/mg Protein) sowie ebenfalls den als paradox erscheinenden Befund, daß die 6-APA-PaCoA-Acyltransferaseaktivität im Rohextrakt mit zunehmender Enzymverdünnung bis zu einem Aktivitätsmaximum stark ansteigt. Ein essentieller Faktor im Nachweis der PAT ist die Anwesenheit von reduzierenden Verbindungen, wie Dithiothreitol oder β -Mercaptoethanol, welche des hoch oxidationsempfindliche SH-Enzym aktivieren bzw. stabilisieren.

40

45

50

Die hohe Temperaturinstabilität der PAT erschwert die Enzymreinigung ebenfalls wesentlich. So verliert z.B. eine frisch hergestellte Enzympräparation trotz Anwesenheit von verschiedenen Stabilisatoren (z.B. 5 mM Dithiothreitol + 5% Sorbit + 0,1 mM Phenylmethansulfonylfluorid) nach einstündiger stationärer Inkubation bei 37 °C die gesamte thiolabhängige 6-APA-PaCoA Acyltransferaseaktivität. Es ist daher angebracht, alle Reinigungsarbeiten in einem Arbeitskühlraum bei 4 °C unter Oxidationsschutz durchzuführen.

55

ren. Grob vorgereinigte Enzymlösungen können über mehrere Wochen in Anwesenheit der Stabilisatoren ohne merklichen Aktivitätsverlust eingefroren (-196°C , -20°C) werden, wobei jedoch mehrere Einfrier-Auftauschritte die PAT-Aktivität sofort vollständig deaktivieren. Ammonsulfatpräzipitate sind ebenfalls einige Tage bzw. Wochen bei 4°C in Anwesenheit der genannten Stabilisatormischung mehr oder minder stabil.

Das in der Erfindung angewandte Reinigungsverfahren der PAT liefert, ausgehend von jungem, penicillinpositivem *Penicillium*-Myzel, nach Myzelauflösung, Nukleinsäurefällung, Proteinfällung, hydrophober Interaktions- und Affinitätschromatographie relativ stabile, mindestens 50%ige, aktive Enzympräparationen, wie sie für die enzymkinetische bzw. proteinchemische Charakterisierung notwendig sind. Die Aufarbeitung bis zur relativ lagerfähigen Proteinpräzipitation kann mit üblichen Reinigungsverfahren durchgeführt werden, z.B. durch Zellaufschluß mit einem Hochdruckhomogenisator oder Glaskugelmühle bzw. die Nukleinsäurefällung mit Cetyltrimethylammoniumbromid, Streptomycinsulfat oder Protaminsulfat. Für die Proteinfällung eignet sich u.a. Ammonsulfat, wobei eine 50%ige Sättigung ausreicht, um die gesamte nachweisbare PAT-Aktivität zu präzipitieren. Vom Ammonsulfatpräzipitat ausgehend, wird die thiolabhängige PAT an Phenylsepharose Cl 4 B über hydrophobe Interaktion gebunden und nach Entfernung von über 90% des Ballastproteins mit einer wäßrigen Stabilisatorlösung niedriger Ionenstärke eluiert, über eine 10 kD cut off Ultrafiltrationsmembran konzentriert und vorzugsweise über Affinitätschromatographie bzw. alternativ nach einem Gelfiltrationsschritt (Ultrogel Aca 54) über Anionenaustauscher-(DEAE-Sephadex FF) bzw. Adsorptionschromatographie (Hydroxylapatit) bis zu einer mindestens 50%igen aktiven Enzympräparation weitergereinigt, was einem Anreicherungsfaktor von ca. 1000, bezogen auf das Ammonsulfatpräzipitat, entspricht.

Als Affinitätsmatrix können übliche makroporöse Trägermaterialien wie Sepharose, Zellulose, Polymermaterialien, stabilisiertes Kieselgel, Aluminiumoxid usw. eingesetzt werden. Als Affinitätsliganden, welche über einen C_2 bis C_{10} -Spacer bzw. ohne Spacer kovalent oder durch hydrophobe bzw. ionogene Wechselwirkung an den Träger gebunden werden, eignen sich vorzugsweise Acyl- bzw. Amino- β -lactamverbindungen. Die Bindung dieser Liganden an den Spacer bzw. die Matrix muß derart erfolgen, daß die Bindungsstelle am Liganden für das zu reinigende Enzym zugänglich bleibt. Erfindungsgemäß zeigen besonders Affinitätsmatrices mit terminalen Amino-Spacern wie AH-Sephadex 4 B bzw. HMD-Ultrogel Aca 34, an die über N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin (EEDQ) Liganden wie natürliche Penicilline, vorzugsweise 6-APA, Penicillin V oder Penicillin G bzw. analoge stabile 3-Desacetoxycephalosporinverbindungen wie 7-Amino-3-desacetoxycephalosporansäure (7-ADCA) bzw. 7-Phenoxyacetamido- oder 7-Phenylacetamido-3-desacetoxycephalosporansäure (3-Desacetoxycephalosporin V und G) gebunden werden, einen besonders starken Reinigungseffekt. Die Amino- β -lactamaffinitätsmatrices können dabei ohne aufwendige Schutzgruppentechnologie mit löslicher Penicillin G-Acylase von *E. coli* aus den entsprechenden Phenylacetamido- β -lactammatrices hergestellt werden.

Die benötigten Mikroorganismen werden für die Enzymproduktion in üblichen Nährmedien für die Penicillinbildung herangezogen. Als Nährmedienbestandteile eignen sich alle Substrate, die ganz allgemein zur Züchtung von Pilzen verwendet werden. Zusätzlich zu diesen Nährstoffen kann man in geeigneter Kombination jene Additive verwenden, die das Wachstum der Mikroorganismen fördern und die PAT-Aktivität steigern. Additive sind z.B. Magnesiumsulfat, Natriumchlorid, Calciumcarbonat, Phosphate und ähnliche anorganische Salze sowie Wachstumsstoffe, Vitamine und Spurenelemente. Durch Zusatz verschiedener Induktoren, vorzugsweise Phenoxy- bzw. Phenyllessigsäure und derer Derivate oder Analoge, können die erzielten Enzymtitel erheblich gesteigert werden.

Die Anzucht erfolgt vorwiegend submers unter aeroben Bedingungen bei einer Temperatur im Bereich von 15 bis 35°C und einem pH-Wert zwischen 4 und 8. Die Zeit, in der die Kulturbrühe die maximale Enzymaktivität erreicht, hängt von der Art des verwendeten Mikroorganismus ab, und die optimale Zeit für die Kultivierung ist daher vorzugsweise für jeden einzelnen Stamm getrennt zu bestimmen. Im allgemeinen liegt die Kultivierungsdauer im Bereich von vorzugsweise 2 bis 5 Tagen. Für die Transacylierung kann man die Kulturbrühe bzw. ein daraus bereitetes aktives Sekundärpräparat einsetzen. Beispiele für solche aktive Sekundärpräparate sind die aus der Kulturbrühe gewonnenen und gewaschenen, nativen bzw. permeabilisierten Zellen; zellfreie Extrakte, die man durch physikalische, chemische und enzymatische Behandlung des Myzels erhält (beispielsweise die Zellhomogenate, die man durch Aufschluß oder durch Ultraschallbehandlung des Myzels erhält, und Zellysate, die man durch Behandlung mit oberflächenaktiven Substanzen oder Enzymen bildet); teilweise oder vollständig gereinigte Präparate des gewünschten Enzyms, die man durch Reinigen der zellfreien Extrakte mit Hilfe üblicher Enzymreinigungsmethoden erhält, beispielsweise durch Aussalzen, durch fraktionierte Fällung, durch Dialyse, durch Gelfiltration, durch Ionenaustausch-, Adsorptions- und durch Affinitätschromatographie; stabilisierte PAT-Präparate, die man dadurch erhält, daß man das Enzym bzw. die nativen bzw. permeabilisierten Zellen entweder physikalisch oder chemisch mit

wasserunlöslichen hochmolekularen Trägersubstanzen durch Adsorption, Kovalentbildung, Quervernetzen, Einschluß oder Einkapseln immobilisiert.

Die enzymkinetische bzw. physikochemische Charakterisierung der oben resultierenden Enzymkonzentrate kann mit klassischen Methoden wie Chromatographie, Elektrophorese, Untersuchungen hinsichtlich Substratspezifität, N-terminale Sequenzierung, pH- und Temperaturprofil für Aktivität und Stabilität, Aktivierungs-, Inhibierungs- und Stabilisierungsstudien usw. durchgeführt werden.

Für die Isolierung von Genen existieren zahlreiche Methoden. Einen allgemeinen Überblick dazu geben die Bücher von Watson et al. (Rekombinierte DNA - Eine Einführung, Heidelberg, 1983) und Winnacker (Gene und Klone - Eine Einführung in die Gentechnologie, Weinheim, 1984). Im Falle des pat-Gens (Gen für das Enzym PAT) scheint es am sinnvollsten, synthetische DNA-Sonden zu verwenden, da die dazu notwendigen Aminosäuresequenzen vorliegen. Dazu kann man aus der Aminosäuresequenz des Polypeptides 1 der PAT eine DNA-Sequenz auf Grund des genetischen Kodes ableiten und die entsprechenden Oligonukleotide chemisch synthetisieren. Abbildung 5 zeigt die Anordnung der Aminosäureresten 2 bis 22 des Polypeptides 1 der PAT. Da einigen Aminosäuren 2, 3, 4 oder 6 Kodons zugeordnet werden, ergibt sich eine Nukleotidsequenz, wie sie unter der Aminosäuresequenz angegeben ist. Der Abschnitt, der den Aminosäureresten 16 bis 21 entspricht, wäre z.B. gut geeignet, da hier nur 16 verschiedene Gensequenzen möglich sind. Diese 16 Oligonukleotide, welche der RNA komplementär sind, kann man als vier Gemische mit je vier Oligonukleotiden synthetisieren (Oligonukleotidgemische 1, 2, 3 und 4 in Abbildung 5). Eine sichere Identifizierung des Gens ist mit diesen Oligonukleotiden vermutlich nicht möglich, da im Genom von *Penicillium chrysogenum* weitere DNA-Sequenzen vorkommen, die diesen DNA-Sequenzen sehr ähnlich sind. Eine Unterscheidung dieser unterschiedlichen DNA-Sequenzen kann methodisch sehr aufwendig sein. Deshalb ist es ratsam, über ein weiteres Oligonukleotid als Suchsequenz zu verfügen.

Die Strategie, Gene mit Hilfe von DNA-Sonden zu isolieren, wird von Lathe (J. Mol. Biol. 183, 1-12, 1985) diskutiert. Sind z.B. Informationen über die Häufigkeit bestimmter Kodons oder bestimmter Dinukleotidfolgen bekannt, kann eine längere DNA-Sequenz synthetisiert werden. Für *Penicillium chrysogenum* sind solche Informationen nicht verfügbar. Um trotzdem ein längeres Oligonukleotid als Sonde zu erhalten, kann man die vorhandenen Oligonukleotide als Sequenzierprimer verwenden: Das Enzym Reverse Transcriptase kann einen DNA-Strang synthetisieren, der zu einer vorgegebenen RNA komplementär ist, aber nur dann, wenn ein geeignetes Startermolekül (= Primer) vorhanden ist. Im beschriebenen Fall können als Primer die Oligonukleotidgemische 1 bis 4 eingesetzt werden. Dadurch wird es möglich, nur die pat mRNA zu sequenzieren, obwohl zahlreiche andere mRNAs in der Präparation vorhanden sind. Die Sequenzierreaktion wird in Gegenwart von basenspezifischen Kettenabbruch-Reagentien durchgeführt (Dideoxynucleosid-Triphosphate). Dadurch entstehen zahlreiche verlängerte Oligonukleotide, deren gelelektrophoretische Analyse es erlaubt, die Basenabfolge einer DNA zu ermitteln, die zur pat mRNA komplementär ist. Der Vorteil dieser Methode ist, daß die erhaltene Sequenzinformation erlaubt, direkt neue Oligonukleotide zu synthetisieren. Zusätzlich ist es sehr bedeutsam, daß diese Sequenz mit der Sequenz, die aus der Aminosäuresequenz abgeleitet wird, übereinstimmen muß und so absichert, daß tatsächlich eine pat-spezifische Sequenz vorliegt.

Die eigentliche Isolierung des Gens kann dann aus einer Genbank erfolgen. Eine Genbank ist eine Sammlung rekombinanter DNA-Vektoren, die jeweils einen kleinen Teil der DNA von *Penicillium chrysogenum* enthalten (im Falle einer λ -EMBL3-Genbank sind dies je rekombinantem Molekül ca. 0.05%). Mittels Plaquehybridisierung kann man λ -Klone isolieren, die mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisieren. Von der DNA dieser Klone kann eine physikalische Karte angefertigt werden. Eine solche Restriktionskarte gibt die Anordnung von Restriktionsendonucleas-Schnittstellen an, die als Orientierungshilfe dienen können. Durch DNA-Hybridisierungstechniken läßt sich ermitteln, mit welchem Teilbereich der DNA die DNA-Sonden hybridisieren. Die entsprechenden Teilfragmente werden in Plasmid- oder Bakteriophagen-Vektormoleküle eingebaut und mit molekulargenetischen Methoden weiter charakterisiert. Die Einklonierung eines DNA-Segmentes in den Vektor M13mp19 erlaubt dann die Bestimmung der DNA-Sequenz, wobei die pat-spezifische DNA-Sonde als Primer verwendet werden kann. Eine weitere Sequenzierung der DNA erlaubt es, den kodierenden Anteil des Gens und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz der PAT zu ermitteln. Die bereits bestimmten Aminosäure-Teilsequenzen können die dazu erforderliche Information liefern.

Das pat-Gen aus *Penicillium chrysogenum* kann auf Grund der DNA-Sequenzinformation in einen Expressionsvektor eingebaut werden, der eine gute Expression der PAT in gut bekannten Expressionsorganismen erlaubt (Reznikoff und Gold, Maximizing Gene Expression, Boston, 1986). Um eine präzise Konstruktion zu ermöglichen, bei der das ATG genau in die Position des E.coli Startkodons kommt, kann man durch ortsspezifische ("site directed") Mutagenese eine NcoI-Schnittstelle einführen. Vorher muß jedoch ein vollständiger cDNA-Klon aus einer entsprechenden Genbank isoliert werden. Beispiel 19 (siehe

auch Abbildung 7) beschreibt die Details der Konstruktion des Plasmides pBC2001. Dazu wird zunächst das DNA-Fragment aus einem pat-cDNA-Klon in M13mp19 kloniert. Damit steht eine einzelsträngige DNA zur Verfügung, die für die ortsspezifische Mutagenese zur Einführung der NcoI-Schnittstelle verwendet wird; außerdem eine HindIII-Schnittstelle, die für die Klonierung nötig ist. Das Plasmid pBC2001 entsteht, wenn man das NcoI-HindIII-Fragment in den Vektor pKK233-2 einbaut. Es enthält effektive Signale für die Expression in E.coli (ptac, rrnBT1T2) und ein Ampicillin-Resistenzgen (bla), als E.coli-Selektionsmarke.

Die DNA des pat-Gens kann in Vektoren eingebaut werden, die eine Transformation von *Penicillium chrysogenum* oder von anderen β -lactamproduzierenden Mikroorganismen erlauben. Da Transformanten häufig die eingebrachte DNA in mehreren Kopien enthalten (z.B. Kolar et al.), ist eine stärkere Expression des Gens möglich, die zu einer gesteigerten Penicillinbildung führen kann. Im Beispiel 20 ist die Konstruktion des Plasmides pBC2002 beschrieben, das zur Transformation von *Penicillium chrysogenum* verwendet werden kann. pBC2002 (siehe auch Abbildung 8) enthält das vollständige *Penicillium chrysogenum* pat Gen auf einem 4,8kb Sall Restriktionsfragment, das in den modifizierten Vektor pHs103 eingebaut wurde. Das Phleomycin-Resistenzgen (ble) erlaubt die Selektion in *Penicillium chrysogenum*; das Ampicillin-Resistenzgen (bla) die Selektion in E.coli.

Weiterhin ist die Manipulation der DNA möglich. So kann der Austausch von Promotorabschnitten ebenfalls die Transkription in *Penicillium chrysogenum* verbessern. Eine ortsspezifische ("site directed") Mutagenese des ATGs kann die Translation in *Penicillium chrysogenum* steigern. Der Austausch spezieller Aminosäurereste durch ortsspezifische oder fragmentspezifische - dann jedoch ungerichtet, aber genspezifisch - Mutagenese kann es ermöglichen, spezielle Mutanten zu isolieren, welche die Stabilität des Enzyms oder seine Aktivität oder Spezifität verändern.

Auch ein Screening von zufällig oder nicht-zufällig ausgewählten Mikroorganismen - bei dem die DNA solcher Organismen auf die spezifische Hybridisierung mit radioaktiver pat-DNA untersucht wird - ist eine naheliegende Nutzung des isolierten DNA-Abschnittes. Das Ergebnis eines solchen Screenings können Stämme sein, die bisher nicht bekannte β -Lactame produzieren, oder Stämme, die PAT-ähnliche Enzyme enthalten, die aber andere Eigenschaften aufweisen.

Die DNA der vorliegenden Erfindung wurde aus *Penicillium chrysogenum* isoliert. Die Vorgangsweise ist in den Beispielen 10 bis 13 beschrieben und durch die Abbildungen 4,5 und 6 illustriert. Ausgehend von der Aminosäuresequenz des Polypeptides 1 der PAT (Abb. 5) wurden vier Oligonukleotide synthetisiert (Abb. 5: Oligonukleotidgemische 1 bis 4, Abb. 6 C), die als Sequenzierprimer verwendet werden (Beispiel 11). Die ersten 29 Basen der so ermittelten Sequenz (Abb. 6 D) stimmen mit der postulierten pat mRNA-Sequenz überein (Abb. 6 B). Auf Grunde dieser Information wurde ein 30mer synthetisiert (Abb. 6 E), das als radioaktive Sonde zur Isolierung eines λ -Klons aus der *Penicillium chrysogenum* Genbank (Beispiele 12 und 13) verwendet wurde. Nach einer Subklonierung in M13-Vektoren wurde die DNA sequenziert (Abb. 6 F). Die ersten 77 Basen dieser Sequenz stimmen mit den Basen 35 bis 111 der zur mRNA komplementären Sequenz (Abb. 6 D) überein. Die Zusammenhänge zwischen diesen einzelnen Sequenzen demonstrieren, daß tatsächlich das pat-Gen isoliert wurde.

Die PAT hat ein Molekulargewicht von ca. 38.000 D. Aus einem mittleren Aminosäure-Molekulargewicht von 110 D läßt sich für den kodierenden Anteil des Gens eine Größe von 1100 bp schätzen. Da Gene von filamentösen Pilzen meist nur wenige und wenn, dann kleine Introns enthalten (Ballance, Yeast 2,229, 1986), kann man davon ausgehen, daß das vollständige Gen auf dem beschriebenen DNA-Molekül liegt und daß Kontrollregionen ebenfalls vollständig vorhanden sind.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung, ohne sie jedoch zu beschränken. In den Beispielen stehen die Abkürzungen ml, l, mg, g, Upm, TS, GV% und U für Milliliter, Liter, Milligramm, Gramm, Umdrehungen pro Minute, Trockensubstanz, Gewicht/Volumsprozent und Internationale Enzymeinheit (1 Internationale Enzymeinheit = 1 μ Mol Substrat/min). Gewichtsteile verhalten sich zu Volumsteilen wie g zu ml, die Temperatur wird in Celsiusgraden angegeben. Die Charakterisierung der Produkte wurde unter Verwendung der folgenden Techniken durchgeführt: Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC), Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC), Ultraviolett-Spektrophotometrie (UV), Infrarotspektrometrie (IR) und magnetische Kernresonanz (NMR). Die den in den Beispielen angeführten Stammmamen beigefügten Nummern entsprechen den eingetragenen Stammbezeichnungen jener Kultursammlungen, bei denen die Stämme als solche deponiert sind, z.B. bei ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA).

55 Herstellung und Gehaltsbestimmung von Phenoxycetyl-Coenzym A (PaCoA):

Prinzip:

Coenzym A + Phenoxyessigsäurechlorid → PaCoA

901 mg CoA werden unter Eiskühlung in 15 ml bidestilliertem Wasser gelöst und mit Natronlauge auf pH 7,0 (Verbrauch 2,56 ml 1 N NaOH und 1,60 ml 0,5 N NaOH) gestellt. Anschließend werden in Portionen insgesamt 235 mg Phenoxyessigsäurechlorid unter kräftigem Rühren zugesetzt und der pH-Wert auf 7,0 gehalten (Verbrauch 1,8 ml 1 N NaOH). Nach einstündigem Rühren unter Eiskühlung wird dreimal mit je 40 ml Diethylether bei pH 2,0 (6 bzw. 1 N HCl) extrahiert, dann die wäßrige Phase mit NaOH neutralisiert, im Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur vom restlichen Ether befreit, kurz mit Stickstoff begast, anschließend 1:50 mit bidestilliertem Wasser verdünnt, in Portionen zu je 500 µl ampulliert und in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Gehaltsbestimmung erfolgt über HPLC, wobei als Standard Phenylacetyl-Coenzym A (PeCoA) verwendet wird.

HPLC-System:	HP 1090 Liquid Chromatogram (Hewlett Packard)
Säule:	Hypersil ODS 5 µm, C 18, 150x200 mm
Integrator:	Modell 3392 (Hewlett Packard) / ATT 3
Fluß:	0,5 ml/min
Detektion:	230 nm
Eluens:	35% Methanol 65% 0,01 M Tetrabutylammoniumsulfat (TBAS) in 0,025 M Phosphatpuffer pH 7,0

Auswertung:			
Probe	Retentionszeit (min)	Fläche	Höhe
400 µg/ml PeCoA	9,41	8466900	210692
200 -"	9,68	4105400	107689
100 -"	9,88	2092100	54990
PaCoA Stlsg. 1:200	10,53	1966600	47737
PaCoA Stlsg. 1:50	10,68	7850700	172983
PaCoA Stlsg. 1:40	10,47	10389000	222475
Flächenintegration → 19,2 mg PaCoA/ml			
Höhenauswertung → 16,8 mg PaCoA/ml			
Mittelwert → 18,0 mg PaCoA/ml			

Beispiel 1: Heranführung der enzymatisch aktiven Biomasse:

Der Inhalt einer Ampulle mit lyophilisierten Sporen Von *Penicillium chrysogenum* P2 / ATCC 48271 wird in 8 ml Medium A (Zusammensetzung pro Liter: 15 g Lactose, 0,11 g Stickstoff aus Cornsteep Liquor, 5 g Witte Pepton, 4 g NaCl, 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6 g KH_2PO_4 , 5 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, alles ad 1000 ml mit H_2O destilliert, pH 4,85, Sterilisation: 20 min bei 120°) suspendiert. Mit 2 ml dieser Sporensuspension wird ein 2 l Erlenmeyerkolben mit 225 ml Gerste beimpft. Die Gerste wird vor dem Abfüllen mit Wasser klar gewaschen, 20 bis 30 Minuten in Medium A gequollen, über ein Sieb filtriert und ca. eine Stunde auf Filterpapier getrocknet, anschließend in 2 l Erlenmeyerkolben zu je 225 ml abgefüllt, dreimal bei 100°, jeweils ca. eine Stunde, mit eintägigen Intervallen sterilisiert und vor dem Animpfen noch 2 Tage bis 40 bis 45° getrocknet. Nach der Sporeneinsaat werden die Erlenmeyerkolben kurz geschüttelt, dann ungefähr 8 Tage bei $24 \pm 1^\circ$ und $60 \pm 10\%$ relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Nach dieser stationären Bebrütungszeit werden die Pilzsporen mit 250 ml 0,9% NaCl + 0,1% Tween 80 auf einem vertikalen Schüttler für 3 bis 5 Minuten bei 140 Upm resuspendiert. Nach erneutem Zusatz von 250 ml 0,9%iger NaCl-Lösung (ohne Tween 80) wird die Sporensuspension in eine 1 l Impfkanne steril dekantiert. Mit je 8 ml von diesem bei 4° ca. einen Monat lagerfähigem Impfgut werden jeweils 50 Stück 2 l Erlenmeyerkolben zu je 200 ml Medium B (Zusammensetzung pro Liter: 9 g Kaliumphenoxyacetat, 150 g Lactose Monohydrat, 2,25 g Stickstoff als Pharmamedia, 10,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 g Na_2SO_4 , 0,5 g KH_2PO_4 , 10 ml tierisches Öl (Lardöl), 25 g CaCO_3 , alles ad 1000 ml mit H_2O destilliert; pH 6,5, Sterilisation: 20 min bei 120°) beimpft und drei Tage bei $25 \pm 1^\circ$ bei 260 Upm geschüttelt. Nach dieser Schüttelinkubation werden

1820 g an enzymatisch aktiver Biomasse geerntet. Der Penicillintiter beträgt 1,9 g Penicillin V pro Liter Brei.

Beispiel 2: Herstellung einer enzymatisch aktiven Enzymrohpräparation:

- 5 1786 g feuchtes Myzel (= 220 g TS), erhalten gemäß Beispiel 1, werden in 3,5 l 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5 inklusive 5 mM Dithiothreitol (DTT), 0,1% Triton X 100 sowie 0,1 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) resuspendiert und unter Kühlung bei 2/3° kontinuierlich in der Glaskugelmühle (600 ml Stahimahlbehälter mit 510 ml 500-750 µm Glasperlen, Drehzahl 2000 Upm, 0,1 mm Reibspaltbreite, Durchfluß 30 l/Stunde, Vorlauf 2 bis 3°, Rücklauf 5°, Solekühlung mit Vorlauf -20/8° und Rücklauf -5/-1°) homogenisiert.
- 10 Das Homogenat wird anschließend 30 Minuten bei 15.000 Upm und 4° zentrifugiert, der Überstand mit 0,5 GV % Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) bei 0° versetzt und 30 Minuten gerührt. Die präzipitierte Nukleinsäure wird durch Zentrifugation (10 Minuten, 15.000 Upm, 4°) abgetrennt, der Überstand durch Zugabe von festem Ammonsulfat auf 50 GV % Sättigung gebracht und zur Vervollständigung der Proteinfällung über Nacht bei 4° gehalten. Der Niederschlag wird anschließend zentrifugiert, mit kalter
- 15 gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen und nach Zusatz von 5 GV % Sorbit, 5 mM DTT, 2 mM EDTA und 0,1 mM PMSF bis zum nächsten Chromatographieschritt bei 4° gelagert. Der Aufschluß bzw. die beiden Fällungsstufen werden mit Protein- (Bradford) bzw. Aktivitätsbestimmung (mikrobiologische Erfassung der 6-APA-PaCoA-Acyltransferaseaktivität mit dem lactamsupersensitiven Stamm *Pseudomonas aeruginosa* BC 248) verfolgt. Die gefundenen Werte sind in der Tabelle 1 angeführt.

Beispiel 3: Mikrobiologischer Nachweis der Transacylierungs- bzw. Penicillin V-Spaltungsaktivität in der Enzympräparation AS-Präzipitat mit bzw. ohne Zusatz von Inhibitoren:

- Die, wie in Beispiel 2 beschrieben, hergestellte Enzymrohpräzipitation wird im mikrobiologischen
- 25 Agardiffusionstest hinsichtlich Transacylierung von 6-APA bzw. Isopenicillin N mit PaCoA und Spaltung von Kalium Penicillin V mit bzw. ohne Inhibitorzusatz folgendermaßen getestet:

Testkeim:	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341/BC 85, 0,5% Einsaat
Testmedium:	Antibiotic Medium 1 (DIFCO), 110 ml
Testplatte:	Nunc 243x243x18 mm
Probe:	50 µl pro Näpfchen (6 mm Durchmesser)
Inkubation:	37°, 15 Stunden
Enzym:	AS-Präzipitat (hergestellt wie in Beispiel 2 beschrieben): 1 ml zentrifugiert (20.000 Upm/10 min), Überstand verworfen, Pellet in 20 ml RP + Z resuspendiert.
RP + Z:	0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5 + 1 mM DTT + 10 mM MgCl ₂

A. Transcylierung/Acylierung

Ansatz in Mikrotiterplatten:

Substrat 6-APA bzw. Isopenicillin N (2,5 mg/ml)	10 µl
PaCoA (ca. 15 mg/ml)	15 µl
Enzym bzw. RP + Z mit bzw. ohne Inhibitor	75 µl
Inhibitor:	
a) ohne Inhibitor (= Kontrolle)	
b) 2 mM Jodacetamid	
c) 2 mM PMSF	
Sofort bzw. nach 7, 30 und 60 Minuten Inkubationszeit werden 20 µl Aliquots der Ansätze entnommen, 1:5 mit 50% Ethanol (Stoppen der Enzymreaktion) verdünnt und im Agardiffusionstest auf Penicillingehalt getestet.	

Transacylierung von Isopenicillin N (# 28 u. 36) mit PaCoA (HH Ø mm)

Isopenicillin N #	a)				b)				c)				
	s	7'	30'	60'	s	7'	30'	60'	s	7'	30'	60'	
5	Nr. 28	22.5	25.5	26.0	23.0	21.1	20.8	18.3	14.7	22.7	24.7	25.7	20.7
	Nr. 36	27.0	26.3	30.6	28.7	25.2	25.0	23.6	22.1	26.3	27.2	27.7	26.7
		Isopenicillin N Std. µg/ml				Penicillin V Std. µg/ml							
		50	25	12.5		2.0	1.5	1.0	0.5	0.25			
10	Nr. 28	20	16.5	12.4		25.3	24.0	21.7	17.8	9.7			
	Nr. 36	24.5	22.1	18.4									

Acylierung von 6-APA mit PaCoA in Abhängigkeit von der Enzymverdünnung

1:5				1:10				1:50				1:100			
s	7'	30'	60'	s	7'	30'	60'	s	7'	30'	60'	s	7'	30'	60'
18.3	24.4	24.3	15.7	18.6	25.4	28.5	25.4	16.0	24.2	30.7	30.7	14.5	21.3	26.7	27.0
1:500				1:1000				Penicillin V Std. µg/ml							
s	7'	30'	60'	s	7'	30'	60'	2.0	1.5	1.0	0.5	0.25			
14.8	17.8	20.6	22.8	0	9.6	10.5	11.1	25.3	24.0	21.7	17.8	9.7			

B. Penicillin V-Spaltung

Ansatz in Mikrotiterplatten:

Kalium Penicillin V 100 µg/ml	10 µl
0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5	15 µl
Enzym bzw. RP + Z (+ Inhibitor)	75 µl
a) ohne Inhibitor (= Kontrolle)	
b) + 2 mM Jodacetamid	
c) + 2 mM Ethylmaleinimid	
d) + 2 mM PMSF	
e) RP + Z	

Spaltung von Kalium Penicillin V (HH Ø mm) in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren

50

a)				b)				c)				d)			
s	7'	30'	60'	s	7'	30'	60'	s	7'	30'	60'	s	7'	30'	60'
25.7	21.8	0	0	25.7	23.1	0	0	25.0	23.0	0	0	25.3	0	0	0
e)				Kalium Penicillin V Std. µg/ml					Als Vergleich Transacylierung						
s	7'	30'	60'	2.0	1.5	1.0	0.5	0.25	6-APA + PaCoA →						
									Penicillin V						
26.8	25.8	26.2	26.4	27.4	24.7	23.4	18.4	11.9							
												17.0	23.2	26.9	25.9

Beispiel 4: Aktivierungs-, Inhibierungs-, Stabilisierungs- und pH-Profil der PAT:

Das, wie in Beispiel 2 beschrieben, hergestellte PAT-Ammonsulfatpräzipitat wird 1:10 mit 0,1 M Reaktionspuffer, in Anwesenheit verschiedener Aktivatoren bzw. Inhibitoren oder Stabilisatoren verdünnt und sofort bzw. nach eintägiger Inkubation bei 4° bzw. -20° im mikrobiologischen Testmodell auf 6-APA-PaCoA-Acyltransferaseaktivität getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Beispiel 5: Temperaturstabilität der PAT:

Das, wie in Beispiel 2 beschrieben, hergestellte PAT-Ammonsulfatpräzipitat wird 1:20 mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5 inklusive 1 bzw. 10 mM DTT verdünnt, scharf zentrifugiert, der Überstand bei -196°, -20°, +4°, +20° und +37° stationär inkubiert und sofort bzw. nach 1, 4, 26 und 120 Stunden im mikrobiologischen Testmodell auf 6-APA-PaCoA-Acyltransferaseaktivität getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 angeführt.

Beispiel 6: Reinigung der PAT über hydrophobe Interaktionschromatographie auf Phenylsepharose CI-4B (HIC-Lauf) und Affinitätschromatographie auf 6-APA-AH-Sepharose 4 B (Affinitätslauf):

240 g der, wie in Beispiel 2 beschrieben, gewonnenen Ammonsulfatpräzipitation werden in 2000 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 inklusive 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sowie 1 mM DTT gelöst und im Arbeitskühlraum bei +4° auf eine BP 113-Säule mit 2000 ml äquilibrierter Phenylsepharose CI-4B aufgegeben. Anschließend wird die Säule mit einem Fluß von 50 ml/min mit 3 Bettvolumina an 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 inklusive 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 1 mM DTT gewaschen, dann mit weiteren 2 Bettvolumina 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 inklusive 1 mM DTT das Ballastprotein entfernt, sodann mit 3 Bettvolumina entionisiertem Wasser (H_2O) inklusive 1 mM DTT das PAT-Enzym eluiert, die aktive Fraktion im Pellicon-Kassettsystem über eine Polysulfonultrafiltrationsmembran mit einem cut off von 10 kD auf ein Zehntel Volumen konzentriert, mit 1 GV % Sorbit, 5 mM DTT, 2 mM EDTA und 0,1 mM PMSF stabilisiert und bei -20° bis zum nächsten Chromatographieschritt eingefroren. Die mikrobiologisch erfaßte 6-APA-PaCoA-Acyltransferaseaktivität sowie der Gesamtproteingehalt der einzelnen, je ein Bettvolumen umfassenden Fraktionen sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Probe	Mikrobiologische PAT-Aktivität (mm HH Ø gegen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BC 248)			Gesamtprotein/Bradford (mg)
	sofort	30 min	30 min + Penase	
Einsatz	19	24	0	5483
PL 150/1	17	18	0	230
PL 150/2	16	15	0	102
PL 150/3	14	15	0	98
PL 150/4	0	0	0	2750
PL 150/5	0	0	0	390
PL 150/6	Spur	15	0	52
PL 150/7	18	31	0	389
PL 150/8	0	0	0	14

Das aktive Retentat der HIC-Fraktion wird am nächsten Tag unter schonenden Bedingungen aufgetaut und auf eine K 26/40 Pharmacia-Säule mit 50 ml Affinitätsmatrix 6-APA-AH-Sepharose 4 B, welche durch Kuppen von Penicillin G an AH-Sepharose 4B (Pharmacia) mit EEDQ nach dem LKB-Protokoll "Practical guide for use in affinity chromatography and related techniques", Reactifs IBF-Société Chimique Pointet-Girard, France 1933, S. 133, und durch anschließende Abspaltung der Phenyllessigsäure mit löslicher Penicillin G-Amidase von *E. coli* hergestellt wurde, aufgegeben. Die Säule wird darauf mit einem Fluß von 3 ml/min mit folgenden Medien bei 4° eluiert:

AL 278/1: 12 Bettvolumina 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 + 1 mM DTT + 0,1 M NaCl

AL 278/2: 3 Bettvolumina gleicher Puffer + 1 mM DTT + 0,1 M NaCl + 1 mM 6-APA

AL 278/3: 6 Bettvolumina gleicher Puffer + 1 mM DTT + 1 M NaCl + 1 mM 6-APA

Die mit dem spezifischen Eluenten 6-APA in der Fraktion 278/2 eluierte PAT-Aktivität wird im Minitan-

Kassetensystem über eine Polysulfon-UF-Membran mit einem cut off von 10 kD auf ein Zehntel Volumen aufkonzentriert, erneut mit der Stabilitätsmischung 1 GV % Sorbit, 5 mM DTT, 2 mM EDTA und 0,1 mM PMSF versetzt und in Portionen tiefgefroren. Die über HPLC bestimmte Substratspezifität dieser zumindest 50% reinen Enzympräparation ist in Tabelle 4 festgehalten.

5

Beispiel 7: Chromatofokussierung der affinitätschromatographisch hergestellten PAT-Enzympräparation auf Mono P/Pharmacia (Chromatofocussing AL 310):

Eine 1 ml Portion der, wie in Beispiel 6 beschrieben, über Affinitätschromatographie gereinigten und konzentrierten PAT-Enzympräparation wird unter schonenden Bedingungen aufgetaut, über eine äquilibrierte PD 10 Sephadex G 25 Fertigsäule gegen 25 mM bis Tris/HCl Puffer pH 6,3 pufferausgetauscht, dann auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte 4 ml FPLC Mono P-Fertigsäule aufgegeben, anschließend sofort mit einem Fluß von 60 ml/Stunde mit 100 ml eines 1:10 verdünnten und auf pH 4,0 gestellten Polypuffers 74 eluiert, peakweise fraktioniert und die Fraktionen original bzw. über Centricon 10 zehnfach konzentriert über RPC, SDS-Gradientenpolyacrylamidgelelektrophorese, isoelektrische Fokussierung auf immobiline Basis und Gelfiltration analysiert.

Abbildung 1 zeigt das Elutionsprofil des PAT-Enzyms auf der Mono P. Das multifunktionelle Enzym wird in mindestens drei isoelektrische Formen (PAT 310/3, PAT 310/4 und PAT 310/5) aufgespalten. Diese verschieden geladenen Enzymvarianten können entweder echte Isoenzyme oder verschiedene Redoxformen desselben Enzyms darstellen.

Wie der Abbildung 2 zu entnehmen ist, zerfällt die thiolabhängige PAT aus *Penicillium chrysogenum* unter den denaturierenden Bedingungen der RPC (Säule = Biorad Hi Pore RP 304, 250x4,6 mm; HPLC-Parameter: 0,5 ml/min, 45 bar, 280 nm, 40°, 25 µl Injektionsvolumen; linearer Gradient zwischen Eluens A: 35%iges wäßriges Acetonitril mit 0,01% Trifluoressigsäure und Eluens B: 80%iges wäßriges Acetonitril mit 0,01% Trifluoressigsäure, 30 Minuten) in ein Polypeptid 1 und je nach Iso- bzw. Redoxvariante in ein bzw. zwei unterschiedlich hydrophobe Polypeptidvarianten 2a und 2b.

In der SDS-Gradientenpolyacrylamidgelelektrophorese (siehe Abbildung 3a, Bedingungen nach Laemmli, Nature 227, 680- 685, 1970; aber Gradientengel mit 8-20% T) zerfällt das PAT-Enzym in zwei verschieden große Polypeptide mit einem MG um 30 und 8 kD. Durch RPC und anschließende SDS-Gradienten-PAGE kann gezeigt werden, daß das in der RPC zuerst eluierende Polypeptid 1 mit der ca. 30 kD Komponente und die beiden stärker retentierten, hydrophoben Polypeptide 2a und 2b mit der 8 kD Komponente identisch sind. Weiters kann durch solche multidimensionalen Analysen gezeigt werden, daß die kleinen Polypeptide 2a und 2b auf der SDS-Gradienten-PAGE dieselbe Wanderungsstrecke besitzen, während das große, ca. 30 kD Polypeptid 1 der basischen Iso- bzw. Redoxvariante etwas schneller wandert als das entsprechende Polypeptid 1 der mehr sauren Form.

Bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) auf Ampholinebasis (siehe Abb. 3b, methodische Durchführung nach LKB Application Note 1804) zeigt der aktive Affinitätspool drei eng beisammenliegende Banden mit einem isoelektrischen Punkt um 5,1.

Im engen pH-Bereich der hochauflösenden IEF auf Immobililinebasis (siehe Abb. 3c, methodische Durchführung nach LKB Application Note 1819) zeigen die über Chromatofokussierung getrennten PAT-Varianten pI-Werte um 5,15, 5,06 und 5,32.

Bei der MG-Bestimmung über Gelfiltration wird auf Superose 12 von Pharmacia (Eluens: 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,5 inklusive 1 mM DTT, 0,4 ml/min) ein MG von 36,5 kD bzw. auf der TSK-G2000 SW von LKB (das gleiche Eluens mit 0,5 ml/min) ein MG von 38 kD bestimmt, was mit der Summe der beiden denaturierten Polypeptide 1 und 2 gut korreliert.

Beispiel 8: N-terminale Sequenzierung der Polypeptide 1 und 2a sowie 2b:

Eine weitere Portion (2 mg Protein) der, wie in Beispiel 6 beschrieben, über Affinitätschromatographie gereinigten PAT-Enzympräparation wird nach schonendem Auftauen zweimal über RPC (dieselbe Säule und Bedingungen wie in Beispiel 7 angeführt, aber mit einem flacher ansteigenden Gradienten: min/% B = 0/0, 8/0, 20/12, 25/12, 30/100, 33/100, 36/0, 40/0) getrennt, die Fraktionen mit den Polypeptiden 1 sowie 2a und 2b lyophilisiert und im Protein-Sequenzator N-terminal sequenziert.

55

- AS-Teilsequenz 8 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 1):
 1 5 10 15 20
 Val-Gly-Phe-Asn-Ser-Ala-Gly-Val-Ala-Val-Asn-Tyr-Asn-Ala-Leu-His-Leu-Gln-Gly-Leu-
 5 25 30 32
 Arg-Pro-Thr-Gly-Val-Pro-Ser-His-Ile-Ala-Leu-Arg
- AS-Teilsequenz 9 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):
 1 5 8
 10 Thr-Glu-Phe-Ala-Tyr-Gly-Leu-Lys
- AS-Teilsequenz 10 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):
 1 5
 15 Tyr-Tyr-__-Glu-Ile-Arg
- AS-Teilsequenz 11 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):
 1
 Trp-Pro-Lys
- AS-Teilsequenz 12 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):
 1 5 10
 20 Ser-Ile-Asp-Phe-Ala-Val-Asp-Leu-Ile-Arg
- AS-Teilsequenz 13 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):
 1 5 10
 25 Asp-Val-Ser-Glu-Ile-Val-Met-Leu-Asn-Thr-Arg
- AS-Teilsequenz 14 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):
 1 5 8
 Gln-Val-Leu-Ser-Gln-Leu-Gly-Arg
- AS-Teilsequenz 15 (Peptidfragment von Polypeptid 2 mit Lysylendopeptidase):
 1 5
 30 Cys-Gln-Gly-Thr-Pro-Phe-Glu
- AS-Teilsequenz 16 (Peptidfragment von Polypeptid 2 mit Lysylendopeptidase):
 1 5 10
 35 Tyr-Tyr-Glu-Glu-Ile-Arg-Gly-Ile-Ala-Lys
- AS-Teilsequenz 17 (Peptidfragment von Polypeptid 2 mit Lysylendopeptidase):
 1 5 10 15
 40 Gln-Val-Leu-Ser-Gln-Leu-Gly-Arg-Val-Ile-Glu-Glu-Arg-__-Pro-Lys
- AS-Teilsequenz 18 (Peptidfragment von Polypeptid 2 mit Lysylendopeptidase):
 1 5 10 15
 Gly-Ala-Glu-Arg-Asp-Val-Ser-Glu-Ile-Val-Met-Leu-Asn-Thr-Arg
- AS-Teilsequenz 19 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):
 1 5
 45 Ala-Val-Ile-Ala-Arg
- AS-Teilsequenz 20 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):
 1 5
 50 Lys-Thr-Asp-Glu-Glu-Leu-Lys
- 55

AS-Teilsequenz 21 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):

1 4
Gly-Ile-Ala-Lys

AS-Teilsequenz 22 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):

1 5
Val-Ile-Glu-Glu-Arg

AS-Teilsequenz 23 (Peptidfragment von Polypeptid 2 mit Lysylendopeptidase):

1 5 10
Asn-Thr-__-Thr-Glu-Phe-Ala-Tyr-Gly-Leu-Lys

AS-Teilsequenz 24 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):

1 3
Ala-Ala-Arg

Beispiel 10: Isolierung von poly(A)⁺ RNA aus Myzel von *Penicillium chrysogenum*:

Eine Sporensuspension von *Penicillium chrysogenum* P2/ATCC 48271 wird in 5 Erlenmeyerkolben (zu je 1000 ml) mit je 100 ml CDS-Medium (für 1 l CDS-Medium werden nach dem Autoklavieren gemischt: 900 ml Lösung A: 3g NaNO₃, 0,5g MgSO₄·7H₂O, 0,5g KCl, 0,1 g FeSO₄·2H₂O, 5 g Hefeextrakt, 10 g Caseinpepton, 20 g Saccharose, pH 5,8 und 100 ml Lösung B: 250 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 5,8) etwa 70 Stunden bei 25° und 250 Upm in einem Schüttler inkubiert. 12 Erlenmeyerkolben (zu je 1000 ml) mit je 300 ml CDLP-Medium (Zusammensetzung wie CDS-Medium, an Stelle von 20 g Saccharose jedoch 150 g Lactose/l und 50 ml 10% Phenoxyessigsäure [gelöst in Wasser, pH 7,5 mit KOH eingestellt]) werden mit je 30 ml der Vorkultur beimpft und 40 Stunden bei 25° und 250 Upm im Schüttler inkubiert. Das Myzel wird mittels eines Büchner-Trichters abfiltriert, kurz mit TE gewaschen (10 mM Tris/HCl, pH 8,1, 1 mM EDTA) und in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben. Dieses Pulver wird in Lysepuffer (5 M Guanidinmonothiocyanat, 10 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 8% β-Mercaptoethanol) suspendiert (3 ml Lysepuffer pro g Myzelfeuchtmasse) und 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgt nach einer beschriebenen Methode (Cathala et al., DNA 2, 329-335, 1983). 60 g Myzelfeuchtmasse erlauben es, etwa 18 mg Roh-RNA zu isolieren, die mit Ethanol gefällt und bei -70° aufbewahrt wird. Die Anreicherung der poly(A)⁺ RNA geschieht durch eine Oligo (dT) Cellulose-Affinitätschromatographie, wie sie in Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982, beschrieben ist. Dazu wird die Roh-RNA durch Zentrifugation und Trocknung in Wasser gelöst. Nach der Chromatographie werden Fraktionen, die poly(A)⁺ RNA enthalten, erneut mit Ethanol gefällt und bei -70° aufbewahrt. Die Integrität der poly(A)⁺ RNA wird durch Gelelektrophorese in Gegenwart von Glyoxal (Maniatis et al.) überprüft, die Konzentration durch UV-Absorption.

Beispiel 11: Partielle Sequenzierung einer RNA, die für das Enzym PAT kodiert:

Aus der Aminosäuresequenz des Polypeptides 1 der PAT (Beispiel 8) läßt sich auf Grund des genetischen Kodes eine DNA-Sequenz ableiten (Abb. 5). Ein Bereich von 17 bp, der eine minimale Anzahl von unterschiedlichen Sequenzen zuläßt, wird für die Synthese von Oligonukleotidgemischen ausgewählt. 4 Gemische mit 4 unterschiedlichen Oligonukleotiden, die zu dem Sinn-Strang und damit auch zur RNA komplementär sind, werden synthetisiert (Oligonukleotidgemische 1, 2, 3 und 4 in Abb. 5). Diese Oligonukleotide werden enzymatisch phosphoryliert und dadurch radioaktiv markiert (Maniatis et al.). 150 ng Oligonukleotide werden in 12 µl Reaktionsansatz (50 mM Tris/HCl, pH 9,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTE, 5% Glycerin) mit 250 µCi ATP (Amersham PB 10218) mit 16 Einheiten Polynukleotidkinase für 30 Minuten bei 37° inkubiert. 10 µg der poly(A)⁺ RNA (Beispiel 10) werden in 250 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8,3 mit 2 µl 32-P-markiertem Oligonukleotidgemisch in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß vermischt. Die Mischung wird 2 Minuten auf 75° erhitzt und dann 45 Minuten bei 50° erwärmt. In 4 Eppendorfgefäße werden je 3,3 µl Reaktionspuffer (24 mM Tris/HCl, pH 8,3, 16 mM MgCl₂, 8 mM DTE, 0,4 mM dATP, 0,8 mM dGTP, 0,4 mM dCTP, 0,4 mM dTTP, 6 Einheiten Reverse Transcriptase und außerdem je 1 µl 1 mM dATP oder 1 µl 1

mM dGTP oder 1 μ l 1 mM dCTP oder 1 μ l 1 mM dTTP gegeben. Nach der Zugabe von 2 μ l poly(A)⁺ RNA-Oligonukleotidgemisch wird der Inhalt des Eppendorfgefäßes kurz zentrifugiert und 45 Minuten bei 50° erwärmt. Die Reaktion wird durch 2 μ l Stop-Puffer (99% Formamid, 0,3% Bromphenolblau, 0,3% Xylencyanol) und dreiminütiges Kochen beendet. Je 4 μ l der Proben werden auf ein 8%iges Polyacrylamid/Harnstoffgel aufgetragen und 2,5 Stunden bei 40 W aufgetrennt (Sequ Gen, Biorad). Nach dem Lauf wird das Gel für 20 Minuten in 5% Methanol, 5% Essigsäure gelegt und 1 Stunde bei 80° getrocknet. Das abgekühlte Gel wird in Haushaltsfolie eingeschlagen. Ein Röntgenfilm (Kodak XOMat AR) wird für 20 Stunden aufgelegt. Die Sequenz, die sich von diesem Röntgenfilm ablesen läßt, ist wiedergegeben:

```

10      10      20      30      40      50      60
      5'-CCATTTCGAAGTTGACAATAGGCAGTGGTGCAGCCATCACGGGCTGCCTTGAGCCCCGTAT
      70      80      90      100     110
      GCAAATTCGGTCCGGGTATTAAGCATGACAATCTCGGAGACATCGCGTTCA-3'

```

15 Die Positionen 1 bis 29 sind komplementär zur DNA-Sequenz, die sich aus der Aminosäuresequenz des Polypeptides 1 der PAT ableiten läßt (Abbildung 5, 6D). Ein Oligonukleotid, das die ersten 30 Nukleotide dieser Sequenz umfaßt, wird synthetisiert.

Beispiel 12: Konstruktion einer genomischen Genbank von *Penicillium chrysogenum*:

20 Aus dem Myzel einer in CDS-Medium gewachsenen *Penicillium chrysogenum* Kultur (Beispiel 10) wird DNA isoliert. Das Myzel wird in flüssigem Stickstoff zerrieben, dann in 1% Sarkosyl, 0,1 M EDTA, pH 8, 100 μ g Proteinase K/ml gegeben (1 g Myzel/25 ml) und 48 Stunden bei 37° geschüttelt. Die Mischung wird dreimal mit Phenol extrahiert und nach Zugabe von 0,1 Volumanteilen 3 M Natriumazetat, pH 5,2, mit
 25 Ethanol gefällt. Anschließend wird eine CsCl-EtBr-Zentrifugation durchgeführt (Maniatis et al.) und nach Extraktion mit Isoamylalkohol und Dialyse gegen TE die Konzentration durch UV-Absorption bestimmt. Die DNA wird außerdem durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. 300 μ g *Penicillium chrysogenum* DNA werden in 5 U Sau3A (BRL) 60 Minuten bei 37° in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTE, 50 mM NaCl gespalten. Das Ausmaß der Spaltung wird auf einem Agarose-Gel überprüft. Erwünscht ist, daß
 30 ein großer Teil der DNA zwischen 10 und 20 kb groß ist. Die DNA wird dann auf zwei NaCl-Gradienten (hergestellt durch Einfrieren und Wiederauftauen von 2 Beckmann-SW28.1-Ultrazentrifugenröhrchen mit 20% NaCl in TE [10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA]) aufgetragen und in der Ultrazentrifuge im Rotor SW 28.1 16 Stunden bei 14.000 Upm zentrifugiert. Der Inhalt der Röhrchen wird fraktioniert. Fraktionen mit DNA größer als 10 kb werden vereinigt und gegen TE dialysiert. Nach einer Konzentrierung der DNA (500
 35 μ g/ml) wird sie mit λ -EMBL3-DNA (Frischhauf et al., J.Mol.Biol. 170, 827-832, 1983), die mit BamHI und EcoRI gespalten worden ist, vereinigt. In 30 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTE, 2,5 mM ATP wird nach Zugabe von 0,5 U T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16° ligiert (DNA-Konzentration 200 μ g/ml, Vektor zu *Penicillium chrysogenum*-DNA im molaren Verhältnis 1:1). Das Ligationsgemisch wird mit Hilfe von Proteinextrakten ("packaging mixes", Maniatis et al.) in vitro verpackt. Die entstandenen λ -Lysate
 40 werden auf dem Indikatorstamm NM539 (Frischhauf et al.) getitert. Erhalten werden etwa 10⁵ pfu.

Beispiel 13: Isolierung von λ -Klonen, die mit einem PAT-spezifischen Oligonukleotid hybridisieren:

45 40.000 rekombinante Phagen der *Penicillium chrysogenum* Genbank in λ -EMBL3 (Beispiel 12) werden mit dem Stamm NM538 (Frischhauf et al.) auf 90 mm TB-Platten in 0,7% Agarose ausgegossen (TB Medium enthält 10 g Bacto Trypton und 5 g NaCl pro Liter, der pH 7,5 wird mit NaOH eingestellt). Von diesen Platten werden je zwei Abdrücke auf Nylon-Filter hergestellt (Amersham Hybond N-Filter). Nach der UV-Fixierung der DNA werden diese Filter für die Hybridisierung eingesetzt. Das in Beispiel 11 beschriebene 30mer, dessen Sequenz komplementär zu der DNA-Sequenz ist, die aus der Aminosäuresequenz des
 50 Polypeptides 1 der PAT ist, wird radioaktiv markiert (T4-Polynukleotid-Kinase-Reaktion wie in Beispiel 11). Die Hybridisierung wird bei 37° in 6xSSPE (1xSSPE ist 0,15 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7,4), 30% Formamid, 5x Denhard, 0,1% SDS, 100 μ g/ml Heringssperma-DNA, 0,1 mM ATP, 3 ng/ml 32-P-markiertes Oligonukleotid für etwa 20 Stunden durchgeführt. Die Filter werden dann dreimal 10 Minuten bei Raumtemperatur in 2xSSC (1xSSC ist 0,3 M NaCl, 0,03 M Natriumcitrat, pH 7,0), 0,1% SDS und
 55 anschließend dreimal 20 Minuten bei 56° in 1xSSC, 0,1% SDS gewaschen und nach dem Trocknen autoradiographiert. Regionen in der Agaroseschicht der ursprünglichen Platte, die positiven Hybridisierungssignalen auf dem Röntgenfilm entsprechen, werden mit einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen und in SM-Puffer (5,8 g NaCl, 2 g MgSO₄·7H₂O und 50 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,5) resuspendiert. Eine geeignete

Verdünnung wird mit NM538 als Indikatorstamm erneut auf TB-Platten ausgegossen. Die Phagen auf diesen Platten werden auf Nylonfilter übertragen und wie oben beschrieben hybridisiert. Aus Plaques, die zum zweitenmal positive Signale ergeben, werden die entsprechenden rekombinanten λ -Phagen isoliert. Die gereinigte DNA dieser Phagen wird für Restriktionsanalysen und Southernhybridisierungen verwendet. Außerdem werden Subklonierungen in Plasmide (pUC 12, Messing, Methods Enzymol. 101, 20, 1983) und M13-Vektoren durchgeführt (M13mp18, M13mp19, Norrander et al., Gene 26, 101, 1983). Die Sequenzierung eines M13mp19-Subklons mit dem Oligonukleotid ergibt folgende Sequenz:

```

      10      20      30      40      50
10  5'-CATCACGGGCTGCCTTGAGCCCGTATGCAAATTCGGTCCGGGTATTAAGC
      60      70      80      90     100
    ATGACAATCTCGGAGACATCCCGTTCAGCGCCCTTTGCAATACCTGGTTT
      110     120     130     140     150
    TTCGGGGGTCATCGGTCAGCATTGGTGCAAAAATGTAGGAAAGACCGAA
15      160     170     180     190     200
    GTGGCACTCACCGCGAATCTCCTCGTAGTATTTGGGCCATCTTTCCTCGATC-3'

```

Die Nukleotide 35 bis 111 der DNA-Sequenz, die mit Hilfe der RNA bestimmt werden (Beispiel 11), stimmen mit den Nukleotiden 1 bis 77 dieser DNA-Sequenz überein (Abb. 6F).

Beispiel 14: DNA-Sequenz des PAT-Gens:

In Abbildung 4 ist die Lage dieser DNA-Sequenz durch zwei waagrechte Striche eingezeichnet (A), 1 entspricht dabei dem ersten Nukleotid, 1972 dem letzten.

30

35

40

45

50

55

10 20 30 40 50 60 70
 GTTGATGTCCCATCAGTGTCTATGGTCCCAGATTGGTGGCTACGGCAATATAAATCTCAGCATGCA
 80 90 100 110 120 130 140
 5 GTTCCGCCTGCATGATCATCCCCAGGACGCCGTTTGTTCATCTCCGTACGCCAGGTCTCAGTTGTTTACCC
 150 160 170 180 190 200 210
 ATCTTCCGACCCGCAGCAGAAATGCTTCACATCCTCTGTCAAGCCACTCCCTTTGAAGTAAGTCTGCAC
 220 230 240 250 260 270 280
 10 TGAATACCAGATTTTTTCTTCTGAATCTTCCGAGTTCTGACCTGATCCAGATCGGCTACGAACATGGCT
 290 300 310 320 330 340 350
 15 CTGCTGCCAAAGCCGTGATAGCCAGAAGCATTGACTTCCGCCGTGATCTCATCCGAGGGAAAACGAAGAA
 360 370 380 390 400 410 420
 GACGGACGAAGAGCTTAAACAGGTACTCTCGCAACTGGGGCGGTGATCGAGGAAAGATGGCCCAAATAC
 430 440 450 460 470 480 490
 20 TACGAGGAGATTCCGGTGAGTGCCACTTCGGTCTTTCTTACATTTTCTOCACCAATGCTGACCGATGAC
 500 510 520 530 540 550 560
 CCCCCAAAAACCAGGTATTGCAAAGGGCGCTGAACCGGATGTCTCCGAGATTGTCATGCTTAATACCCOC
 570 580 590 600 610 620 630
 25 ACGGAATTTGCATACGGGCTCAAGGCAGCCCGTGATGGCTGCACCACTGCCTATTGTCAACTTCCAAATG
 640 650 660 670 680 690 700
 GAGCCCTCCAGGGCCAAAACCTGGGATGTACGTTAAGAGATTTTACCTCCTCATTTTATTCATCGAATTT
 710 720 730 740 750 760 770
 30 GCGCCGACTAATTTGGTTGTTCAAGTTCTTTTCTGCCACCAAAGAGAACCTGATCCGGTTAACGATCCGT
 780 790 800 810 820 830 840
 35 CAGCCCGGACTTCCCACCATCAAATTCATAACCGAGGCTGGAATCATCGGGAAGGTTGGATTTAACAGTG
 850 860 870 880 890 900 910
 CGGGGGTCCCGTCAATTACAACGCCCTTCACCTTCAAGGTCTTCGACCCACCGAGTTCTTCCGATAT
 920 930 940 950 960 970 980
 40 TCCCTCCGCATAGCGCTCGAAAGCACTTCTCCTTCCCAGGCCTATGACCGGATCGTGGAGCAAGGCCGA
 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 ATGCCCGCCAGCGCTTTTATCATGGTGGGCAATGGGCACGAGGCATTTGGTTTGAATTCTCCCCACCA

1080 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 GCATCCGAAAGCAGGTGCTCGACCCGAATGGTAGGATGGTGCACACCAACCACTGCTTGCCTTCAGCACCG
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 5 CAAAAATGAGAAAGAGCTCGATCCCTTACCCGACTCATGGAATCGCCACCAGCGTATGGAGTTCTCTCCTC
 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GACGGGTTTCGACGGCACCAACAGGCATTTGCCAGCTCTGGGCCGACGAAGACAATTATCCCTTTAGCA
 10 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 TCTGCCGCGCTTACGAGGAGGGCAAGAGCAGAGGCCGACTCTGTTCAATATCATCTACGACCATGCCCG
 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 15 TAGAGAGGCAACGGTGGCGCTTGCCCGCCGACCAACCCTGATGAGATGTTTGTTCATGCCGTTTGACGAG
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 GAGGACGAGAGGTCTGCCCTCAACGCCAGGCTTTGAAGGCTCTTCATGACGAGCCAATGCATCTTTTGTA
 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
 20 TGTAGCTTCAACCGACTCCGTCTTCACCTTCTTCGCCCCGCACTGCCTACCGTTTGTACCATCTGACTCATA
 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 TAAATGTCTAGCCCCTACCTACACTATACCTAAGGGAGAGAAGCGTAGAGTGATTAACGTACCGGCCCTAT
 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 25 AGTACCCCGATCTCTAGATAGAACATTTAGTAGAGATTAGGATGCCTAACTAATTTAACTTGAGCATTGT
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 30 CCCGTTTCATATTGATTTTCATCCATTATACACTCTTAATCGTTTCCCGGTAGAAGCCGNATATATACGAC
 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
 CATAGGGTGTGGAGAACAGGGCTTCCCGTCTGCTTGGCCGTAAGCTATATATTCTACACGCCCAAT
 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 35 ACTCAATGTGCCCTTAGCACCTAAGCGGCACTCTAGGGTAAGTCCGGTGATATAGGTGAGAAAGTCTTAA
 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960
 GACTGAAGACAGGATATCAGCGTTACCCTGCACCGTACCTACTACCTTCAATATCACTCTTTCAGGATG
 40 1970
 GACAGGGTCGAC
 45

Beispiel 15: DNA-Sequenz des PAT-Gens:

In dieser DNA-Sequenz wurde der kodierende Bereich durch einen Vergleich der experimentell bestimmten Aminosäureteilsequenzen mit der Kodierkapazität dieser DNA-Sequenz festgelegt. Dabei zeigt es sich, daß in diesem Gen drei Introns vorkommen, die zusätzlich durch Intron-Exon-Konsensus-Sequenzen (Rambosek und Leach, Critical Reviews in Biotechnology 6, 357-393, 1987) identifiziert wurden.

10 20 30 40 50 60 70
 GTTGATGTCCCATCAGTGTCATGCTATGGTCCCAGATTGGTGGCTACGGCAATATAAATCTCAGCATGCA

55

80 90 100 110 120 130 140
 GTTCCGCTCATGATCATCCCCAGGACGCCGTTTGTTCATCTCCGTCAGCCAGGTCTCAGTTGTTTACCC
 5 150 160 170 180 190 200 210
 ATCTTCCGACCCGAGCAGAAATGCTTCACATCCTCTGTCAAGGCACTCCCTTTGAAGTAAGTCTGCAC
 MetLeuHisIleLeuCisGlnGlyThrProPheGlu
 10 220 230 240 250 260 270 280
 TGAATACCAGATTTTTTCCTTCTGAATCTTCGAGTTCTGACCTGATCCAGATCGGCTACGAACATGGCT
 IleGlyTyrGluHisGly
 15 290 300 310 320 330 340 350
 CTGCTGCCAAAGCCGTGATAGCCAGAAGCATTGACTTCGCCGTCGATCTCATCCGAGGAAAAACGAAGAA
 erAlaAlaLysAlaValIleAlaArgSerIleAspPheAlaValAspLeuIleArgGlyLysThrLysLy
 360 370 380 390 400 410 420
 GACCGACCAAGAGCTTAAACAGGTACTCTCGCAACTCGGGCCGCTGATCGAGGAAAGATGGCCCAAATAC
 sThrAspGluGluLeuLysGlnValLeuSerGlnLeuGlyArgValIleGluGluArgTrpProLysTyr
 20 430 440 450 460 470 480 490
 TACGAGGAGATTTCGGGTGAGTGCCACTTCGGTCTTTCTTCTACATTTTCTGCACCAATGCTGACCGATGAC
 TyrGluGluIleArgG
 25 500 510 520 530 540 550 560
 CCCCCAAAAACCAGGTATTGCAAAGGGCCCTGAACGCGATGCTCTCCGAGATTGTTCATGCTTAATACCCGC
 lyIleAlaLysGlyAlaGluArgAspValSerGluIleValMetLeuAsnThrArg
 570 580 590 600 610 620 630
 ACCGAATTTGCATACGGGCTCAAGGCAGCCCGTGTGCTGCACCACTGCCTATTGTCAACTTCCAAATG
 ThrGluPheAlaTyrGlyLeuLysAlaAlaArgAspGlyCysThrThrAlaTyrCysGlnLeuProAsnG
 30 640 650 660 670 680 690 700
 GAGCCCTCCAGGGCCAAAACCTGGGATGTACGTTAAGAGATTTTACCTCCTCATTTTATTCCATCGAATTT
 lyAlaLeuGlnGlyGlnAsnTrpAsp
 35 710 720 730 740 750 760 770
 GCGCCGACTAATTTGGTTGTTCAAGTTCTTTTCTGCCACCAAAGAAACCTGATCCGTTAACGATCCGT
 PhePheSerAlaThrLysGluAsnLeuIleArgLeuThrIleArg
 780 790 800 810 820 830 840
 CAGGCCGACTTCCCACCATCAAATTCATAACCGAGGCTGGAATCATCGGGAAGGTTGGATTAAACAGTG
 GlnAlaGlyLeuProThrIleLysPheIleThrGluAlaGlyIleIleGlyLysValGlyPheAsnSera
 40 850 860 870 880 890 900 910
 CGGGGGTCGGCGTCAATTACAACGCCCTTCACCTTCAAGGTCTTCGACCCACCGAGTTCCTTCGCATAT
 laGlyValAlaValAsnTyrAsnAlaLeuHisLeuGlnGlyLeuArgProThrGlyValProSerHisIl
 45 920 930 940 950 960 970 980
 TGGCCTCCGCATAGCGCTCGAAAGCACTTCTCCTTCCAGGCCTATGACCGGATCGTGGAGCAAGCCGGA
 eAlaLeuArgIleAlaLeuGluSerThrSerProSerGlnAlaTyrAspArgIleValGluGlnGlyGly
 50 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 ATGGCCGCCAGCGCTTTTATCATGCTGGCAATCGGCACGAGGCATTTGGTTTGAATTCTCCCCACCA
 MetAlaAlaSerAlaPheIleMetValGlyAsnGlyHisGluAlaPheGlyLeuGluPheSerProThrS
 55

1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 GCATCCGAAAGCAGGTGCTCGACCGGAATGGTAGGATGGTGCACACCAACCACTGCTTGCTTCAGCACGG
 erileArgLysGlnValLeuAspAlaAsnGlyArgMetValHisThrAsnHisCysLeuLeuGlnHisGl
 5 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 CAAAAATGAGAAAGAGCTCGATCCCTTACCGGACTCATGGAATCGCCACCAGCGTATGGAGTTCCTCCTC
 yLysAsnGluLysGluLeuAspProLeuProAspSerTrpAsnArgHisGlnArgMetGluPheLeuLeu
 10 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GACGGGTTTCGACGGCACCAACAGGCATTTGCCAGCTCTGGGCCGACGAAGACAATTATCCCTTTAGCA
 AspGlyPheAspGlyThrLysGlnAlaPheAlaGlnLeuTrpAlaAspGluAspAsnTyrProPheSerI
 15 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 TCTCCCGCGCTTACGAGGAGGCAAGAGCAGAGCGCGGACTCTOTTCAATATCATCTACGACCATGCCCG
 leCysArgAlaTyrGluGluGlyLysSerArgGlyAlaThrLeuPheAsnIleIleTyrAspHisAlaAr
 20 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TAGAGAGGCAACGGTGGCGCTTGGCCGGCCGACCAACCCTGATGAGATGTTTGTTCATGCGGTTTGACGAG
 gArgGluAlaThrValArgLeuGlyArgProThrAsnProAspGluMetPheValMetArgPheAspGlu
 25 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 GAGGACGAGAGGTCTGCGCTCAACGCCAGGCTTTGAAGCCTCTTCATGACGAGCCAATGCATCTTTTGT
 GluAspGluArgSerAlaLeuAsnAlaArgLeu***
 30 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
 TGTAGCTTCAACCGACTCCGTCTTCACTTCTTCGCCCGCACTGCCTACCGTTTGTACCATCTGACTCATA
 35 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 TAAATGTCTAGCCCCTACCTACACTATACCTAAGGGAGAGAAGCGTAGAGTGATTAAACGTACGGGCCTAT
 40 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 AGTACCCCGATCTCTAGATAGAACATTTAGTAGAGATTAGGATGCCTAACTAATTTAACTTGAGCATTGT
 45 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 CCCGTTTCATATTGATTTTCATCCATTATACACTCTTAATCGTTTCCCGGTAGAAGCCGNATATATACGAC
 50 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
 CATAGCGTGTGGAGAACAGGCTTCCCGTCTGCTTGGCCGCTACTTAAGCTATATATTCTACACGGCCAAT
 55 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 ACTCAATGTGCCCTTAGCACCTAAGCGGCACTCTAGGGTAAGTGCCTGATATAGGTGAGAAGTCTTAA
 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960
 GACTGAAGACAGGATATCACGCGTTACCCTGCACCGTACCTACTACCTTCAATATCACTCTTTCAGGATG
 45 1970
 GACACGGTCCGAC

Beispiel 16: Aminosäuresequenz der PAT, abgeleitet aus der DNA-Sequenz:

Dieses Polypeptid hat ein Molekulargewicht von 40.000 D. Wenn es zwischen Aminosäurerest 102 und 103 gespalten wird, erhält man zwei Polypeptide: Ein Polypeptid mit 11.500 D und der N-terminalen Aminosäuresequenz des Polypeptides 2; sämtliche Peptidfragmente lassen sich in dieser Aminosäuresequenz wiederfinden (AS-Teilsequenzen 9 bis 24). Es handelt sich also um die "8kD-Komponente der PAT".

Ein Polypeptid mit 28.500 D und der N-terminalen Aminosäuresequenz des Polypeptides 1; sämtliche Peptidfragmente lassen sich in dieser Aminosäuresequenz wiederfinden (AS-Teilsequenzen 2, 3, 4, 5, 7, 8).

Es handelt sich also um die "30kD-Komponente der PAT"

	10	20
	MetLeuHisIleLeuCysGlnGlyThrProPheGluIleGlyTyrGluHisGlySerAla	
5	30	40
	AlaLysAlaValIleAlaArgSerIleAspPheAlaValAspLeuIleArgGlyLysThr	
	50	60
	LysLysThrAspGluGluLeuLysGlnValLeuSerGlnLeuGlyArgValIleGluGlu	
10	70	80
	ArgTrpProLysTyrTyrGluGluIleArgGlyIleAlaLysGlyAlaGluArgAspVal	
	90	100
15	SerGluIleValMetLeuAsnThrArgThrGluPheAlaTyrGlyLeuLysAlaAlaArg	
	110	120
	AspGlyCysThrThrAlaTyrCysGlnLeuProAsnGlyAlaLeuGlnGlyGlnAsnTrp	
	130	140
20	AspPhePheSerAlaThrLysGluAsnLeuIleArgLeuThrIleArgGlnAlaGlyLeu	
	150	160
	ProThrIleLysPheIleThrGluAlaGlyIleIleGlyLysValGlyPheAsnSerAla	
25	170	180
	GlyValAlaValAsnTyrAsnAlaLeuHisLeuGlnGlyLeuArgProThrGlyValPro	
	190	200
	SerHisIleAlaLeuArgIleAlaLeuGluSerThrSerProSerGlnAlaTyrAspArg	
30	210	220
	IleValGluGlnGlyGlyMetAlaAlaSerAlaPheIleMetValGlyAsnGlyHisGlu	
	230	240
35	AlaPheGlyLeuGluPheSerProThrSerIleArgLysGlnValLeuAspAlaAsnGly	
	250	260
	ArgMetValHisThrAsnHisCysLeuLeuGlnHisGlyLysAsnGluLysGluLeuAsp	
40	270	280
	ProLeuProAspSerTrpAsnArgHisGlnArgMetGluPheLeuLeuAspGlyPheAsp	
	290	300
	GlyThrLysGlnAlaPheAlaGlnLeuTrpAlaAspGluAspAsnTyrProPheSerIle	
45	310	320
	CysArgAlaTyrGluGluGlyLysSerArgGlyAlaThrLeuPheAsnIleIleTyrAsp	
	330	340
50	HisAlaArgArgGluAlaThrValArgLeuGlyArgProThrAsnProAspGluMetPhe	
	350	
55	ValMetArgPheAspGluGluAspGluArgSerAlaLeuAsnAlaArgLeu	

Beispiel 17: Vergleich der aus der DNA abgeleiteten Aminosäuresequenz der PAT mit den experimentell ermittelten Aminosäuresequenzen:

30kD Einheit/Polypeptid 1 (N-terminale Aminosäuresequenz)

5 2 ThrThrAlaTyrCysGlnLeuProAsnGlyAlaLeuGlnGlyGlnAsnTrpAspPhePhe
104 ThrThrAlaTyrCysGlnLeuProAsnGlyAlaLeuGlnGlyGlnAsnTrpAspPhePhe

 22 SerAlaThrLysGluAsnLeulleArg 30
10 124 SerAlaThrLysGluAsnLeulleArg 132

AS-Teilsequenz 2 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 1):

 1 GlyAlaThrLeuPheAsnIlelleTyrAspHisAlaArg 13
15 311 GlyAlaThrLeuPheAsnIlelleTyrAspHisAlaArg 323

AS-Teilsequenz 3 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 1):

 1 ProThrAsnProAspGluMetPheValMetArg 11
20 333 ProThrAsnProAspGluMetPheValMetArg 343

AS-Teilsequenz 4 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 1):

 1 GluLeuAspProLeuProAspSerTrpAsnArg 11
25 258 GluLeuAspProLeuProAspSerTrpAsnArg 268

AS-Teilsequenz 5 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 1):

 1 MetGluPheLeu—AspGlyPheAspGlyThrLys 12
30 272 MetGluPheLeuLeuAspGlyPheAspGlyThrLys 283

AS-Teilsequenz 7 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 1):

 1 IleAlaLeuGluSerThrSerProSerGlnAlaTyrAspArg 14
35 187 IleAlaLeuGluSerThrSerProSerGlnAlaTyrAspArg 200

AS-Teilsequenz 8 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 1):

 1 ValGlyPheAsnSerAlaGlyValAlaValAsnTyrAsnAlaLeuHisLeuGlnGlyLeu
40 155 ValGlyPheAsnSerAlaGlyValAlaValAsnTyrAsnAlaLeuHisLeuGlnGlyLeu
 21 ArgProThrGlyValProSerHisIleAlaLeuArg 32
 175 ArgProThrGlyValProSerHisIleAlaLeuArg 186

45

50

55

8kD Einheit I/Polypeptid 2a

1 MetLeuHisIleLeuCysGlnGlyThrProPheGluIleGlyTyrGluHisGlySerAla
 1 MetLeuHisIleLeuCysGlnGlyThrProPheGluIleGlyTyrGluHisGlySerAla

5

AlaLysAlaValIleAlaArgSerIleAspPheAlaValAsp 34

AlaLysAlaValIleAlaArgSerIleAspPheAlaValAsp 34

8kD Einheit II/Polypeptid 2b

10

1 MetLeuHisIleLeuCysGlnGlyThrProPheGluIleGlyTyrGluHisGlySerAla
 1 MetLeuHisIleLeuCysGlnGlyThrProPheGluIleGlyTyrGluHisGlySerAla

15

AlaLysAlaValIleAlaArgSerIleAspPheAlaValAspLeuIleArgGlyLysThr 40

AlaLys__ValIleAlaArg__IleAspPheAlaValAspLeu__Gly__Thr 40

AS-Teilsequenz 9 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):

20

1 ThrGluPheAlaTyrGlyLeuLys 8
 90 ThrGluPheAlaTyrGlyLeuLys 97

AS-Teilsequenz 10 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):

25

1 TyrTyrAnyGluIleArg 6
 65 TyrTyrGluGluIleArg 70

AS-Teilsequenz 11 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):

30

1 TrpProLys 3
 62 TrpProLys 64

AS-Teilsequenz 12 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):

35

1 SerIleAspPheAlaValAspLeuIleArg 10
 28 SerIleAspPheAlaValAspLeuIleArg 37

AS-Teilsequenz 13 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):

40

1 AspValSerGluIleValMetLeuAsnThrArg 11
 79 AspValSerGluIleValMetLeuAsnThrArg 89

AS-Teilsequenz 14 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):

45

1 GlnValLeuSerGlnLeuGlyArg 8
 49 GlnValLeuSerGlnLeuGlyArg 56

AS-Teilsequenz 15 (Peptidfragment von Polypeptid 2 mit Lysylendopeptidase):

50

6 CysGlnGlyThrProPheGlu 12
 1 CysGlnGlyThrProPheGlu 7

55

AS-Teilsequenz 16 (Peptidfragment von Polypeptid 2 mit Lysylendopeptidase):

5 65 TyrTyrGluGluIleArgGlyIleAlaLys 74
 1 TyrTyrGluGluIleArgGlyIleAlaLys 10

AS-Teilsequenz 17 (Peptidfragment von Polypeptid 2 mit Lysylendopeptidase):

10 49 GlnValLeuSerGlnLeuGlyArgValIleGluGluArgTrpProLys 64
 1 GlnValLeuSerGlnLeuGlyArgValIleGluGluArg__ProLys 16

AS-Teilsequenz 18 (Peptidfragment von Polypeptid 2 mit Lysylendopeptidase):

15 75 GlyAlaGluArgAspValSerGluIleValMetLeuAsnThrArg 89
 1 GlyAlaGluArgAspValSerGluIleValMetLeuAsnThrArg 15

AS-Teilsequenz 19 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):

20 23 AlaValIleAlaArg 27
 1 AlaValIleAlaArg 5

AS-Teilsequenz 20 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):

25 42 LysThrAspGluGluLeuLys 48
 1 Lys__AspGluGluLeuLys 7

AS-Teilsequenz 21 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):

30 71 GlyIleAlaLys 74
 1 GlyIleAlaLys 4

AS-Teilsequenz 22 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 2):

35 57 ValIleGluGluArg 61
 1 ValIleGluGluArg' 5

AS-Teilsequenz 23 (Peptidfragment von Polypeptid 2 mit Lysylendopeptidase):

40 87 AsnThrArgThrGluPheAlaTyrGlyLeuLys 97
 1 AsnThr__ThrGluPheAlaTyrGlyLeuLys 11

45

50

55

Zusammenfassung:

	AS-Teilsequenz	Position der AS in der aus der DNA abgeleiteten AS Sequenz
5	N-terminale AS-Sequenz 30 kD Einheit/Polypeptid 1	104 - 113
	N-terminale AS-Sequenz 8 kD Einheit/ Polypeptid 2a	1 - 34
	N-terminale AS-Sequenz 8 kD Einheit/Polypeptid 2b	1 - 40
10	AS-Teilsequenz 2 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 1):	311 - 323
	AS-Teilsequenz 3 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 1):	333 - 343
	AS-Teilsequenz 4 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 1):	258 - 268
	AS-Teilsequenz 5 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 1):	272 - 283
	AS-Teilsequenz 7 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 1):	187 - 200
15	AS-Teilsequenz 8 (tryptisches Peptidfragment von Polypeptid 1):	155 - 186
	AS-Teilsequenz 9 (tryptisches Fragment von Polypeptid 2):	90 - 97
	AS-Teilsequenz 10 (tryptisches Fragment von Polypeptid 2):	65 - 70
	AS-Teilsequenz 11 (tryptisches Fragment von Polypeptid 2):	62 - 64
	AS-Teilsequenz 12 (tryptisches Fragment von Polypeptid 2):	28 - 37
20	AS-Teilsequenz 13 (tryptisches Fragment von Polypeptid 2):	79 - 89
	AS-Teilsequenz 14 (tryptisches Fragment von Polypeptid 2):	49 - 56
	AS-Teilsequenz 15 (Lysyl-E. von Polypeptid 2):	6 - 12
	AS-Teilsequenz 16 (Lysyl-E. von Polypeptid 2):	65 - 74
	AS-Teilsequenz 17 (Lysyl-E. von Polypeptid 2):	49 - 64
25	AS-Teilsequenz 18 (Lysyl-E. von Polypeptid 2):	75 - 89
	AS-Teilsequenz 19 (tryptisches Fragment von Polypeptid 2):	23 - 27
	AS-Teilsequenz 20 (tryptisches Fragment von Polypeptid 2):	42 - 48
	AS-Teilsequenz 21 (tryptisches Fragment von Polypeptid 2):	71 - 74
	AS-Teilsequenz 22 (tryptisches Fragment von Polypeptid 2):	57 - 61
30	AS-Teilsequenz 23 (Lysyl-E. von Polypeptid 2):	87 - 97

Beispiel 18: Teilsequenz eines DNA-Fragmentes, das zwischen dem Gen für die Isopenicillin N-Synthetase (ips) und dem Gen für PAT liegt:

Diese Sequenz beginnt mit "GGATCC", der Erkennungs-Sequenz des Restriktionsenzymys BamHI, die im ips-Gen liegt. Die 34 letzten (C-terminalen) Codons dieses Gens sind gezeigt; sie wurden durch einen Vergleich mit der veröffentlichten DNA-Sequenz identifiziert (Carr. et al., Gene 48, 257-266, 1986). Nach einem Zwischenbereich folgt bei 1442 die Position 1 der pat-DNA-Sequenz. Diese DNA-Teilsequenz ist in der Abb. 4 eingezeichnet (B).

Diese DNA-Teilsequenz ist wichtig, da sie die enge Koppelung zwischen ips- und pat-Gen belegt, und weil alle wesentlichen Kontrollelemente für Transkription und Translation des pat-Gens auf diesem Fragment liegen.

```

      10      20      30      40      50
GGATCCTAGCAAGGAAGACGGCAAGACCGATCAGCGGCCAATCTCGTACG
  AspProSerLysGluAspGlyLysThrAspGlnArgProIleSerTyrG
5
      60      70      80      90      100
GGGACTATCTGCAGAACGGATTAGTTACTCTAATCAACAAGAACGGCCAG
  lyAspTyrLeuGlnAsnGlyLeuValSerLeuIleAsnLysAsnGlyGln

      110      120      130      140      150
ACATGAAAGGGCCCATGGATGGGACCGGGATCGAAATCCCGGACTCTGAG
  ThrEnd

      850
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 1250 bp NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
15
      1410      1420      1430      1440      1450
CAAGACTAGCGGATGCAGCAGGGATACTCGAGGTGCCCCAGTTGATGTC

      1460      1470      1480      1490      1500
CCATCACTGTTCATGCTATGGTCCCAGATTGGTGGCTACGCCCAATATAAA
20
      1510      1520      1530      1540      1550
TCTCAGCATGCAGTTCCGCCTGCATGATCATCCCCAGGACGCCCGCAGCA

      1560      1570      1580      1590
GAAATGCTTCACATCCTCTGTCAAGGCACTCCCTTTGAAGTA
  MetLeuHisIleLeuCysGlnGlyThrProPheGlu
25

```

30

Beispiel 19: Konstruktion des Plasmides pBC2001 und Expression des pat-Gens in E.coli:

a) Konstruktion einer cDNA-Genbank von *Penicillium chrysogenum*:

35 5 µg der poly(A)⁺-RNA, deren Isolierung und Reinigung in Beispiel 10 beschrieben ist, wird mit Hilfe von Reverser Transkriptase mit einem oligo dT-Primer in Gegenwart der vier Desoxynukleosidtriphosphate in eine komplementäre einzelsträngige DNA umgesetzt. Durch die Enzyme RNaseH und DNA-Polymerase wird daraus ein doppelsträngiges Molekül gebildet (Gubler und Hoffman, Gene 25, 263, 1983). Nach dem Anfügen von geeigneten EcoRI-Adaptoren, wozu die Enzyme Polynukleotidkinase und T4-DNA-Ligase

40 verwendet werden, erhält man eine lineare doppelsträngige cDNA, die in Kloniervektoren eingebaut werden kann. Für diese Umsetzungen läßt sich günstigerweise ein käuflicher cDNA-Synthese-Kit (Fa. Pharmacia) verwenden, der die wichtigsten Enzyme und das Adapter-Oligonukleotid enthält. Die Durchführung der Reaktionen erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Die so synthetisierte doppelsträngige cDNA mit EcoRI-Enden wird in den Vektor gt10 (Huynh et al., DNA cloning, Glover, D.M. ed., Oxford, 1, 49, 1985)

45 einkloniert. 80 µl der cDNA-Präparation werden dazu mit 16 µl gt10-DNA (8 µg) vermischt, die vorher mit EcoRI gespalten und mit alkalischer Phosphatase behandelt wurde (Maniatis et al.). Nach Zugabe von 3 µl 3 M Natriumazetat (pH 5,2) und 250 µl Ethanol wird für 20 Stunden bei -20° gefällt und anschließend in 60 µl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA gelöst. Die Ligation erfolgt in 66 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM Spermidin, 10 mM MgCl₂, 15 mM Dithiothreitol, 0,2 mg/ml BSA, 0,5 mM ATP durch die Zugabe von 6 U

50 T4-DNA-Ligase bei 12° für 20 Stunden. Das Ligationsgemisch wird mit Proteinextrakten ("packaging mixe") in vitro verpackt und mit dem E.coli-Stamm C600hfl (Huynh et al.) ausplattiert. Die erforderlichen Methoden sind beschrieben (Maniatis et al.). In einem solchen Versuch können mehr als 5.10⁵ Plaques erhalten werden.

55 b) Isolierung von pat-spezifischen cDNA-Klonen und Suklonierung in M13mp19.

Mit etwa 40000 Plaques der *Penicillium chrysogenum* cDNA-Genbank wird eine Plaquehybridisierung durchgeführt, wie sie in Beispiel 13 beschrieben ist. Als Indikatorstamm wird der E.coli-Stamm C600hfl

(Huynh et al.) verwendet. Die DNA der rekombinanten gt10-Phagen wird nach einer partiellen Spaltung mit EcoRI mit EcoRI-gespaltener M13mp19-RF-DNA ligiert und transfiziert. Einzelne Klone rekombinanter M13mp19-RF-DNA werden durch Restriktionskartierung identifiziert und bestätigt.

- 5 c) Ortspezifische Mutagenese der DNA des rekombinanten M13mp19 Klonen zur Einfügung einer NcoI-Schnittstelle.

Es wird ein 41mer Oligonukleotid mit folgender Sequenz synthetisiert:

5'-TCCGACCCGCAAGCCATGTTTACATCCTCTGTCAAGGC-3'

10

Die DNA-Sequenz ist gegenüber der DNA-Sequenz der pat-cDNA so verändert, daß eine NcoI-Schnittstelle entsteht, die das ATG einschließt, das mit dem N-terminalen Methioninrest korrespondiert. Rechts davon sind 20, links davon 15 Nukleotide identisch mit der pat-cDNA-Sequenz. 5 pmol des phosphorylierten
 15 Oligonukleotides und 0,5 pmol der einzelsträngigen M13mp19-DNA werden gemischt und in 10 µl 20 mM Tris-HCl(pH7,5), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl für 5 Minuten auf 65° und für 20 Minuten auf 42° erwärmt. Die Behandlung mit Klenow Polymerase, T4-DNA-Ligase und S1-Nuklease erfolgt nach Egthedarzadeh und Henikoff (Nucl. Acids Res. 14, 5115, 1986): 10 µl Lösung mit 2 Einheiten Klenow Polymerase und 3 Einheiten T4-DNA-Ligase in 20 mM Tris-Cl (pH7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 0,8 mM von jedem
 20 der vier dNTPs, 1 mM ATP, 1 Stunde bei 42°. Die Reaktion wird durch die Zugabe von EDTA abgestoppt (Endkonzentration 25mM) und 10 Minuten auf 70° erhitzt. Nach einer Ethanol-fällung wird das Pellet in 10 µl Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA gelöst. Nach der Zugabe von 15 µl 30 mM Kaliumazetat (pH 4,6), 0,25 M NaCl, 1 mM ZnCl₂, 5% Glycerin, 7 Einheiten S1 Nuklease wird 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Transfektion eines geeigneten E.coli-Stammes (z.B. JM101; Yanisch-Perron et al., Gene 33, 103,
 25 1985) mit dem Reaktionsansatz und der Isolierung von RF-DNA können die veränderten DNAs durch Spaltung mit NcoI identifiziert werden.

d) Klonierung des NcoI-HindIII-Fragmentes mit der pat cDNA in das Plasmid pKK233-2.

30 Die RF-DNA des rekombinanten M13-Klonen, der die pat cDNA mit der eingeführten NcoI-Schnittstelle enthält, wird mit NcoI und HindIII gespalten. Das Plasmid pKK233-2 (Amann und Brosius, Gene 40, 183, 1985) wird ebenfalls mit NcoI und HindIII gespalten. Die Ligation der beiden DNAs erfolgt in 66 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM Spermidin, 10 mM MgCl₂, 15 mM Dithiothreitol, 0,2 mg/ml BSA, 0,5 mM ATP durch die Zugabe von 2 U T4-DNA-Ligase bei 14° für 20 Stunden. Nach einer Transformation eines geeigneten
 35 E.coli-Stammes (z.B. JM83; Yanisch-Perron et al., Gene 33, 103, 1985) werden einzelne Plasmid-DNAs isoliert und durch Restriktionskartierung charakterisiert. Das Plasmid, das das NcoI-HindIII-Restriktionsfragment mit der pat cDNA im Plasmid pKK233-2 enthält, wird pBC2001 genannt.

c) Expression des pat-Gens in E. coli

40

E.coli RB791 (Amann und Brosius, Gene 40, 183, 1985) wird mit pBC2001 transformiert. 50 ml LB Medium (pro Liter: 10 g Bacto Tryptone, 8 g NaCl, 5 g Hefe Extrakt; pH 7,5 wird mit NaOH eingestellt) werden mit einer Einzelkolonie des Stammes RB791 (pBC2001) angeimpft und bei 37° bei 200 Upm geschüttelt, bis eine optische Dichte von 0,5 erreicht ist (gemessen bei 600 nm). 5 ml einer 0,1 M IPTG
 45 (Isopropyl-β-D-thiogalactosid) werden zugegeben. Anschließend wird weitere 3 Stunden bei 37° und 200 Upm geschüttelt. Die Zellen werden dann abzentrifugiert (10 Minuten, 5000 upm, 20° Beckman JA20) und für einen Nachweis des in E.coli exprimierten Proteins aufgearbeitet. Dieser Nachweis kann dann durch eine SDS Polyacrylamidgelelektrophorese des E.coli Gesamtproteins, durch einen Western-Blot mit Hilfe von PAT-spezifischen Antikörpern oder durch einen enzymatischen Nachweis erfolgen.

50

Beispiel 20: Transformation des pat-Gens nach Penicillium chrysogenum

a) Konstruktion des Plasmides pBC2002:

55

Des Plasmid pHS103 (Kolar et al., Gene 62, 127, 1988) wird mit EcoRI vollständig gespalten und in Gegenwart von EcoRI-Sall gespaltenen M13mp19-RF-DNA wieder ligiert (66-mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM Spermidin, 10 mM MgCl₂, 15 mM Dithiothreitol, 0,2 mg/ml BSA, 0,5 mM ATP durch die Zugabe von 2 U T4-DNA-Ligase bei 14° für 20 Stunden). Nach einer Transformation steht damit ein Plasmid zur Verfügung,

das sich für die Klonierung von Sall-Fragmenten eignet. Dieses Plasmid wird mit Sall gespalten, ebenso ein rekombinantes Plasmid mit einem 4,8 kb großen Sall Fragment mit dem vollständigen pat-Gen (siehe Beispiel 13). Nach Ligation und Transformation läßt sich ein Plasmid identifizieren, das aus dem modifizierten pHS103 und dem 4.8 kb Sall-Fragment mit dem pat-Gen besteht; dieses Plasmid wird pBC2002 genannt.

b) Isolierung von *Penicillium chrysogenum* Protoplasten und Transformation:

2 ml einer dichten Sporensuspension von *Penicillium chrysogenum* P2/ATCC werden zu 200 ml sterilem Minimalmedium für *Penicillium chrysogenum* in einem 1 l Erlenmeyerkolben gegeben (pro Liter: 3 g NaNO₃, 0,5 g MgSO₄·7H₂O, 0,5 g KCl, 10 mg FeSO₄·7H₂O, 20 g Saccharose, 13 g KH₂PO₄ und 1 ml Spurenelementmischung (für 100 ml: 0,1 g FeSO₄·7H₂O, 0,9 g ZnSO₄·7H₂O, 0,04 g CuSO₄·5H₂O, 0,01 g MnSO₄·H₂O, 0,01 g H₃BO₃, 0,01 g Na₂HPO₄·2H₂O)) und 20 Stunden bei 25° und 250 Upm geschüttelt. Die Isolierung und Reinigung der Protoplasten erfolgt nach Yelton et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 1470, 1984).

Das Mycel wird abzentrifugiert und zweimal in 0,9 M NaCl gewaschen und in 20 ml 0,9 M NaCl mit 5 mg/ml Novozyme 234 resuspendiert. Inkubation bei 30° für 1,5 Stunden. Der Reaktionsansatz wird zentrifugiert (Beckman Kùhlzentrifuge JS 7.5, 1500 Upm, 20°, 5 Minuten). Das Protoplastenpellet wird zweimal mit 0,9 M NaCl und anschließend einmal in 1,0 M Sorbitol, 50 mM CaCl₂ gewaschen. Die Protoplasten werden in 0,2 ml 1,0 M Sorbitol, 50 mM CaCl₂ resuspendiert (etwa 0,5 bis 5·10⁸ Protoplasten/ml).

5 µg pBC2002 in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA werden für die Transformation eingesetzt und zur Protoplastensuspension gegeben. 12,5 µl 25 % Polyethylenglycol (BDH), 10mM Tris-HCl pH 7,5, 50mM CaCl₂ (sterilfiltriert) werden zugegeben. Inkubation für 20 Minuten im Eis. 0,5 ml 12,5 µl 25 % Polyethylenglycol (BDH), 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM CaCl₂ (sterilfiltriert) werden zugegeben: die Mischung wird für 5 Minuten bei 20° inkubiert. Nach der Zugabe von 1 ml 0,9 M NaCl, 50 mM CaCl₂ wird durchmischt und zu 3 ml Minimalmedium mit 0,5 % Agar und 20 µg Phleomycin/ml (48°) gegeben. Ausplattiert werden die Transformationsansätze auf Minimalmedium-Platten (Minimalmedium wie oben beschrieben, mit 1,6 % Agar und 20 µg Phleomycin/ml).

DNA, die aus verschiedenen Kolonien isoliert wird, kann durch Southernhybridisierung mit radioaktiv markierter pat-DNA charakterisiert werden. Unter den Transformanten lassen sich so diejenigen herausfinden, die auf Grund von multiplen Integrationsereignissen mehrere Kopien des pat-Gens enthalten. Solche Stämme werden anschließend durch Testfermentationen auf eine erhöhte Penicillinbildung getestet.

Tabelle 1: Aufschluß und Fällung der thiolabhängigen PAT aus *Penicillium chrysogenum* P2/ATOC 48271

Reinigung	Aufschluß- dauer (min)	Gesamt- volumen (ml)	Protein (mg ges.)	Protein (mg/ml)	Mikrobiologische 6-APA-PaCoA-Acetyltransferase-Aktivität (mm HH ϕ gegen BC 248)							
					1) ÜST unverdünnt				ÜST 1:10			
					sofort	30'	30' + Penase	sofort	30'	30' + Penase	sofort	30' + Penase
Zellaufschluß mit Dyno mill Type KDL (1766 g Bfm = 220 g TS in 3.5 l) 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.5 + 5 mM DTT + 0.1% Triton X 100 + 0.1 mM PMSF 600 ml Stahlmahlbehälter 510 ml 500-750 μ m Glasperlen Im kont. Betrieb: Drehzahl: 2000 Upm (= 6.7 m/sek) Reibspaltbreite: 0.1 mm Flußrate Mahlgut = 30 l/h Temp. Mahlgut VL 2/3°C RL 9°C Temp. Kühlung VL -20/-8°C RL -5/-1°C	0	4900	676	0.138	0	0	0	0	0	0	0	0
	30		20776	4.24	Spur	18.0	0	0	24.4	0	0	Spur
	60		25431	5.19	Spur	17.9	0	Spur	27.0	0	0	15.7
	90		29204	5.96	15.2	22.0	0	13.8	29.9	0	0	16.5
	120		29302	5.98	Spur	17.1	0	0	24.8	0	0	0
ÜST nach Nukleinsäurefällung mit 0.5% CTAB		4650	12927	2.78	14.4	26.0	0	0	25.8	0	0	0
Proteinpräzipitat mit 50 GV % Ammonsulfat		480 (= 544 g)	10965	22.8	27.4 ²⁾	28.8	0	18.4	28.2	0	16.1	27.1

1) Die unverdünnten Aufschlußproben wurden vor der Aktivitätstestung über PD 10 Säulen pufferausgetauscht (Abtrennung des Restgehalts an Penicillin V.

2.5 ml ÜST-Probe mit 3.5 ml 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.5 + 1 mM DTT)

2) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Präzipitat vor Aktivitätstestung mit 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.5 + 1 mM DTT 1:5 verdünnt

Penase = Penicillinase

**Tabelle 2: Stabilität bzw. Aktivität der thiolabhängigen PAT aus *Penicillium chrysogenum* P2/ATCC 48271
in Abhängigkeit von der Temperatur, Zeit, pH-Wert und Stabilisatorzusätzen**

Testung	sofort			24 h bei +4°C			24 h bei -20°C		
	sofort			sofort			sofort		
	sofort	30'	30'+ Penase	sofort	30'	30'+ Penase	sofort	30'	30'+ Penase
Stabilisierungskonditionen Mikrobiologische 6-APA-PaCoA Acylierungsaktivität (mm HH $\bigcirc$ gegen <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341/BC 85)									
Aktivierung	ohne Zusatz	11	15.5	0	-	0	-	-	0
	+ 1 mM DTT	23.5	37.1	0	0	0	15	38	0
	+ 10 mM DTT	22.7	39.0	0	16.6	0	16	33	0
	+ 10 mM B-ME	15.4	27.8	0	0	0	Spur	28.3	0
	+ 10 mM MgCl ₂	9.8	17.1	0	0	0	18.5	15	0
	+ 2 mM EDTA	0	16.0	0	-	0	-	-	0
	+ 1 mM DTT + 10 mM MgCl ₂	26.9	36.7	0	0	0	12.2	37	0
	+ 2 mM EDTA + 10 mM MgCl ₂	16.3	25.4	0	0	0	Spur	23	0
	+ 5% Sorbit + 1 mM DTT + 2 mM EDTA + 1 mM PMSF	26.0	38.6	0	0	0	11.3	33	0
	+ 5% Sorbit + 1 mM DTT + 1 mM PMSF	25.5	36.6	0	0	0	16.8	36	0
pH-Profil	0.1 M HEPES	26.6	37.3	0	0	0	12.5	33.5	0
	0.1 M NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄	0	17.3	0	-	0	-	-	0
	0.1 M NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄	22.1	32.7	0	0	0	0	29.3	0
	0.1 M NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄	33.8	35.0	0	0	0	17	36.5	0
	0.1 M TRIS/HCl	14.3	19.6	0	0	0	0	16	0
	0.1 M TRIS/HCl	0	Spur	0	-	0	-	-	0
Inhibierung	ohne Zusatz	22.6	33.6	0	Spur	0	11.6	34	0
	+ 2 mM PMSF	22.1	32.2	0	0	0	13.8	27	0
	+ 2 mM DIPFP	22.6	34.5	0	0	0	10	35	0
	+ 2 mM 2,2'-Bipyridyl	0	0	0	-	0	-	-	0
	+ 2 mM Hydroxychlorin	n.	34.5	0	0	0	13.5	38	0
	+ 2 mM o-Phenanthrolin	18.9	29.9	0	Spur	0	11	33	0
	+ 2 mM N-Ethylmaleimid	0	0	0	-	0	-	-	0
	+ 2 mM Jodacetamid	0	0	0	-	0	-	-	0
	+ 2 mM 4-HydroxymercuroI-Na-benzoat	19.4	32.3	0	0	0	12.2	39	0

Tabelle 2: Fortsetzung

Testung	sofort			24 h bei +4°C			24 h bei -20°C		
Stabilisierungskonditionen	Mikrobiologische 6-APA-PaCoA Transacylierungsaktivität (mm HH Ø gegen Micrococcus luteus ATCC 9341/BC 85)								
	sofort	30'	30' + Penase	sofort	30'	30' + Penase	sofort	30'	30' + Penase
Stabilisierung									
ohne Zusatz	21.5	33.4	0	0	Spur	0	15.2	38	0
+ 5% Sorbit	23.3	34.1	0	0	12.2	0	16.3	38	0
+ 20% Sorbit	21.9	34.2	0	0	12	0	15.2	37	0
+ 1 mM PMSF	22.0	33.7	0	0	Spur	0	15	40	0
+ 1% BSA	Spur	20.0	0	0	0	0	0	18	0
+ 10% Glycerin	22.0	33.1	0	0	11.5	0	15.2	38	0
+ 5% Mannit	24.0	36.2	0	0	Spur	0	16.8	38	0
+ 100 µg 6-APA/ml	26.8	35.4	0	15	24	0	17.2	38	0
	µg/ml Penicillin V Standard			mm HH Ø gegen BC 85					
	2			27.4					
	1.5			24.7					
	1.0			23.4					
	0.5			18.4					
	0.25			11.9					

Enzym: PAT-Ammonsulfatpräzipitat

Lagerung und Testung → 1 + 10 mit 0.1 M HEPES Reaktionspuffer pH 7.5 unter verschiedenen Stabilisierungskonditionen

Tabelle 3: Temperaturstabilität der PaCoA-6-APA-Acyltransferaseaktivität aus *Penicillium chrysogenum*

DTT (mM)	Inkubations- dauer	-196° C			-20° C			+4° C			RT			37° C		
		sofort	30'	30'+ Penase	sofort	30'	30'+ Penase	sofort	30'	30'+ Penase	sofort	30'	30'+ Penase	sofort	30'	30'+ Penase
1	sofort	14	40	0	14	40	0	14	40	0	14	40	0	14	40	0
	1 h	14	36	0	Spur	38	0	Spur	38	0	10	37	0	0	Spur	0
	4 h	12	37	0	17	36	0	12	36	0	0	16	0	0	0	0
	26 h	17	33	0	17	35	0	10	32	0	Spur	14	0	0	0	0
	120 h	26	32	0	23	34	0	0	Spur	0	0	0	0	0	0	0
10	sofort	24	40	0	24	40	0	24	40	0	24	40	0	24	40	0
	1 h	15	35	0	11	35	0	14	34	0	13	34	0	0	17	0
	4 h	-	-	-	12	34	0	11	32	0	11	28	0	0	0	0
	26 h	18	32	0	17	34	0	11	27	0	0	Spur	0	0	0	0
	120 h	-	-	-	28	32	0	0	Spur	0	0	0	0	0	0	0

Enzym: AS-Präzipitat / 1:20 mit RP verdünnt, zentrifugiert, ÜST → Test

Lagerung: 0,1 m PP pH 7,5 inklusive 1 bzw. 10 mM DTT

Tabelle 4: Substratspezifität der gereinigten thiolabhängigen PAT aus *Penicillium chrysogenum* P2/ATCC 48271 (aktive Fraktion AL 278/2 nach Affinitätschromatographie)

Substrat		Produkt	mittels HPLC bestimmte spezifische Enzymaktivität (mU/mg Protein) A1 278/2
Acylakzeptor	Acylendonator		
Isopenicillin N	PaCoA	Penicillin V	148
Isopenicillin N	PeCoA	Penicillin G	80
6-APA	PaCoA	Penicillin V	393
6-APA	PeCoA	Penicillin G	329
7-ADCA	PaCoA	3-Desacetoxy- cephalosporin V	49
7-ACA	PaCoA	Cephalosporin V	0
Cephalosporin C	PaCoA	Cephalosporin V	0
Penicillin G	PaCoA	Penicillin V	25
Penicillin V	PeCoA	Penicillin G	99
H ₂ O	Isopenicillin N	6-APA	150
H ₂ O	Penicillin V	6-APA	75
H ₂ O	Penicillin G	6-APA	17
H ₂ O	7-Glutaryl-APA	6-APA	106

Abbildung 1: Reinigung der thiolabhängigen PAT aus *Penicillium chrysogenum* P2/ATCC 48271

Chromatofokussierung der affinitätschromatographisch hergestellten PAT-Enzympräparation AL 278/2 auf Mono P = AL 310

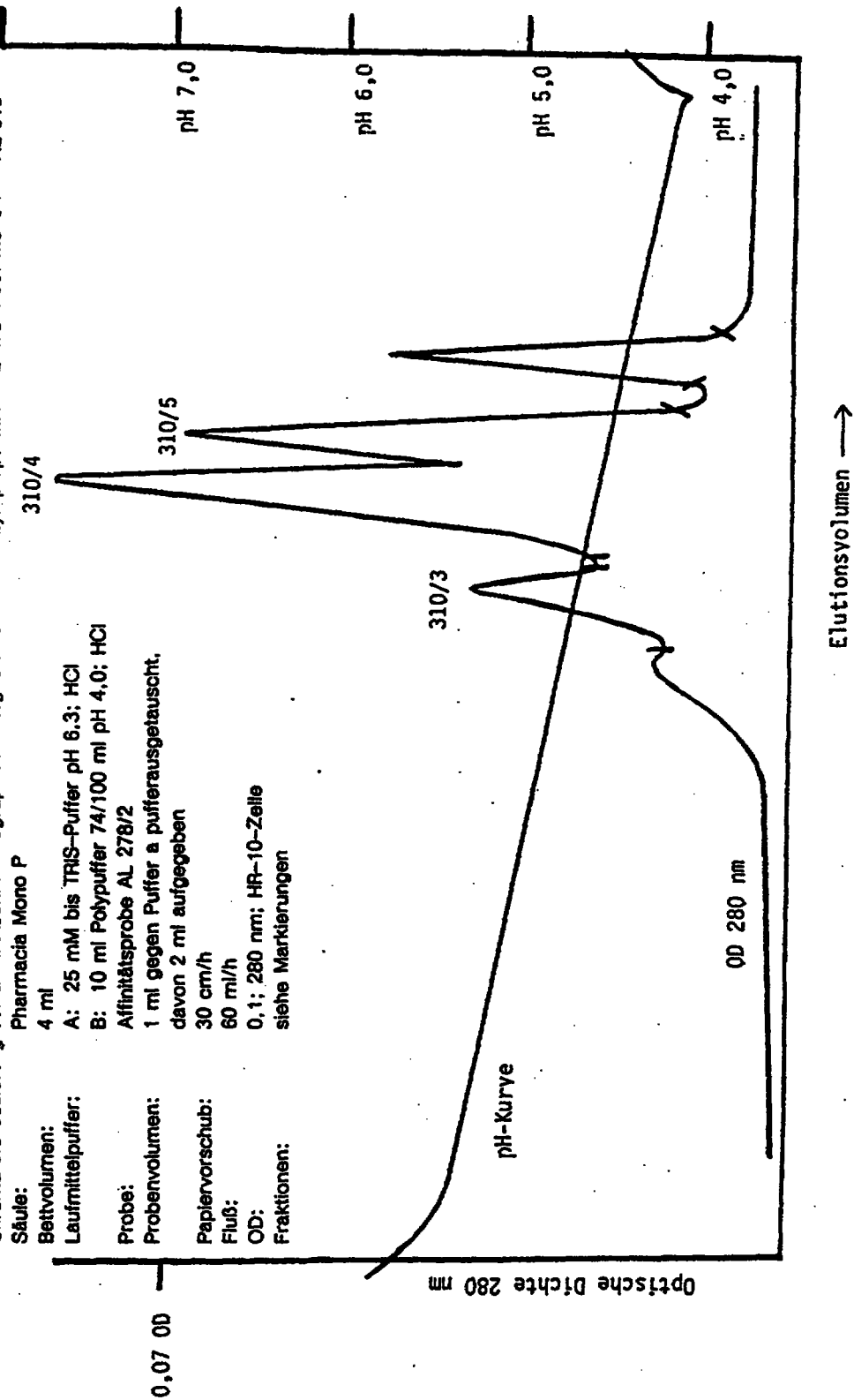


Abbildung 2: Reinigung der thiolabhängigen PAT aus *P. chrysogenum* P2/ATCC 48271

RPC (MN Nucleosil 300-5/C4) von Fraktionen 3-5 aus AL 310/Chromatofokussierung des aktiven Pools AL 278/2 (nach Affinitätschromatographie) auf Mono P

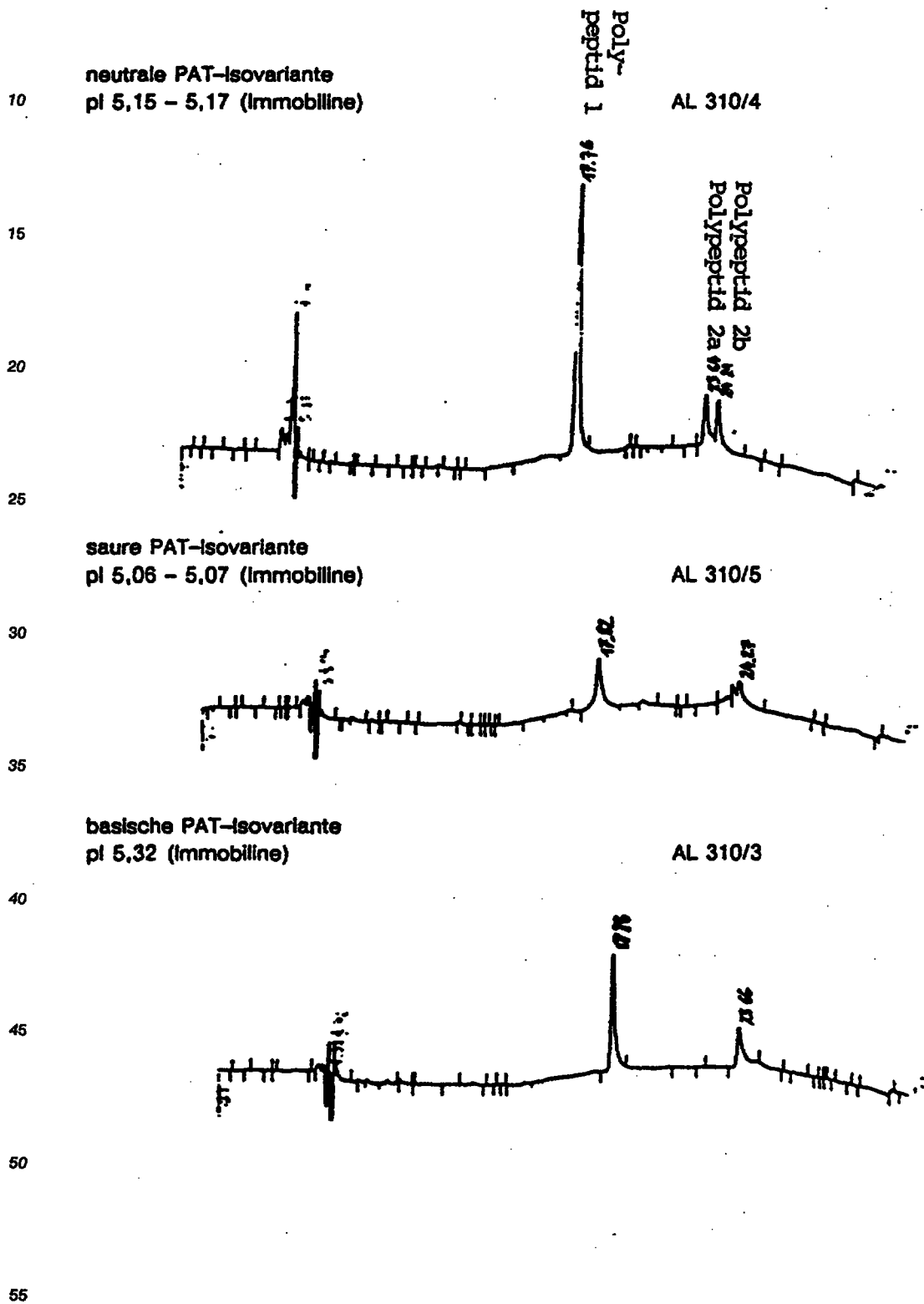
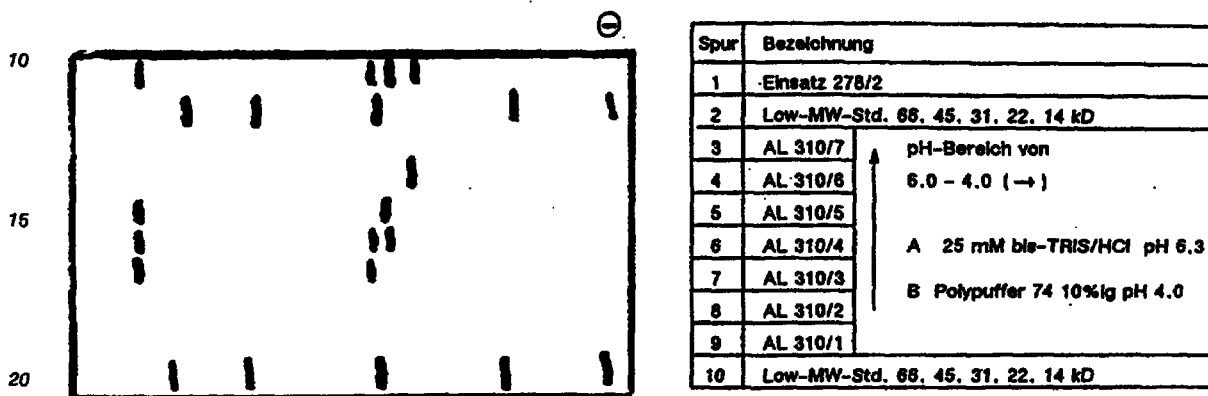


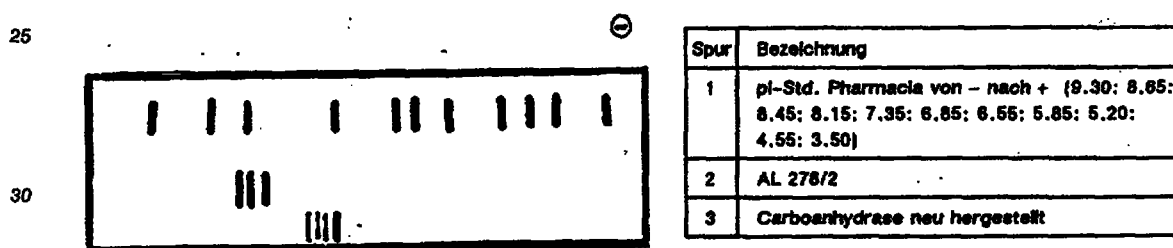
Abbildung 3: Elektrophoretische Charakterisierung der thiolabhängigen PAT aus *Penicillium chrysogenum* P2/ATCC 48271

Gradienten SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und isoelektrische Fokussierung auf Ampholine (pH 3,5 – 9,5) bzw. Immobiline (pH 4,5 – 6,5) von AL 310/Chromatofokussierung der affinitätschromatographisch hergestellten PAT-Enzympräparation AL 278/2 auf Mono P.

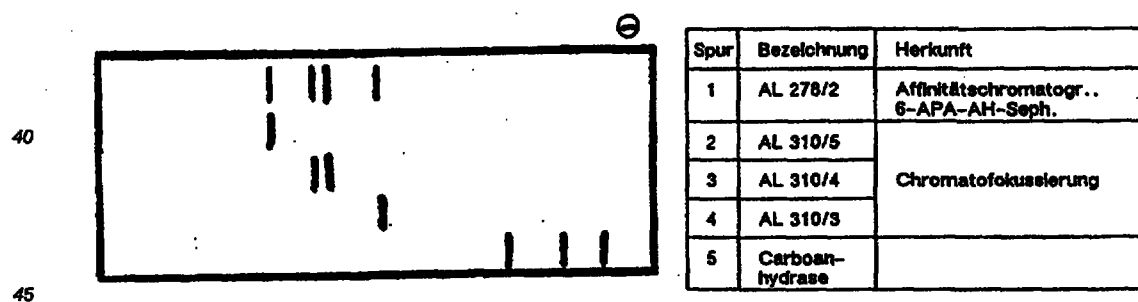
3a: Gradienten SDS-PAGE (8–20% T)



3b: Ampholine (pH 3,5 – 9,5)



3c: Immobiline (pH 4,5 – 6,5)



5

Abbildung 4: Restriktionskarte aus *Penicillium chrysogenum*, die das *pat*-Gen umfaßt.

10

Restriktionskarten sind ungefähre Wiedergaben von Restriktionsschnittstellen in DNA-Molekülen. Die gezeichneten Abstände der Restriktionsschnittstellen sind proportional zu den tatsächlichen Abständen, aber die tatsächlich beobachteten Abstände können sich davon unterscheiden. Nicht alle Restriktionsschnittstellen sind angegeben, es können durchaus weitere Schnittstellen vorhanden sein.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

A = Sequenz aus den Beispielen 14 und 15

B = Sequenz aus dem Beispiel 18

1972

A

1592

B

ips

1 kb

EcoRI

XhoI

BamHI

EcoRI

BamHI

SalI

SalI

EcoRI

XhoI

BamHI

SalI

EcoRI

XhoI

BamHI

SalI

BamHI

SalI

EcoRI

BamHI

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

Abbildung 5: Anordnung und Sequenz der ausgewählten Oligonukleotidgemische

5 10 15 20
ThrThrAlaTyrCysGlnLeuProAsnGlyAlaLeuGlnGlyGlnAsnTrpAspPheSer Aminosäuresequenz Polypeptid 1

5'-ACNACNGCCTATTGTCACACTNCCNAATGGNGCCTNCAAGCNAATAATGGGATTTTTTACT-3'
G G GTTA C TTA G C C C C C TCN

3'-TGGTGACGGGATAACAGTTGAAGGTTTACC.....GTTTGGACCCCTAAAAA-5'
C G

GTTTGAACCCCTAAAAA
C G

GTTTGGACCCCTGAAAAA
C G

GTTTGAACCCCTGAAAAA
C G

Oligonukleotidgemisch 1

Oligonukleotidgemisch 2

Oligonukleotidgemisch 3

Oligonukleotidgemisch 4

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Zusammenhänge zwischen den sequenzierten Bereichen (D,F,G), den Oligonukleotiden (C,E), dem Polypeptid 1 der PAT und der Sequenz des daraus abgeleiteten kodierenden DNA-Stranges (B).

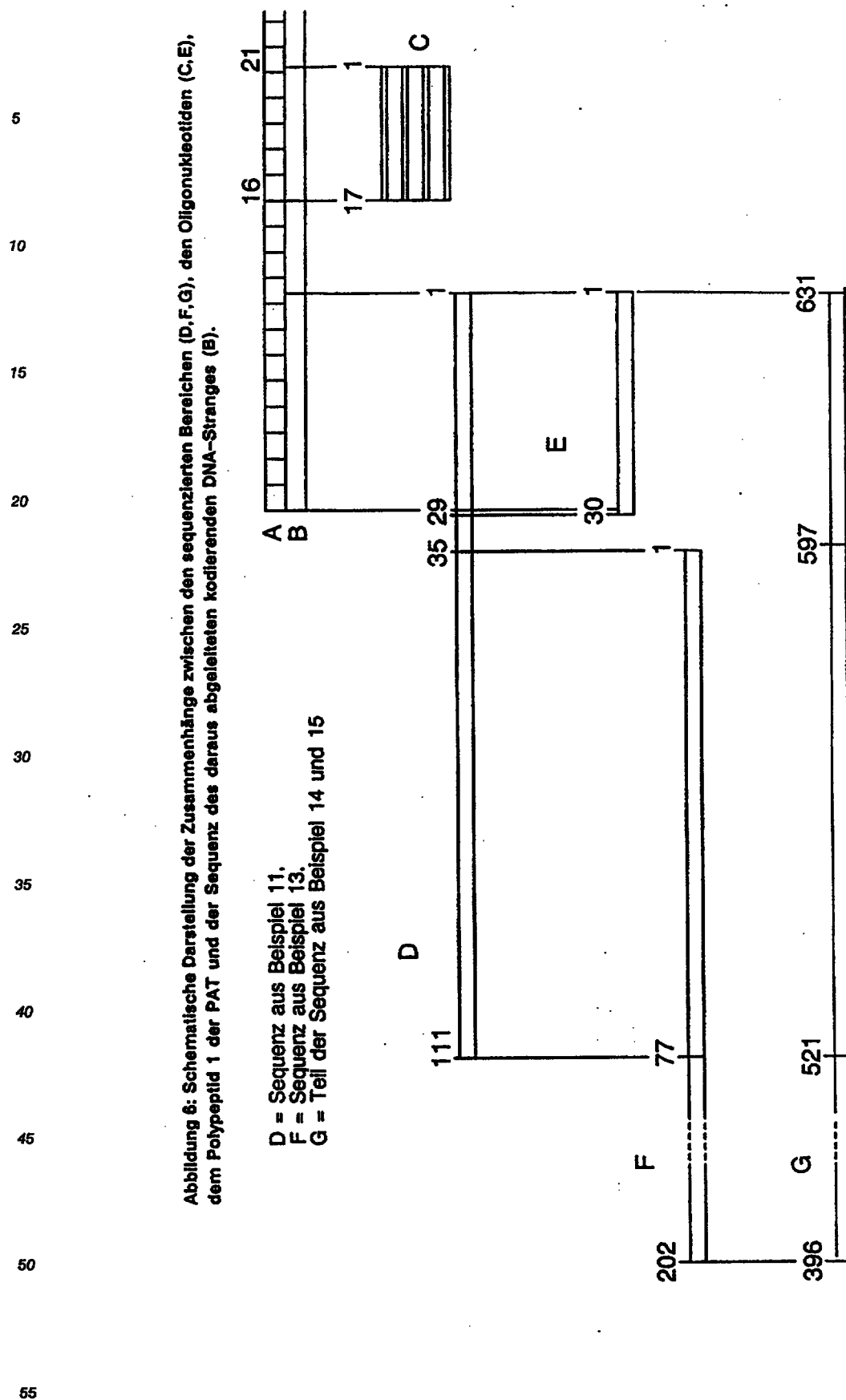
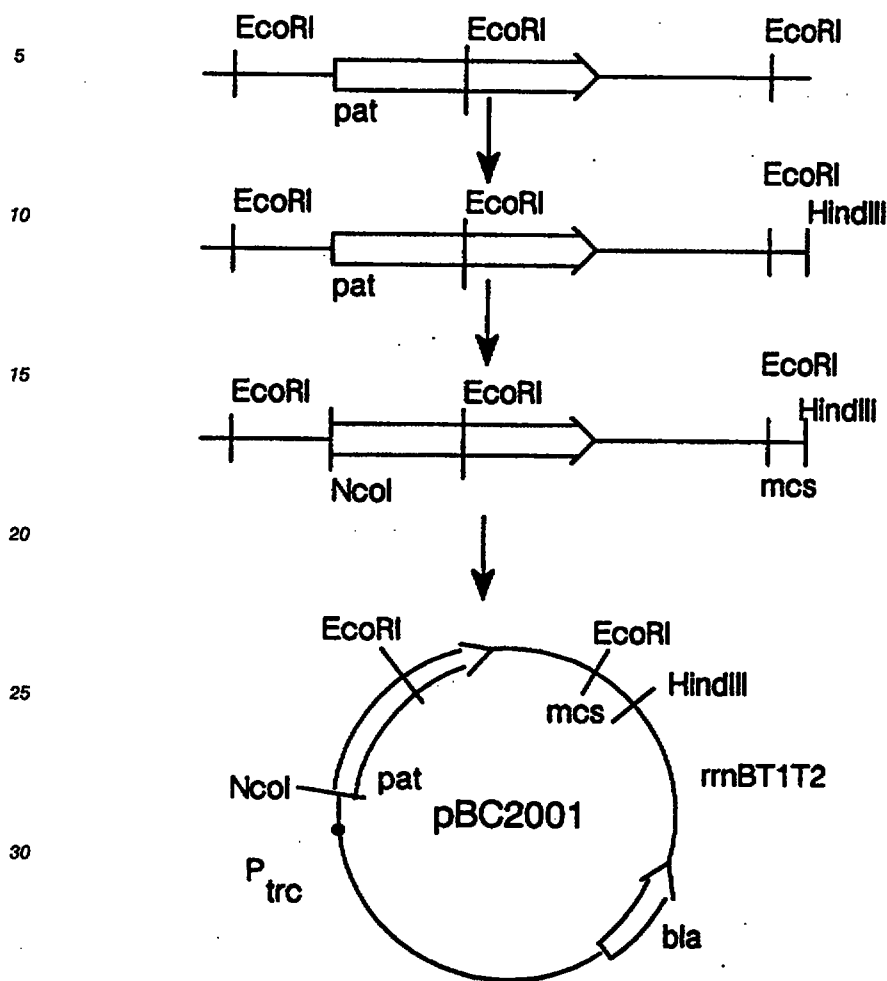


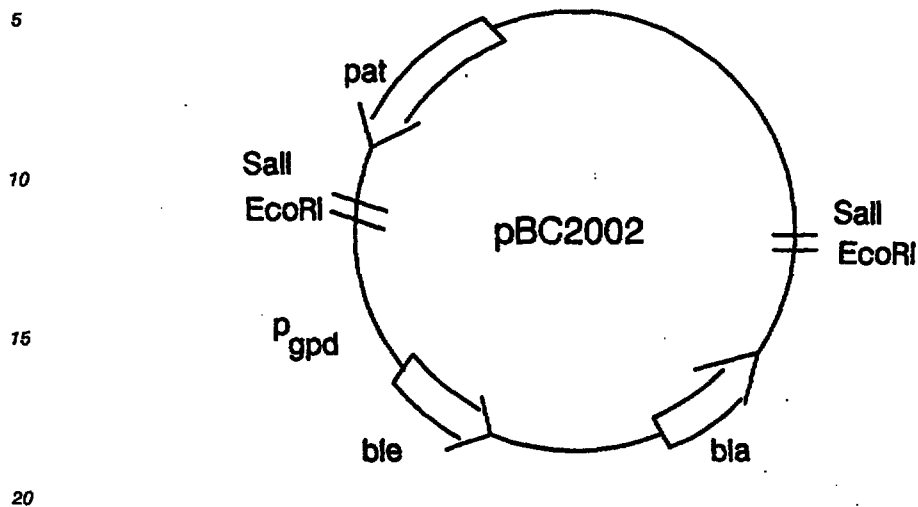
Abbildung 7: Konstruktion des Plasmides pBC2001.



Ausgehend von der DNA eines vollständigen *pat*-cDNA-Klons (oberste Zeile), werden die beiden *EcoRI*-Fragmente in den Vektor M13mp19 einkloniert. Mit Hilfe eines Oligonukleotides wird eine *NcoI*-Schnittstelle eingeführt. Das *NcoI*-*HindIII*-Fragment wird dann in den Expressionsvektor pKK233-2 eingebaut.

EcoRI, *HindIII*, *NcoI* markieren die Schnittstellen der entsprechenden Enzyme; *mcs* multiple Klonierungsstelle ("multiple cloning site") aus M13mp19; *p trc trp-lac* Fusionspromotor aus pKK233-2; *rrnBT1T2* Transkriptionsterminator aus pKK233-2; *bla* Ampicillin-Resistenzgen aus pKK233-2.

Abbildung 8: Das Plasmid pBC2002



Die Konstruktion dieses Plasmides geht von pHS103 (Kolar et al.) aus, das eine Fusion des *Aspergillus nidulans* Promotors *p_gpd* (Promotor des Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase Gens) mit dem Phleomycin-Resistenzgen (*ble*) enthält. Das Ampicillin-Resistenzgen (*bla*) dient als Selektionsmarke in *E.coli*. In pHS103 wird das 4,8 kb *Sall*-Fragment mit dem *Penicillium chrysogenum* *pat*-Gen eingebaut. *Sall*, *EcoRI* sind die Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme.

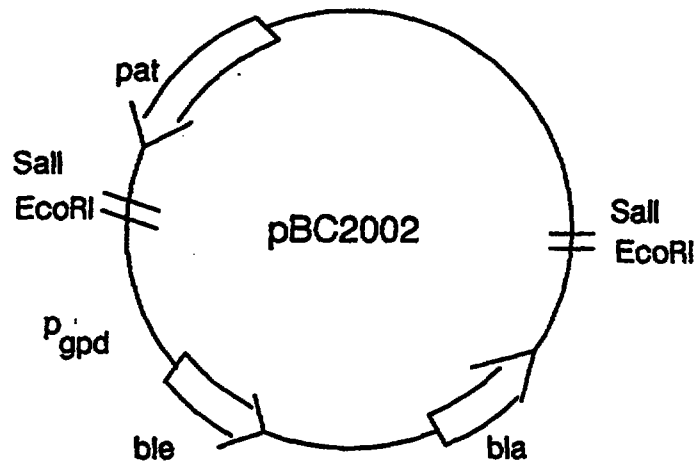
Patentansprüche

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. Eine DNA-Sequenz in gereinigter und isolierter Form, die für das Enzym Penicillinacyltransferase, das die folgende Sequenz aufweist, kodiert



Abbildung 8: Das Plasmid pBC2002



Die Konstruktion dieses Plasmides geht von pHS103 (Kolar et al.) aus, das eine Fusion des *Aspergillus nidulans* Promotors *p_gpd* (Promotor des Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase Gens) mit dem Bleomycin-Resistenzgen (*ble*) enthält. Das Ampicillin-Resistenzgen (*bla*) dient als Selektionsmarke in *E.coli*. In pHS103 wird das 4,8 kb *Sall*-Fragment mit dem *Penicillium chrysogenum pat*-Gen eingebaut. *Sall*, *EcoRI* sind die Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme.

Patentansprüche

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. Eine DNA-Sequenz in gereinigter und isolierter Form, die für das Enzym Penicillinacyltransferase, das die folgende Sequenz aufweist, kodiert



	10	20
	MetLeuHisIleLeuCysGlnGlyThrProPheGluIleGlyTyrGluHisGlySerAla	
	30	40
5	AlaLysAlaValIleAlaArgSerIleAspPheAlaValAspLeuIleArgGlyLysThr	
	50	60
	LysLysThrAspGluGluLeuLysGlnValLeuSerGlnLeuGlyArgValIleGluGlu	
	70	80
10	ArgTrpProLysTyrTyrGluGluIleArgGlyIleAlaLysGlyAlaGluArgAspVal	
	90	100
	SerGluIleValMetLeuAsnThrArgThrGluPheAlaTyrGlyLeuLysAlaAlaArg	
	110	120
	AspGlyCysThrThrAlaTyrCysGlnLeuProAsnGlyAlaLeuGlnGlyGlnAsnTrp	
15	130	140
	AspPhePheSerAlaThrLysGluAsnLeuIleArgLeuThrIleArgGlnAlaGlyLeu	
	150	160
	ProThrIleLysPheIleThrGluAlaGlyIleIleGlyLysValGlyPheAsnSerAla	
	170	180
20	GlyValAlaValAsnTyrAsnAlaLeuHisLeuGlnGlyLeuArgProThrGlyValPro	
	190	200
	SerHisIleAlaLeuArgIleAlaLeuGluSerThrSerProSerGlnAlaTyrAspArg	
	210	220
25	IleValGluGlnGlyGlyMetAlaAlaSerAlaPheIleMetValGlyAsnGlyHisGlu	
	230	240
	AlaPheGlyLeuGluPheSerProThrSerIleArgLysGlnValLeuAspAlaAsnGly	
	250	260
	ArgMetValHisThrAsnHisCysLeuLeuGlnHisGlyLysAsnGluLysGluLeuAsp	
30	270	280
	ProLeuProAspSerTrpAsnArgHisGlnArgMetGluPheLeuLeuAspGlyPheAsp	
	290	300
	GlyThrLysGlnAlaPheAlaGlnLeuTrpAlaAspGluAspAsnTyrProPheSerIle	
35	310	320
	CysArgAlaTyrGluGluGlyLysSerArgGlyAlaThrLeuPheAsnIleIleTyrAsp	
	330	340
	HisAlaArgArgGluAlaThrValArgLeuGlyArgProThrAsnProAspGluMetPhe	
40	350	
	ValMetArgPheAspGluGluAspGluArgSerAlaLeuAsnAlaArgLeu.	

45 2. Eine DNA-Sequenz gemäss Anspruch 1, die folgende Sequenz umfasst:

50

55



10 20 30 40 50 60 70
 GTTGATGTCCCATCAGTGTATGCTATGCTCCAGATTGCTGCTACCGCAATATAAATCTCAGCATGCA
 80 90 100 110 120 130 140
 GTTCCOCCCTGCATGATCATCCCCAGGACCCCGTTTGTATCTCCGTCAGCCAGGTCTCACTTGTTTACCC
 5 150 160 170 180 190 200 210
 ATCTTCCGACCCGACAGAAATGCTTCACATCCTCTGTCAAGGCACTCCCTTTGAAGTAACTGCTGCAC
 220 230 240 250 260 270 280
 TGAATACCAGATTTTTCTTCTGAATCTTCCGAGTTCTGACCTGATCCAGATCCOCTACGAACATCCOCT
 290 300 310 320 330 340 350
 10 CTGCTOCCAAAGCCGTGATAGCCAGAAGCATTTGACTTCCCGCTCGATCTCATCCGAGGAAAAACGAAGAA
 360 370 380 390 400 410 420
 GACCGACGAAGACCTTAAACAGTACTCTCCAACTCGGGCCCGTGATCGAGGAAAGATCCCCAAATAC
 430 440 450 460 470 480 490
 TACGAGGAGATTCCCGCTGAGTCCCACTTCGGTCTTTCTACATTTTCTCCACCAATGCTGACCGATGAC
 15 500 510 520 530 540 550 560
 CCCCCAAAAACCAAGTATTCCAAAGCCCGCTGAACCCGATGCTCTCCGAGATTGTCTATCTTAATACCCCG
 570 580 590 600 610 620 630
 ACCGAATTTGCATACCCCGCTCAAGCCAGCCCGTGATGCTGACCACTCCCTATTCTCAACTTCCAAATG
 640 650 660 670 680 690 700
 20 GACCCCTCCAGCCGCAAACTCCGATGTACGTTAAGAGATTTTACCTCCTCATTTTATTCATCGAATTT
 710 720 730 740 750 760 770
 CCCCCGACTAATTTGCTTGTTCAGTTCTTTTCTOCCACCAAAAGACAACCTGATCCCGTTAACGATCCGT
 780 790 800 810 820 830 840
 CACCCCGGACTTCCCAACCATCAATTCATAACCGAGCGTGAATCATCCGGAAGCTTGGATTTAACACTG
 850 860 870 880 890 900 910
 25 CCGCGGTCCCGCTCAATTACAACCCCGCTTACCTTCAAGGTCTTCGACCCACCGAGTTCTTCCCATAT
 920 930 940 950 960 970 980
 TCCCTTCCCATAGCCCTCGAAAGCACTTCTCCTTCCAGCCCTATGACCCGATCGTGGACCAAGCCCGA
 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 30 ATCCCGCCACCGCTTTTATCATGCTGGCAATCGCCACGAGCATTTGCTTGAATTTCTCCCCACCA
 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 GCATCCGAAAGCAGGTCTCGACCCGAATCTAGCATGCTGCACACCAACCACTGCTTCTTACGACCG
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 CAAAAATCAGAAAGACCTCGATCCCTTACCCGACTCATCGAATCCCCACCAACCGTATCGAGTTCTCTCTC
 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 35 GACCGGTTCCAGCCACCAAAACAGCATTTGCCAGCTCTCGCCGACGAAGACAATTATCCCTTTAGCA
 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 TCTCCCGCCCTTACGAGGAGCCAAAGACGAGCCCGGACTCTGTTCAATATCATCTACGACCATCCCC
 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 40 TAGAGACCAACCGTCCCGCTTCCCGCCCGACCAACCTGATCAGATGTTTCTCATCCCGTTTGACGAG
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 CAGGACGAGAGCTCTCCCGCTCAACCCAGCGCTTTGAAGCGCTCTTCATGACGACCAATCCATCTTTTGT
 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
 45 TGTAGCTTCAACCGACTCCGTCTTCACTTCTTCCCCCGACTCCCTACCGTTTGTACCATCTGACTCATA
 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 TAAATGCTTAGCCCTACCTACCTATACCTAAGCGAGAGAACCGTAGAGTGATTAACTACCGCCCTAT
 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 AGTACCCCGATCTCTAGATAGAACATTTAGTAGAGATTACCATCCCTAAGTAATTTAAGTTGAGCATTTGT
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 50 CCGGTTTCATATTGATTTTCATCCATTATACACTCTTAATCGTTTCCCGGTAGAAOCCGNATATATACGAC



1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
 CATACCGTGTGGAGAACAGCGCTTCCCGTCTCGCTTCCCCGTACTTAAGCTATATATTCTACACGGCCAAT
 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 ACTCAATGTCCCCTTAGCACCTAACCGGCACTCTACCGTAAGTCCGGGTATATAGGTGAGAAGTCTTAA
 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960
 CACTGAAGACACCATATCACCGCTTACCCTCCACCGTACCTACTACCTTCAATATCACTCTTTCACCATG
 1970
 CACACCGTCCAC.

3. Eine DNA-Sequenz gemäss Anspruch 1 oder 2, welche die für die Transkription und Translation des *Penicillium chrysogenum* PAT Gens notwendigen Sequenzen umfasst.

4. Eine DNA-Sequenz gemäss Anspruch 3, worin die Sequenzen, die für die Transkription und Translation des *Penicillium chrysogenum* PAT Gens notwendig sind, die Sequenzen zwischen dem Isopenicillin N synthetase Gen und dem *Penicillium chrysogenum* PAT Gen sind.

5. Ein Protein, für welches die gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4 beanspruchte DNA-Sequenz kodiert, in gereinigter und isolierter Form.

6. Vektor, der eine DNA-Sequenz, die für das Enzym Penicillinacyltransferase (PAT) kodiert, enthält, worin das Enzym Penicillinacyltransferase die folgende Sequenz aufweist:

	10	20
	MetLeuHisIleLeuCysGlnGlyThrProPheGluIleGlyTyrGluHisGlySerAla	
	30	40
	AlaLysAlaValIleAlaArgSerIleAspPheAlaValAspLeuIleArgGlyLysThr	
	50	60
	LysLysThrAspGluGluLeuLysGlnValLeuSerGlnLeuGlyArgValIleGluGlu	
	70	80
	ArgTrpProLysTyrTyrGluGluIleArgGlyIleAlaLysGlyAlaGluArgAspVal	
	90	100
	SerGluIleValMetLeuAsnThrArgThrGluPheAlaTyrGlyLeuLysAlaAlaArg	
	110	120
	AspGlyCysThrThrAlaTyrCysGlnLeuProAsnGlyAlaLeuGlnGlyGlnAsnTrp	
	130	140
	AspPhePheSerAlaThrLysGluAsnLeuIleArgLeuThrIleArgGlnAlaGlyLeu	
	150	160
	ProThrIleLysPheIleThrGluAlaGlyIleIleGlyLysValGlyPheAsnSerAla	
	170	180
	GlyValAlaValAsnTyrAsnAlaLeuHisLeuGlnGlyLeuArgProThrGlyValPro	



190 200
 SerHisIleAlaLeuArgIleAlaLeuGluSerThrSerProSerGlnAlaTyrAspArg
 210 220
 5 IleValGluGlnGlyGlyMetAlaAlaSerAlaPheIleMetValGlyAsnGlyHisGlu
 230 240
 AlaPheGlyLeuGluPheSerProThrSerIleArgLysGlnValLeuAspAlaAsnGly
 250 260
 10 ArgMetValHisThrAsnHisCysLeuLeuGlnHisGlyLysAsnGluLysGluLeuAsp
 270 280
 ProLeuProAspSerTrpAsnArgHisGlnArgMetGluPheLeuLeuAspGlyPheAsp
 290 300
 15 GlyThrLysGlnAlaPheAlaGlnLeuTrpAlaAspGluAspAsnTyrProPheSerIle
 310 320
 CysArgAlaTyrGluGluGlyLysSerArgGlyAlaThrLeuPheAsnIleIleTyrAsp
 330 340
 20 HisAlaArgArgGluAlaThrValArgLeuGlyArgProThrAsnProAspGluMetPhe
 350
 ValMetArgPheAspGluGluAspGluArgSerAlaLeuAsnAlaArgLeu.

- 25 7. Vektor gemäss Anspruch 6, worin die DNA-Sequenz, die für das Enzym Penicillinacyltransferase (PAT) kodiert, die folgende Sequenz umfasst:

10 20 30 40 50 60 70
 GTTGATGTCCCATCAGTCTCATCCTATCGTCCCAGATTGGTCCCTACCCCAATATAAATCTCAOCATGCA
 30 80 90 100 110 120 130 140
 GTTCCCCCTGCATGATCATCCCCAGGACCCCGTTTGTTCATCTCCGTACCCCAAGTCTCAGTTGTTTACCC
 150 160 170 180 190 200 210
 ATCTTCCGACCCCGCAGCAAAATGCTTCACATCCTCTGTCAACCCACTCCCTTTCAAGTAAGTCTCTCCAC
 220 230 240 250 260 270 280
 35 TGAATACCAGATTTTTTCTTCTGAATCTTCCGAGTTCTGACCTGATCCAGATCCGCTACCAACATCCCT
 290 300 310 320 330 340 350
 CTGCTCCCAAAGCCGTGATAGCCAGAAOCATTGACTTCGCCCGTCCATCTCATCCGACGGAAAACGAAGAA
 360 370 380 390 400 410 420
 40 GACGGACCAAGAGCTTAAACAGGTAATCTCGCAACTCCCCCGCTGATCCGACCAAGATCGCCCAATAC
 430 440 450 460 470 480 490
 TACGAGGAGATTCCCCGTGACTCCCACTTCGGTCTTTTCTACATTTTCTCCACCAATGCTGACCGATGAC
 500 510 520 530 540 550 560
 CCCCCAAAACCAAGTATTCCAAAAGCCGCTGAACCCGATGTCTCCGAGATTGTTCATCCTTAATACCCGC
 45 570 580 590 600 610 620 630
 ACCGAATTTGCATACCCGCTCAAGCCAGCCCGTGCATCCCTCCACCACTGCCTATTGTCAACTTCCAAATG
 640 650 660 670 680 690 700
 GAGCCCTCCAGGCCAAAACCTGGATGTACGTTAAGAGATTTTACCTCCTCATTTTATTCCATCGAATTT
 710 720 730 740 750 760 770
 50 GCGCCGACTAATTTGCTTCAAGTTCTTTTCTCCACCAAAAGACAACCTGATCCCGTTAACCATCCGT
 780 790 800 810 820 830 840
 CAGCCCGACTTCCCACCATCAAATTCATAACCGAGCGCTCGAATCATCCCGAAGGTTGGATTTAACAGTG

55



850 860 870 880 890 900 910
 CCGGGCTCGCCGTCAATTACAACCCCTTCACCTTCAACGTCTTCGACCCACCGAGTTCTTCCCATAT
 920 930 940 950 960 970 980
 TGGCCTCCGCATAGCCCTCGAAAGCACTTCTCCTTCCCAGGCCTATGACCCGATCGTGGACCAAGGCCGA
 5 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 ATGCCCCGCCAGCGCTTTTATCATCGTCCGCAATGGGCAGGAGCCATTTGCTTTGGAATTCTCCCCACCA
 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 CCATCCGAAAGCAGGTGCTCGACCCCAAT.GTAGGATCGTGCACACCAACCACTGCTTGCCTTACCACCG
 10 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 CAAAAATGAGAAAGACCTCCATCCCTTACCGACTCATGGAATCCCCACCACCGTATGGAGTTCTCTCTC
 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GACCCGTTCCAGCGCACCAACAGGCATTTGCCCAGCTCTGCCCCGACGAACACAATTATCCCTTTAGCA
 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 15 TCTCCCGCCCTTACGAGGAGCGCAAGAGCAGACGCGCCACTCTGTTCAATATCATCTACGACCATGCCCC
 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TAGAGAGCCAACCGTCCCGCTTCCCGCCCGACCAACCCTCATGAGATGTTTCTCATCCCGTTTCACCAG
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 20 GAGGACGAGAGGTCTCCCTCAACCCCAACCGCTTTCAAGCCTCTTCATGACGAGCCAATGCCATCTTTGTA
 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
 TGTACCTTCAACCGACTCCGTCTTCACTTCTTCCCCCGCACTCCCTACCGTTTGTACCATCTGACTCATA
 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 TAAATGCTTAGCCCCCTACCTACACTATACCTAAGCGAGAGAACCGTACAGTGATTAACGTACCGCCCTAT
 25 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 AGTACCCCGATCTCTAGATAGAACATTTAGTAGAGATTACGATCCCTAACTAATTTAACTTGACCATTCT
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 CCCGTTTCATATTGATTTTCATCCATTATACACTCTTAATCGTTTCCCGGTAGAAGCCGNATATATACCAC
 30 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
 CATACCGTGTGGAGAACAGCGCTTCCCGTCTGCTTCCCGTACTTAACCTATATATTCTACACGCCCAAT
 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 ACTCAATGTCGCCCTTACCACCTAAGCCCGCACTCTACCGTAAGTCCCGCTCATATACGTGAGAAGTCTTAA
 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960
 35 GACTGAAGACAGGATATCACCGCTTACCCTCCACCGTACCTACTACCTTCAATATCACTCTTTCACCATG
 1970
 GACACCGTCCAC .

40

8. Vektor gemäss Anspruch 6 oder 7, der weitere Gene enthält, die für die Transkription und Translation des *Penicillium chrysogenum* PAT Gens notwendig sind.

45

9. Vektor gemäss einem der Ansprüche 6 bis 8, der weitere Gene enthält, die eine Selektion des Plasmides in β -lactamproduzierenden Mikroorganismen erlauben.

50

10. Vektor gemäss einem der Ansprüche 6 bis 9, der ein weiteres Gen enthält, das für das Enzym Isopenicillin N Synthetase kodiert.

11. Verfahren zur Herstellung des Enzyms Penicillinacylasetransferase (PAT), bestehend aus der Transformation eines Wirtes mit Hilfe eines Vektors gemäss einem der Ansprüche 6 bis 10 und der Isolierung der exprimierten PAT.

55

12. Zellen, enthaltend einen Vektor gemäss einem der Ansprüche 6 bis 10.

13. Verfahren zur Verbesserung der Herstellung eines Penicillins, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Zelle, die Penicillin herstellt, mit einem Vektor gemäss einem der Ansprüche 6 bis 10 transformieren lässt, und das Penicillin isoliert.



Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : ES, GR

1. Verfahren zur Herstellung einer DNA-Sequenz, die für das Enzym Penicillinacyltransferase (PAT) kodiert, in gereinigter und isolierter Form, dadurch gekennzeichnet, dass man die DNA-Sequenz, die für das Enzym Penicillinacyltransferase, das die folgende Sequenz aufweist

	10	20
	MetLeuHisIleLeuCysGlnGlyThrProPheGluIleGlyTyrGluHisGlySerAla	
	30	40
10	AlaLysAlaValIleAlaArgSerIleAspPheAlaValAspLeuIleArgGlyLysThr	
	50	60
	LysLysThrAspGluGluLeuLysGlnValLeuSerGlnLeuGlyArgValIleGluGlu	
	70	80
	ArgTrpProLysTyrTyrGluGluIleArgGlyIleAlaLysGlyAlaGluArgAspVal	
15	90	100
	SerGluIleValMetLeuAsnThrArgThrGluPheAlaTyrGlyLeuLysAlaAlaArg	
	110	120
	AspGlyCysThrThrAlaTyrCysGlnLeuProAsnGlyAlaLeuGlnGlyGlnAsnTrp	
	130	140
20	AspPhePheSerAlaThrLysGluAsnLeuIleArgLeuThrIleArgGlnAlaGlyLeu	
	150	160
	ProThrIleLysPheIleThrGluAlaGlyIleIleGlyLysValGlyPheAsnSerAla	
	170	180
25	GlyValAlaValAsnTyrAsnAlaLeuHisLeuGlnGlyLeuArgProThrGlyValPro	
	190	200
	SerHisIleAlaLeuArgIleAlaLeuGluSerThrSerProSerGlnAlaTyrAspArg	
	210	220
	IleValGluGlnGlyGlyMetAlaAlaSerAlaPheIleMetValGlyAsnGlyHisGlu	
30	230	240
	AlaPheGlyLeuGluPheSerProThrSerIleArgLysGlnValLeuAspAlaAsnGly	
	250	260
	ArgMetValHisThrAsnHisCysLeuLeuGlnHisGlyLysAsnGluLysGluLeuAsp	
35	270	280
	ProLeuProAspSerTrpAsnArgHisGlnArgMetGluPheLeuLeuAspGlyPheAsp	
	290	300
	GlyThrLysGlnAlaPheAlaGlnLeuTrpAlaAspGluAspAsnTyrProPheSerIle	
40	310	320
	CysArgAlaTyrGluGluGlyLysSerArgGlyAlaThrLeuPheAsnIleIleTyrAsp	
	330	340
	HisAlaArgArgGluAlaThrValArgLeuGlyArgProThrAsnProAspGluMetPhe	
45	350	
	ValMetArgPheAspGluGluAspGluArgSerAlaLeuAsnAlaArgLeu,	

durch rekombinante Methoden isolieren lässt und die isolierte DNA-Sequenz reinigen lässt.

2. Verfahren gemäss Anspruch 1, worin DNA-Sequenz die folgende Sequenz umfasst:



10 20 30 40 50 60 70
 GTTGATGTCCTCATGCTATCGTCCCAGATTGGTCCGTACGGCAATATAAATCTCACCATGCA
 80 90 100 110 120 130 140
 5 GTTCCCGCTGCATGATCATCCCCAGGACCGCGTTTGTCTATCTCCGTACGCCAGGTCTCAGTTGTTACCC
 150 160 170 180 190 200 210
 ATCTTCCGACCCCCACGAGAAATCCTTCACATCCTCTGTCAAGCCACTCCCTTTGAAGTAAGTCTGCAC
 220 230 240 250 260 270 280
 TGAATACCAGATTTTTCTCTCTGAATCTTCCGAGTTCTGACCTGATCCAGATCCGCTACGAACATCCCT
 10 290 300 310 320 330 340 350
 CTGCTCCCAAGCCGTGATAGCCAGAAGCATTGACTTCGCGCTCCATCTCATCCGAGGAAAAACGAAGAA
 360 370 380 390 400 410 420
 CACGGACGAAGAGCTTAAACAGGTAATCTCTCCAACTGCGCGCTGATCCAGCAAGATCCCCAAATAC
 15 430 440 450 460 470 480 490
 TACGAGGAGATTCCCGGTGAGTCCCACTTCGGTCTTTCTTACATTTTCTCCACCAATCTCACCAGTAC
 500 510 520 530 540 550 560
 CCCCCGAAAAACCACTATTGCAAAAGCCCGCTCAACCCGATGTCTCCGAGATTGTCTATCTTAATACCCCG
 570 580 590 600 610 620 630
 20 ACCGAATTTGCATACCCGCTCAAGCCAGCCCGCTGATCCGTCCACCACTCCCTATTCTCAACTTCCAAATG
 640 650 660 670 680 690 700
 GAGCCCTCCAGGCCCAAAACTCGGATGTACGTTAAGAGATTTTACCTCCTCATTTTATTCCATCGAATTT
 710 720 730 740 750 760 770
 CCCCCGACTAATTTGGTTGTTCAAGTTCTTTTCTGCCACCAAGAGAACCTGATCCGGTTAACGATCCGT
 25 780 790 800 810 820 830 840
 CAGCCCGGACTTCCCACCATCAAATTCATAACCGAGCGCTCGAATCATCCGGAAGGTTGGATTTAACAGTG
 850 860 870 880 890 900 910
 CCGCGCTCCCGCTCAATTACAACGCCCTTCACTTCAAGCTTTCGACCCACCCGAGTTCTTCCCATAT
 920 930 940 950 960 970 980
 30 TCCCTCCGATAGCCCTCGAAAGCACTTCTCTTCCACCCCTATGACCGGATCGTGGAGCAAGCCCGCA
 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 ATCCCCCGACCGCTTTTATCATCGTCCGCAATCGGCACGAGCCATTTCTTTTGAATTCTCCCCACCA
 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 35 GCATCCGAAAGCAGCTGCTCGACCCGAATCTAGCATCGTCCACACCAACCACTGCTTCTTCAACACCG
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 CAAAAATGAGAAAGACCTCGATCCCTTACCGGACTCATGGAATCCGACCAACCGTATGGAGTTCTCTCTC
 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GACCGGTTCCAGCCGACCAAAACAGCCATTTGCCCAGCTCTGCGCCGACGAAGACAATTATCCCTTTACCA
 40 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 TCTGCCGCGCTTACGAGGAGCCCAAGAGCAGAGCGCGGACTCTGTTCAATATCATCTACGACCATGCCCC
 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TAGAGAGCCAACCGTCCCGCTTCCCGCCCCACCAACCCTGATCAGATGTTTGTCTATCCCGTTTACCGAC
 45 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 CACGACGAGAGCTCTCCGCTCAACCCGACCGTTTGAAGCGCTTTCATGACGACCCAATGCATCTTTTGT
 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
 TGTACCTTCAACCGACTCCGTCTTCACTTCTTCCCGCCGACTCCCTACCGTTTGTACCATCTGACTCATA
 50 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 TAAATGTCTAGCCCGCTACCTACACTATACCTAAGCGAGAGAAGCGTAGAGTGATTAACGTACCGCCCTAT



1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 AGTACCCCGATCTCTAGATAGAACATTTAGTAGAGATTACGATCCCTAACTAATTTAACTTGACCATTTCT
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 CCCGTTTCATATTGATTTTCATCCATTATACACTCTTAATCGTTTCCCGGTAGAACCCGNATATATACCAC
 5 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
 CATACCGTGTGGAGAACAGCGCTTCCCGTCTGCTTCCCGTACTTAACCTATATATTCTACACCCCAAT
 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 ACTCAATGTCCCTTAACACCTAAGCCGCACTCTACCGTAACTCCCGGTATATACGTCAGAACTCTTAA
 10 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960
 CACTGAAGACACCATATCACCGCTTACCCTGCACCGTACCTACTACCTTCAATATCACTCTTTCAGCATC
 1970
 CACACCGTCCAC.

15

3. Verfahren gemäss Anspruch 1 oder 2, worin die DNA-Sequenz die für die Transkription und Translation des *Penicillium chrysogenum* PAT Gens notwendigen Sequenzen umfasst.
- 20 4. Verfahren gemäss Anspruch 3, worin die Sequenzen, die für die Transkription und Translation des *Penicillium chrysogenum* PAT Gens notwendig sind, die Sequenzen zwischen dem Isopenicillin N synthetase Gen und dem *Penicillium chrysogenum* PAT Gen sind.
5. Verfahren zur Herstellung eines Vektors, der eine DNA-Sequenz, die für das Enzym Penicillinacyltransferase (PAT) kodiert, enthält, dadurch gekennzeichnet, dass die DNA-Sequenz, die für das Enzym Penicillinacyltransferase kodiert, die folgende Sequenz aufweist:

10 20
 MetLeuHisIleLeuCysGlnGlyThrProPheGluIleGlyTyrGluHisGlySerAla
 30 40
 AlaLysAlaValIleAlaArgSerIleAspPheAlaValAspLeuIleArgGlyLysThr
 50 60
 LysLysThrAspGluGluLeuLysGlnValLeuSerGlnLeuGlyArgValIleGluGlu
 70 80
 ArgTrpProLysTyrTyrGluGluIleArgGlyIleAlaLysGlyAlaGluArgAspVal
 35 90 100
 SerGluIleValMetLeuAsnThrArgThrGluPheAlaTyrGlyLeuLysAlaAlaArg
 110 120
 AspGlyCysThrThrAlaTyrCysGlnLeuProAsnGlyAlaLeuGlnGlyGlnAsnTrp
 40 130 140
 AspPhePheSerAlaThrLysGluAsnLeuIleArgLeuThrIleArgGlnAlaGlyLeu
 150 160
 ProThrIleLysPheIleThrGluAlaGlyIleIleGlyLysValGlyPheAsnSerAla
 170 180
 GlyValAlaValAsnTyrAsnAlaLeuHisLeuGlnGlyLeuArgProThrGlyValPro
 45 190 200
 SerHisIleAlaLeuArgIleAlaLeuGluSerThrSerProSerGlnAlaTyrAspArg

50

55



210 220
 IleValGluGlnGlyGlyMetAlaAlaSerAlaPheIleMetValGlyAsnGlyHisGlu
 230 240
 AlaPheGlyLeuGluPheSerProThrSerIleArgLysGlnValLeuAspAlaAsnGly
 5 250 260
 ArgMetValHisThrAsnHisCysLeuLeuGlnHisGlyLysAsnGluLysGluLeuAsp
 270 280
 ProLeuProAspSerTrpAsnArgHisGlnArgMetGluPheLeuLeuAspGlyPheAsp
 10 290 300
 GlyThrLysGlnAlaPheAlaGlnLeuTrpAlaAspGluAspAsnTyrProPheSerIle
 310 320
 CysArgAlaTyrGluGluGlyLysSerArgGlyAlaThrLeuPheAsnIleIleTyrAsp
 15 330 340
 HisAlaArgArgGluAlaThrValArgLeuGlyArgProThrAsnProAspGluMetPhe
 350
 ValMetArgPheAspGluGluAspGluArgSerAlaLeuAsnAlaArgLeu,
 20

durch rekombinante Methoden mit einem Vektor verbinden lässt.

6. Vektor gemäss Anspruch 5, worin die DNA-Sequenz, die für das Enzym Penicillinacyltransferase (PAT) kodiert, die folgende Sequenz umfasst:

10 20 30 40 50 60 70
 GTTCATGTCCTCATCAGTCTCATCCTATCGTCCCAGATTGCTCGCTACCCCAATATAAATCTCACCATGCA
 80 90 100 110 120 130 140
 GTTCCCGCTGCATGATCATCCCCAGGACCGCGTTTGTCTATCTCCGTCAGCCAGGTCTCAGTTGTTTACCC
 30 150 160 170 180 190 200 210
 ATCTTCCGACCCCGACGAGAAATCCTTCACATCCTCTGTCAAGCCACTCCCTTTGAAGTAACTGCTGCAC
 220 230 240 250 260 270 280
 TGAATACCAGATTTTTCTCTCAATCTTCCGAGTTCTGACCTGATCCAGATCCGCTACGAACATCGCT
 35 290 300 310 320 330 340 350
 CTGCTGCCAAAGCCGTGATAGCCAGAACGATTGACTTCCCGCTCGATCTCATCCGAGCGAAACGAAGAA
 360 370 380 390 400 410 420
 CACCGACGAAGAGCTTAAACAGGTACTCTCCCAACTCCCGCGCGTGATCGAGGAAAGATGCCCAAAATAC
 430 440 450 460 470 480 490
 TACGACGACATTCCCGGTGAGTCCCAGTTCCGCTCTTTCTTACATTTTCTGCACCAATCCTGACCCGATGAC
 40 500 510 520 530 540 550 560
 CCCCCAAAAACCAGGTATTGCAAAGCCCGCTGAACCCGATGTCTCCGAGATTGTCTATCCTTAATACCCCG
 570 580 590 600 610 620 630
 ACCGAATTTGCATACCCGCTCAAGCCAGCCCGTGATCCCTCCACCACTCCCTATTGTCAACTTCCAAATG
 45 640 650 660 670 680 690 700
 CAGCCCTCCAGCCCCAAACTCCGATGTACGTTAAGAGATTTTACCTCCTCATTTTATTCCATCGAATTT
 710 720 730 740 750 760 770
 CCCCCGACTAATTTGCTTGTTCAGTTCTTTTCTCCACCAAGAGAACCTCATCCGTTAACGATCCGT
 50 780 790 800 810 820 830 840
 CAGCCCGGACTTCCCACCATCAAATTCATAACCGAGCCTCGAATCATCCGGAAGGTTGGATTTAACAGTG



850 860 870 880 890 900 910
 CCCCCGTCGGCCTCAATTACAACCCCTTCACCTTCAAGCTCTTCGACCCACCCGAGTTCCTTCGCATAT
 920 930 940 950 960 970 980
 TCCCCCTCCGCATACCGCTCGAAACCACTTCTCCTTCCCACCCCTATGACCCGATCGTCCAGCAAGCGCGA
 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 ATCCCCCCCCACCGCTTTTATCATCGTCCGCAATCCGCACGAGGCATTTGGTTTGAATTCTCCCCACCA
 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 CCATCCGAAAGCAGGTGCTCCACCCGAATGTACGATCGTCCACCAACCCTGCTTCCCTTACCACCG
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 CAAAAATGAGAAAGACCTCGATCCCTTACCCGACTCATCGAATCCCACCACCGTATCGAGTTCTCTCTC
 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GACCGGTTCCGACCCACCAAAACAGGCATTTGCCCAGCTCTCGCCGACCAAGACAATTATCCCTTTACCA
 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 TCTCCCGCGCTTACGAGAGCCGAAGACGAGCCCGGACTCTGTTCAATATCATCTACGACCATGCCCCG
 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TAGAGAGCCAACCGTCCCGCTTCCCGCCGACCAACCCTCATGAGATGTTTGTATCCCGTTTCAGCAG
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 CAGCAGGAGAGCTCTCCCTCAACGCCAGCGTTTGAAGCTCTTCATGACGAGCCAATGCATCTTTTGT
 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
 TGTACCTTCAACCCACTCCGTCTTCACTTCTTCCCGCCGACTCCCTACCGTTTGTACCATCTGACTCATA
 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 TAAATCTCTAGCCCTACCTACACTATACCTAAGCGAGAGAACCCCTAGAGTGATTAACGTACCGGCCCTAT
 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 AGTACCCCGATCTCTAGATAGAACATTTAGTAGACATTAGGATCCCTAACTAATTTAACTTGACCATTGT
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 CCCGTTTCATATTGATTTTCATCCATTATACACTCTTAATCGTTTCCCGGTAGAAGCCGNATATATACGAC
 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
 CATACCGTCTCGAGAACAGCGCTTCCCGTCTCCTTCCCGGTAAGCTTAACTATATATTCTACACGCCCAAT
 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 ACTCAATGTCCCTTACACCTAAGCCCGACTCTAGCGTAAGTCCCGGTCATATAGGTCAGAAAGTCTTAA
 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960
 CACTGAAGACAGGATATCACCGGTTACCCTGCACCCTACTACTACCTTCAATATCACTCTTTTACGGATC
 1970
 CACACCGTCCAC-

40

7. Verfahren gemäss Anspruch 5 oder 6, worin der Vektor weitere Gene enthält, die für die Transkription und Translation des *Penicillium chrysogenum* PAT Gens notwendig sind.
8. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 5 bis 7 worin der Vektor weitere Gene enthält, die eine Selektion des Plasmides in β -lactamproduzierenden Mikroorganismen erlauben.
9. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 5 bis 8, worin der Vektor ein weiteres Gen enthält, das für das Enzym Isopenicillin N Synthetase kodiert.
10. Verfahren zur Herstellung des Enzyms Penicillinacylasetransferase (PAT), bestehend aus der Transformation eines Wirtes mit Hilfe eines Vektors wie definiert in einem der Ansprüche 6 bis 9 und der Isolierung der exprimierten PAT.
11. Verfahren zur Herstellung von Zellen, die einen Vektor wie definiert in einem der Ansprüche 5 bis 9 enthalten, dadurch gekennzeichnet, dass man die Zellen mit einem Vektor wie definiert in einem der Ansprüche 5 bis 9 transformieren lässt.



12. Verfahren zur Verbesserung der Herstellung eines Penicillins, dadurch gekennzeichnet dass man eine Zelle, die Penicillin herstellt, mit einem Vektor wie definiert in einem der Ansprüche 5 bis 9 transformieren lässt, und das Penicillin isoliert.

5 Claims

Claims for the following Contracting States : AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. A DNA sequence in purified and isolated form that codes for the enzyme penicillin acyl transferase which has the following sequence:

10	10	20
	MetLeuHisIleLeuCysGlnGlyThrProPheGluIleGlyTyrGluHisGlySerAla	
	30	40
	AlaLysAlaValIleAlaArgSerIleAspPheAlaValAspLeuIleArgGlyLysThr	
15	50	60
	LysLysThrAspGluGluLeuLysGlnValLeuSerGlnLeuGlyArgValIleGluGlu	
	70	80
	ArgTrpProLysTyrTyrGluGluIleArgGlyIleAlaLysGlyAlaGluArgAspVal	
	90	100
20	SerGluIleValMetLeuAsnThrArgThrGluPheAlaTyrGlyLeuLysAlaAlaArg	
	110	120
	AspGlyCysThrThrAlaTyrCysGlnLeuProAsnGlyAlaLeuGlnGlyGlnAsnTrp	
	130	140
25	AspPhePheSerAlaThrLysGluAsnLeuIleArgLeuThrIleArgGlnAlaGlyLeu	
	150	160
	ProThrIleLysPheIleThrGluAlaGlyIleIleGlyLysValGlyPheAsnSerAla	
	170	180
	GlyValAlaValAsnTyrAsnAlaLeuHisLeuGlnGlyLeuArgProThrGlyValPro	
30	190	200
	SerHisIleAlaLeuArgIleAlaLeuGluSerThrSerProSerGlnAlaTyrAspArg	
	210	220
	IleValGluGlnGlyGlyMetAlaAlaSerAlaPheIleMetValGlyAsnGlyHisGlu	
	230	240
35	AlaPheGlyLeuGluPheSerProThrSerIleArgLysGlnValLeuAspAlaAsnGly	
	250	260
	ArgMetValHisThrAsnHisCysLeuLeuGlnHisGlyLysAsnGluLysGluLeuAsp	
	270	280
40	ProLeuProAspSerTrpAsnArgHisGlnArgMetGluPheLeuLeuAspGlyPheAsp	
	290	300
	GlyThrLysGlnAlaPheAlaGlnLeuTrpAlaAspGluAspAsnTyrProPheSerIle	
	310	320
45	CysArgAlaTyrGluGluGlyLysSerArgGlyAlaThrLeuPheAsnIleIleTyrAsp	
	330	340
	HisAlaArgArgGluAlaThrValArgLeuGlyArgProThrAsnProAspGluMetPhe	
	350	
50	ValMetArgPheAspGluGluAspGluArgSerAlaLeuAsnAlaArgLeu.	

2. A DNA sequence according to claim 1 which includes the following sequence:

55



10 20 30 40 50 60 70
 GTTGATGTCCTCATCTCATCTATCGTCCCAGATTGCTGCTACCCCAATATAAATCTCACCATCCA
 80 90 100 110 120 130 140
 5 GTTCCCCCTGCATGATCATCCCCAGGACCCCGTTTGTCTATCTCCGTCACCCAAGTCTCAGTTGTTTACCC
 150 160 170 180 190 200 210
 ATCTTCCGACCCCCAGCAGAAATCCTTCACATCCTCTGTCAAGCCACTCCCTTTGAAGTAAGTCTCCAC
 220 230 240 250 260 270 280
 TGAATACCAGATTTTTCTCTCTGAATCTTCCGACTTCTGACCTGATCCAGATCCOCTACCAACATCCCT
 10 290 300 310 320 330 340 350
 CTCTCCCAAACCCCTCATAGCCAGAAGCATTGACTTCCCGCTCGATCTCATCCGAGGAAAACGAAGAA
 360 370 380 390 400 410 420
 GACCGACGAAGAGCTTAAACAGCTACTCTCCAACTCGGGCCCGTGATCGAGGAAAGATCGCCCAATAC
 430 440 450 460 470 480 490
 15 TACGAGCAGATTCCCGCTGAGTCCCACTTCGGTCTTTCTTACATTTTCTCCACCAATGCTGACCGATGAC
 500 510 520 530 540 550 560
 CCCCCAAAACCACTATTCCAAAACCCCGCTGAACCGGATGCTCTCCGAGATTGTCATGCTTAATACCCCG
 570 580 590 600 610 620 630
 20 ACCGAATTTGCATACCCGCTCAAGCCACCCCGTGATCCCTCCACCACTCCCTATTGTCAACTTCCAAATG
 640 650 660 670 680 690 700
 GAGCCCTCCAGGCCCAAACTCGGATGTACGTTAAGAGATTTTACCTCCTCATTTTATTCCATCGAATT
 710 720 730 740 750 760 770
 GCGCCGACTAATTTGCTTGTCAAGTTCTTTCTCCACCAAAAGAGAACCTCATCCCGTTAACCATCCGT
 25 780 790 800 810 820 830 840
 CAGCCCGGACTTCCCACCATCAAATTCATAACCGAGCCTCGAATCATCCGGAAGCTTCCATTTAACAGTG
 850 860 870 880 890 900 910
 CCGCCGCTCGCCGTCATTACAACCCCTTCACCTTCAAGCTCTTCCAGCCACCGAGTTCTTCCGATAT
 920 930 940 950 960 970 980
 30 TCCCTCCGATAGCCCTCGAAAGCACTTCTCTTCCACCGCTATGACCCGATCGTCCAGCAAGCCCGA
 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 ATCCCCGCCACCCCTTTTATCATCGTCCCAATCCCCAGCAGGCAATTTGTTTCCAATTCTCCCCACCA
 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 35 CCATCCGAAAGCAGGTGCTCGACCCGAATCTAGGATCGTCCACACCAACCACTGCTTCTTCCACCCG
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 CAAAAATCAGAAAGAGCTCGATCCCTTACCCGACTCATCGAATCCCCACCACCGTATCGAGTTCTCTCTC
 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GACCGGTTCCAGCCACCAAAACAGGCAATTTCCCCAGCTCTCGGCGGACGAAGACAATTATCCCTTTACCA
 40 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 TCTCCCGCCCTTACGAGGAGCGCAAGACGAGCGCCGACTCTGTTCAATATCATCTACGACCATCCCCG
 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TAGAGACCCAACCGTCCCGCTTCCCGCCCGACCAACCTCATGAGATGTTTCTCATCCCGTTTCACGAG
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 45 GACGACGAGAGGTCTCCGCTCAACCCGAGCCTTTGAAGCCTCTTTCATGACGACCAATCCATCTTTTGT
 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
 TGTACCTTCAACCGACTCCGTCTTCACTTCTTCCCGCCGACTCCCTACCGTTTGTACCATCTGACTCATA
 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 50 TAAATGTCTACCCCTACCTACACTATACCTAACCGAGAGAAACCGTAGAGTCATTAACGTACCGGCCTAT



1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880
 AGTACCCCGATCTCTAGATAGAACATTTACTAGAGATTACGATOCCTAACTAATTTAACTTGACCATTGT
 1890 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 5 CCCGTTTCATATTGATTTTCATCCATTATACACTCTTAATCCTTTCCCGTAGAAOCCGNATATATACAC
 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
 CATACCGTCTCGAGAACACCGCTTCCCGTCTCCTTCCCGTACTTAACTATATATTCTACACGCCCAAT
 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 10 ACTCAATGTCCCTTAGCACCTAAGCCGCACTCTACCGTAACTCCCGTCATATACGTCAGAACTCTTAA
 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960
 GACTGAAGACAGCATATCACCGCTTACCCTCCACCGTACCTACTACCTTCAATATCACTCTTTCACGATC
 1970
 CACAGCGTCCAC.

15

3. A DNA sequence according to claim 1 or 2 which includes the sequences necessary for the transcription and translation of the Penicillium chrysogenum PAT gene.

20 4. A DNA sequence according to claim 3 in which the sequences which are necessary for the transcription and translation of the Penicillium chrysogenum PAT gene are the sequences between the Isopenicillin N-synthetase gene and the Penicillium chrysogenum PAT gene,

5. A protein which is coded for by a DNA sequence according to any one of claims 1 to 4, in purified and isolated form.

25

6. A vector which contains a DNA sequence that codes for the enzyme penicillin acyltransferase (PAT); the enzyme penicillin acyltransferase having the following sequence:

10 20
 30 MetLeuHisIleLeuCysGlnGlyThrProPheGluIleGlyTyrGluHisGlySerAla
 30 40
 AlaLysAlaValIleAlaArgSerIleAspPheAlaValAspLeuIleArgGlyLysThr
 50 60
 35 LysLysThrAspGluGluLeuLysGlnValLeuSerGlnLeuGlyArgValIleGluGlu
 70 80
 ArgTrpProLysTyrTyrGluGluIleArgGlyIleAlaLysGlyAlaGluArgAspVal
 90 100
 SerGluIleValMetLeuAsnThrArgThrGluPheAlaTyrGlyLeuLysAlaAlaArg
 40 110 120
 AspGlyCysThrThrAlaTyrCysGlnLeuProAsnGlyAlaLeuGlnGlyGlnAsnTrp
 130 140
 AspPhePheSerAlaThrLysGluAsnLeuIleArgLeuThrIleArgGlnAlaGlyLeu

45

50

55



150 160
 ProThrIleLysPheIleThrGluAlaGlyIleIleGlyLysValGlyPheAsnSerAla
 170 180
 5 GlyValAlaValAsnTyrAsnAlaLeuHisLeuGlnGlyLeuArgProThrGlyValPro
 190 200
 SerHisIleAlaLeuArgIleAlaLeuGluSerThrSerProSerGlnAlaTyrAspArg
 210 220
 10 IleValGluGlnGlyGlyMetAlaAlaSerAlaPheIleMetValGlyAsnGlyHisGlu
 230 240
 AlaPheGlyLeuGluPheSerProThrSerIleArgLysGlnValLeuAspAlaAsnOly
 250 260
 ArgMetValHisThrAsnHisCysLeuLeuGlnHisGlyLysAsnGluLysGluLeuAsp
 270 280
 15 ProLeuProAspSerTrpAsnArgHisGlnArgMetGluPheLeuLeuAspGlyPheAsp
 290 300
 GlyThrLysGlnAlaPheAlaGlnLeuTrpAlaAspGluAspAsnTyrProPheSerIle
 310 320
 20 CysArgAlaTyrGluGluGlyLysSerArgGlyAlaThrLeuPheAsnIleIleTyrAsp
 330 340
 HisAlaArgArgGluAlaThrValArgLeuGlyArgProThrAsnProAspGluMetPhe
 350
 25 ValMetArgPheAspGluGluAspGluArgSerAlaLeuAsnAlaArgLeu.

7. A vector according to claim 6 in which the DNA sequence that codes for the enzyme penicillin acyltransferase (PAT), includes the following sequence:

10 20 30 40 50 60 70
 GTTGATGTCCTCATCTCTATCGTCCAGATTGGTCCCTACCCCAATATAAATCTCAGCATCCA
 80 90 100 110 120 130 140
 35 GTTCCCGCTCCATGATCATCCCCAGGACCCGTTTGTCTCTCCGTCAOCCAOGTCTCAGTTGTTACCC
 150 160 170 180 190 200 210
 ATCTTCCGACCCCAAGCAGAAATCCTTCACATCCTCTGTCAAGCCACTCCCTTTGAAGTAAGTGGTCCAC
 220 230 240 250 260 270 280
 TGAATACCAGATTTTTCCTTCTGAATCTTCCGAGTTCTGACCTGATCCAGATCCOCTACCAACATCGCT
 290 300 310 320 330 340 350
 40 CTGCTCCCAAAOCCCGTATAGCCAGAAGCAATGACTTCCCGCTCGATCTCATCCGAGGAAAACGAAGAA
 360 370 380 390 400 410 420
 GACGGACGAAGACCTTAAACACGTAATCTTCCCAACTCCCGCCGCTGATCCAGCAAGATCCCCCAATAC
 430 440 450 460 470 480 490
 45 TACCAGGAGATTCCCGCTGAGTCCCACTTCCGTCTTCTACATTTTCTCCACCAATCCTGACCGATGAC



500 510 520 530 540 550 560
 CCCCCAAAAACCAAGTATTGCAAAAGGCCGCTGAACCCGATGTCTCCGAGATTGTGATCCTTAATACCCCG
 570 580 590 600 610 620 630
 ACCGAATTTGCATACCGGCTCAAGCCAGCCCGTCATCCCTCCACCCTCCCTATTGTCAACTTCCAAATC
 5 640 650 660 670 680 690 700
 GACCCCTCCAGCCCCAAAACCTCCGATGTACGTTAAGAGATTTTACCTCCTCATTATTATCCATCGAATTT
 710 720 730 740 750 760 770
 CCCCCGACTAATTTGGTTGTTCAAGTTCTTTTCTCCACCAAGAGAACCTGATCCCGTTAACCATCCCT
 10 780 790 800 810 820 830 840
 CAGCCCGGACTTCCCACCATCAAATTCATAACCGACCCCTGCAATCATCCCGAAGGTTGATTTAAACAGTG
 850 860 870 880 890 900 910
 CCGCGGTCGCGCTCAATTACAAGCCCTTCACCTTCAAGGCTTCCACCCACCGGAGTTCTTCCGATAT
 920 930 940 950 960 970 980
 15 TCCCTCCCGATACCCCTCGAAAGCACTTCTCCTTCCCAGCCCTATGACCCGATCGTGGACCAAGCCCGA
 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 ATGCCCGCCAGCGCTTTTATCATGGTCCGCAATGCCACGACGCATTTCGTTTGAATTCTCCCCACCA
 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 20 CCATCCGAAAGCAGCTGCTCGACCCGAATCTAGCATGGTCCACCAACCCTCCTTCTTCAGCACCG
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 CAAAAATGAGAAAGACCTCGATCCCTTACCCGACTCATCGAATCCGACCAACCGTATCGAGTTCTCTCTC
 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GACCGGTTCCAGCGCACCAAAACAAGCAATTTGCCACCTCTCGCCCGACCAAGACAATTATCCCTTTACCA
 25 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 TCTGCCCGCCTTACGAGGAGCGCAAGAGCAGAGCGCGGACTCTGTTCAATATCATCTACGACCATGCCCG
 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TAGAGACCAACCGTCCCGCTTCCCGCGCCGACCAACCCTCATGACATGTTTGTCTATCCCGTTTGACGAG
 30 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 CAGGACGAGAGGTCTCCGCTCAACCCGACCCCTTTGAAGCCCTCTTCATGACGACCAATCATCTTTTGT
 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
 TGTAGCTTCAACCGACTCCGTCTTCACTTCTTCCCGCCGACTCCCTACCGTTTGTACCATCTGACTCATA
 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 35 TAAATGTCTAGCCCTACCTACACTATACCTAAGGAGAGAACCGTAGAGTGATTAACGTACCGCCCTAT
 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 AGTACCCCGATCTCTAGATAGAACATTTAGTAGAGATTACGATCCCTAACTAATTTAACTTGACCATTGT
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 40 CCCGTTTATATTGATTTTCATCCATTATACACTCTTAATCGTTTCCCGTATAGAACCCGNATATATACGAC
 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
 CATAGCGTGTGAGAGAACAGCCCTTCCCGTCTCCTTCCCGTACTTAACCTATATATTCTACACCGCCAAT
 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 ACTCAATGTGCCCTTAGCACCTAAGCCGCACTCTAGCGTAAGTCCCGGTGATATACGTGAGAACTCTTAA
 45 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960
 GACTGAAGACAGCATATACCCGTTACCCTCCACCCTACCTACTACCTTCAATATCACTCTTTCAGGATC
 1970
 GACACCGTCCAC .

50

8. A vector according to claim 6 or claim 7 which contains further genes that are necessary for the transcription and translation of the *Penicillium chrysogenum* PAT gene.
- 55 9. A Vector according to any one of claims 6 to 8 which contains further genes that permit the selection of the plasmid in β -lactam producing microorganisms.



10. A vector according to any one of claims 6 to 9 which contains a further gene that codes for the enzyme Isopenicillin N synthetase.
- 5 11. A process for the production of the enzyme penicillin acyltransferase (PAT), comprising transforming a host with a vector according to any one of claims 6 to 10 and isolating the expressed PAT.
12. Cells which contain a vector according to any one of claims 6 to 10.
- 10 13. A process for improving the production of penicillin characterized in that a penicillin producing cell is transformed with a vector according to any one of claims 6 to 10, and the penicillin is isolated.

Claims for the following Contracting States : ES, GR

- 15 1. A process for the production of a DNA sequence that codes for the enzyme penicillin acyltransferase (PAT), in purified and isolated form, characterized in that a DNA sequence which codes for the enzyme penicillin acyltransferase having the following sequence:

	10	20
	MetLeuHisIleLeuCysGlnGlyThrProPheGluIleGlyTyrGluHisGlySerAla	
	30	40
20	AlaLysAlaValIleAlaArgSerIleAspPheAlaValAspLeuIleArgGlyLysThr	
	50	60
	LysLysThrAspGluGluLeuLysGlnValLeuSerGlnLeuGlyArgValIleGluGlu	
	70	80
25	ArgTrpProLysTyrTyrGluGluIleArgGlyIleAlaLysGlyAlaGluArgAspVal	
	90	100
	SerGluIleValMetLeuAsnThrArgThrGluPheAlaTyrGlyLeuLysAlaAlaArg	
	110	120
	AspGlyCysThrThrAlaTyrCysGlnLeuProAsnGlyAlaLeuGlnGlyGlnAsnTrp	
30	130	140
	AspPhePheSerAlaThrLysGluAsnLeuIleArgLeuThrIleArgGlnAlaGlyLeu	
	150	160
	ProThrIleLysPheIleThrGluAlaGlyIleIleGlyLysValGlyPheAsnSerAla	
	170	180
35	GlyValAlaValAsnTyrAsnAlaLeuHisLeuGlnGlyLeuArgProThrGlyValPro	
	190	200
	SerHisIleAlaLeuArgIleAlaLeuGluSerThrSerProSerGlnAlaTyrAspArg	
	210	220
40	IleValGluGlnGlyGlyMetAlaAlaSerAlaPheIleMetValGlyAsnGlyHisGlu	
	230	240
	AlaPheGlyLeuGluPheSerProThrSerIleArgLysGlnValLeuAspAlaAsnGly	
	250	260
45	ArgMetValHisThrAsnHisCysLeuLeuGlnHisGlyLysAsnGluLysGluLeuAsp	
	270	280
	ProLeuProAspSerTrpAsnArgHisGlnArgMetGluPheLeuLeuAspGlyPheAsp	
	290	300
	GlyThrLysGlnAlaPheAlaGlnLeuTrpAlaAspGluAspAsnTyrProPheSerIle	
50		
	310	320
	CysArgAlaTyrGluGluGlyLysSerArgGlyAlaThrLeuPheAsnIleIleTyrAsp	
	330	340
55	HisAlaArgArgGluAlaThrValArgLeuGlyArgProThrAsnProAspGluMetPhe	
	350	
	ValMetArgPheAspGluGluAspGluArgSerAlaLeuAsnAlaArgLeu ,	

2. A process according to claim 1 in which the DNA sequence includes the following sequence:

55



1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 GAGGACGAGACGCTCTGCCCTCAACGCCACGCTTTGAACGCTCTTCATGACGAOCCAATCCATCTTTTGT
 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
 TGTACCTTCAACCGACTCCGTCTTCACTTCTTCCCCCCTACTCCCTACCGTTTGTACCATCTGACTCATA
 5 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 TAAATGTCTAAGCCCTACCTACACTATACCTAAGCGACAGAACCGTAGAGTGATTAAAGTACCCCCCTAT
 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 AGTACCCCGATCTCTAGATAGAACATTTAGTAGACATTACGATCCCTAACTAATTTAACTTGACCATTTGT
 10 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 CCGCTTCATATTGATTTTCATCCATTATACACTCTTAATCGTTTCCCCGTAGAACCCGNATATATACCAC
 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
 CATACCGTCTCGAGAACCGGCTTCCCGTCTCGTTGCCCGTACTTAACTATATATTCTACACCCCAAT
 15 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 ACTCAATGTGCCCTTAGCACCTAAGCCGCACTCTACCGTAAGTCCCCGTATATACGTGAGAAGTCTTAA
 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960
 CACTGAACACAGCATATCACCGGTTACCGTCCACCGTACCTACTACCTTCAATATCACTCTTTCACCATG
 1970
 20 GACAGCGTCCAC.

3. A process according to claim 1 or claim 2 in which the DNA-sequence includes the sequences
 25 necessary for the transcription and translation of the *Penicillium chrysogenum* PAT gene.
4. A process according to claim 3 in which the sequences that are necessary for the transcription and
 translation of the *Penicillium chrysogenum* PAT gene are the sequences between the *Isopenicillium N*
 synthetase gene and the *Penicillium chrysogenum* PAT gene.
5. A process for the production of a vector that contains a DNA sequence that codes for the enzyme
 penicillin acyltransferase (PAT), characterized in that the DNA sequence that codes for the enzyme
 penicillin acyltransferase having the following sequence:



	10	20
	MetLeuHisIleLeuCysGlnGlyThrProPheGluIleGlyTyrGluHisGlySerAla	
	30	40
5	AlaLysAlaValIleAlaArgSerIleAspPheAlaValAspLeuIleArgGlyLysThr	
	50	60
	LysLysThrAspGluGluLeuLysGlnValLeuSerGlnLeuGlyArgValIleGluGlu	
	70	80
	ArgTrpProLysTyrTyrGluGluIleArgGlyIleAlaLysGlyAlaGluArgAspVal	
10	90	100
	SerGluIleValMetLeuAsnThrArgThrGluPheAlaTyrGlyLeuLysAlaAlaArg	
	110	120
	AspGlyCysThrThrAlaTyrCysGlnLeuProAsnGlyAlaLeuGlnGlyGlnAsnTrp	
	130	140
15	AspPhePheSerAlaThrLysGluAsnLeuIleArgLeuThrIleArgGlnAlaGlyLeu	
	150	160
	ProThrIleLysPheIleThrGluAlaGlyIleIleGlyLysValGlyPheAsnSerAla	
	170	180
20	GlyValAlaValAsnTyrAsnAlaLeuHisLeuGlnGlyLeuArgProThrGlyValPro	
	190	200
	SerHisIleAlaLeuArgIleAlaLeuGluSerThrSerProSerGlnAlaTyrAspArg	
	210	220
	IleValGluGlnGlyGlyMetAlaAlaSerAlaPheIleMetValGlyAsnGlyHisGlu	
25	230	240
	AlaPheGlyLeuGluPheSerProThrSerIleArgLysGlnValLeuAspAlaAsnGly	
	250	260
	ArgMetValHisThrAsnHisCysLeuLeuGlnHisGlyLysAsnGluLysGluLeuAsp	
	270	280
30	ProLeuProAspSerTrpAsnArgHisGlnArgMetGluPheLeuLeuAspGlyPheAsp	
	290	300
	GlyThrLysGlnAlaPheAlaGlnLeuTrpAlaAspGluAspAsnTyrProPheSerIle	
	310	320
35	CysArgAlaTyrGluGluGlyLysSerArgGlyAlaThrLeuPheAsnIleIleTyrAsp	
	330	340
	HisAlaArgArgGluAlaThrValArgLeuGlyArgProThrAsnProAspGluMetPhe	
	350	
40	ValMetArgPheAspGluGluAspGluArgSerAlaLeuAsnAlaArgLeu,	

is combined with a vector by recombinant methods.

- 45 6. A vector according to claim 5 in which the DNA sequence that codes for the enzyme penicillin acyltransferase (PAT) includes the following sequence:

50

55



10 20 30 40 50 60 70
 GTTGATCTCCCATCAGTGTCTATCGTCCCAGATTGGTCCCTACCCCAATATAAATCTCAGCATCCA
 80 90 100 110 120 130 140
 GTTCCCGCTGCATCATCATCCCCAGGACGCCGTTTGTCTATCTCCGTCAGCCAAGTCTCAGTTGTTTACCC
 5 150 160 170 180 190 200 210
 ATCTTCCGACCCCCAGCAGAAATGCTTCACATCCTCTGTCAAGCGACTCCCTTTGAAGTAAGTCTGTCAC
 220 230 240 250 260 270 280
 TGAATACCAGATTTTTTCTCTCAATCTTCCGAGTTCTGACCTGATCCAGATCCGCTACGAACATGGCT
 10 290 300 310 320 330 340 350
 CTGCTCCCAAGCCGTGATAGCCAGAACATTGACTTCCCGCTCGATCTCATCCGACGGAAAAACGAAGAA
 360 370 380 390 400 410 420
 CACGGACGAAGAGCTTAAACAGGTACTCTCCCAACTCGCGCCGCTGATCCAGCAAGATCGCCCAAAATAC
 430 440 450 460 470 480 490
 TACGAGCAGATTCCCGCTCAGTCCCACTTCCGTCTTTCTTACATTTTCTGCCACCAATGCTGACCCGATGAC
 15 500 510 520 530 540 550 560
 CCCCCAAAAACCAGTATTGCAAAAGCCCGCTGAACCGGATGTCTCCGAGATTGTCTATCTTAAATACCCCG
 570 580 590 600 610 620 630
 ACCGAATTTCCATACCGGCTCAAGCCAGCCCGCTGATCCCTCCACCACTCCCTATTGTCAACTTCCAAATC
 20 640 650 660 670 680 690 700
 GACCCCTCCAGCCCCAAAACTCGGATGTACGTTAAGAGATTTTACCTCCTCATTTTATTCCATCGAATTT
 710 720 730 740 750 760 770
 CCCCCACTAATTTGTTGTTCAAGTTCTTTCTCCACCAAGAGAACCTGATCCGCTTAACCATCCGT
 25 780 790 800 810 820 830 840
 CACGCCCCGACTTCCCACCATCAAATTCATAACCGAGCGCTCGAATCATCCCGAAGGTTGCAATTTAACAGTG
 850 860 870 880 890 900 910
 CCGCGGTCCCGCTCAATTACAACGCCCTTTCACCTTCAAGGTCTTCCGACCCACCGAGTTTCTTCCCATAT
 920 930 940 950 960 970 980
 TCCCTTCCCATACCGCTCGAAAGCACTTCTCTTCCACCCCTATGACCGGATCGTCCAGCAAGCCCGA
 30 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 ATGCCCCGCCACCGCTTTTATCATCGTCCGCAATCCCGACGAGGCAATTTGTTTGAATTTCTCCCCACCA
 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 CCATCCGAAAGCAGGTGCTCCACCGCAATGTAGCATGCTCCACCAACCACTCCTTCTTACCCACCG
 35 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 CAAAAATGAGAAAGAGCTCGATCCCTTACCGGACTCATCGAATCGCCACCACCGTATCGAGTTCTCTCTC
 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GACCGGTTCCAGCCCAACCAACAGGCAATTTGCCACCTCTCGCCCGACCAAGACAAATTATCCCTTTACCA
 40 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 TCTCCCCCGCTTACGAGGACCCCAAGAGCAGAGCCCGCACTCTGTTCAATATCATCTACGACCATCCCCG
 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TAGAGACCAACCGTCCCGCTTCCCGCCCGACCAACCTCATGAGATGTTTGTCTATCCCGTTTGACGAG
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 45 CAGGACGAGAGGTCTCCCGTCAACGCCACCGCTTTGAAGCTCTTTCATGACGACCAATCCATCTTTGTA
 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
 TGTACCTTCAACCGACTCCGTCTTCACTTCTTCCCGCCGACTGCCTACCGTTTGTACCATCTGACTCATA
 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 50 TAAATCTCTACCCCTACCTACACTATACCTAAGCGAGACAACCGTACAGTGATTAAACGTACCCCGCTAT



1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 AGTACCCCGATCTCTAGATAGAACATTTAGTAGAGATTAGGATGCCCTAACTAATTTAACTTGACCATTCT
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 5 CCCGTTTCATATTGATTTTCATCCATTATACACTCTTAATCCTTTCCCGGTAGAAACCCGNATATATACGAC
 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
 CATACCGTGTGAGAAACACCGCTTCCCGTCTCCTTCCCGTACTTAACTATATATTCTACACGGCCAAT
 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 ACTCAATGTCCCTTACCACCTAAGCCCGCACTCTACCGTAAGTCCCGTGCATATACGTGAGAACTCTTAA
 10 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960
 GACTGAAGACACCATATCACCGCTTACCCTCCACCCTACCTACTACCTTCAATATCACTCTTTCACCGATG
 1970
 CACACCGCTCCAC.

15

7. A process according to claim 5 or claim 6 in which the vector contains further genes that are necessary for transcription and translation of the *Penicillium chrysogenum* PAT gene.
- 20 8. A process according to any one of claims 5 to 7 in which the vector contains further genes that permit the selection of the plasmid in β -lactam producing microorganisms.
9. A process according to any one of claims 5 to 8 in which the vector contains a further gene that codes for the enzyme Isopenicillium N synthetase.
- 25 10. A process for the production of the enzyme penicillin acyltransferase (PAT) comprising transforming the host with a vector as defined in any one of claims 6 to 9 and isolating the expressed PAT.
11. A process for the production of cells that contain a vector as defined in any one of claims 5 to 9, characterized in that the cells are transformed with a vector as defined in any one of claims 5 to 9.
- 30 12. A process for improving the production of penicillin characterized in that a penicillin producing cell is transformed with a vector as defined in any one of claims 5 to 9, and the penicillin is isolated.

35 Revendications

Revendications pour les Etats contractants suivants : AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. Séquence d'ADN sous forme purifiée et isolée, codant pour l'enzyme pénicillinacyltransférase qui présente la séquence suivante :

40

45

50

55



	10	20
	MetLeuHisIleLeuCysGlnGlyThrProPheGluIleGlyTyrGluHisGlySerAla	
	30	40
5	AlaLysAlaValIleAlaArgSerIleAspPheAlaValAspLeuIleArgGlyLysThr	
	50	60
	LysLysThrAspGluGluLeuLysGlnValLeuSerGlnLeuGlyArgValIleGluGlu	
	70	80
	ArgTrpProLysTyrTyrGluGluIleArgGlyIleAlaLysGlyAlaGluArgAspVal	
10	90	100
	SerGluIleValMetLeuAsnThrArgThrGluPheAlaTyrGlyLeuLysAlaAlaArg	
	110	120
	AspGlyCysThrThrAlaTyrCysGlnLeuProAsnGlyAlaLeuGlnGlyGlnAsnTrp	
	130	140
15	AspPhePheSerAlaThrLysGluAsnLeuIleArgLeuThrIleArgGlnAlaGlyLeu	
	150	160
	ProThrIleLysPheIleThrGluAlaGlyIleIleGlyLysValGlyPheAsnSerAla	
	170	180
20	GlyValAlaValAsnTyrAsnAlaLeuHisLeuGlnGlyLeuArgProThrGlyValPro	
	190	200
	SerHisIleAlaLeuArgIleAlaLeuGluSerThrSerProSerGlnAlaTyrAspArg	
	210	220
	IleValGluGlnGlyGlyMetAlaAlaSerAlaPheIleMetValGlyAsnGlyHisGlu	
25	230	240
	AlaPheGlyLeuGluPheSerProThrSerIleArgLysGlnValLeuAspAlaAsnGly	
	250	260
	ArgMetValHisThrAsnHisCysLeuLeuGlnHisGlyLysAsnGluLysGluLeuAsp	
	270	280
30	ProLeuProAspSerTrpAsnArgHisGlnArgMetGluPheLeuLeuAspGlyPheAsp	
	290	300
	GlyThrLysGlnAlaPheAlaGlnLeuTrpAlaAspGluAspAsnTyrProPheSerIle	
	310	320
35	CysArgAlaTyrGluGluGlyLysSerArgGlyAlaThrLeuPheAsnIleIleTyrAsp	
	330	340
	HisAlaArgArgGluAlaThrValArgLeuGlyArgProThrAsnProAspGluMetPhe	
	350	
40	ValMetArgPheAspGluGluAspGluArgSerAlaLeuAsnAlaArgLeu.	

2. Séquence d'ADN selon la revendication 1, comprenant la séquence suivante :

45

50

55



10 20 30 40 50 60 70
 GTTCATGTCCCATCAGTGTCTATCCTATCGTCCCAGATTGGTCCCTACCCCAATATAAATCTCACCATCCA
 80 90 100 110 120 130 140
 GTTCCCCCTCCATCATCATCCCCAGACCCCGTTTGTCTATCTCCGTCAOCCAGGTCTCAGTTGTTTACCC
 5 150 160 170 180 190 200 210
 ATCTTCCGACCCCCACAGAAATCCTTCAGATCCTCTGTCAAGCCACTCCGTTTCAAGTAAGTCTCCAC
 220 230 240 250 260 270 280
 TGAATACCAGATTTTTTCTTCTCAATCTTCCGAGTTCTCAGCTGATCCAGATCCOCTACGAACATCCCT
 290 300 310 320 330 340 350
 10 CTCTCCCAAAACCGTGTATAGCCAGAACGATTGACTTCCCGTCCATCTCATCCGACGGAAAAACGAAGAA
 360 370 380 390 400 410 420
 CACCGACGAAGACCTTAAACAGGTACTCTCCAACTCCCGCCGTGATCCAGGAAGATCCCCCAAATAC
 430 440 450 460 470 480 490
 15 TACGACGAGATTCCCGTCTAGTCCCACTTCCGTCTTTCTTACATTTTCTCCACCAATCCTCAGCCATGAC
 500 510 520 530 540 550 560
 CCCCCAAAAACCACTATTCCAAAGCCCGCTGAACCCGATGTCTCCGAGATTGTCTATCTTAATACCCCC
 570 580 590 600 610 620 630
 ACCGAATTTCCATACCCCGTCAAGCCACCCCGTATCCCTCCACCACTCCCTATTGTCAACTTCCAAATG
 640 650 660 670 680 690 700
 20 CAGCCCTCCAGCCCCAAAACTCGGATGTACGTTAAGAGATTTTACCTCCTCATTTTATTCCATCGAATTT
 710 720 730 740 750 760 770
 CCCCCGACTAATTTCTTCTTCAAGTTCTTTCTCCCAACCAAGACAACCTCATCCCGTTAACCATCCGT
 780 790 800 810 820 830 840
 25 CACCCCGGACTTCCCACCATCAAATTCATAACCCAGCCCTCGAATCATCCCGAAGCCTTCGATTTAACAGTG
 850 860 870 880 890 900 910
 CCCCCGTCCCGTCAATTACAAACCCCTTCACCTTCAAGCTCTTCGACCCACCCGAGTTCTTCCCATAT
 920 930 940 950 960 970 980
 TCCCCCTCCCATACCCCTCCAAACCACTTCTCTTCCCAAGCCCTATGACCCGATCGTCCAGCAACCCCGA
 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 30 ATCCCCCCCCACCCCTTTTATCATCGTCCCAATCCCAACCAAGCATTTCTGTTTCCGAATTTCTCCCCACCA
 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 CCATCCCAAAACCAAGTCTCCAGCCCAATGTACCATCGTCCACACCAACCACTCGTTCTTCCAGCAGG
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 35 CAAAAATGAGAAAGACCTCCATCCGTTACCCGACTCATCGAATCCCAACCAAGCCTATCCAGTTCTCTCTC
 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 CACCCGTTCCACCCCAACCAACCAAGCCTTTCCCAAGCTCTCCCGGACCAAGACAATTATCCCTTTACCA
 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 TCTCCCCCTTACGACGAGCCCAAGACCAAGACCCCGACTCTGTTCAATATCATCTACGACCATCCCCG
 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 40 TAGAGACCAACCGTCCCGCTTCCCCCCCCACCAACCCCTCATCAGATGTTTGTCTATCCCGTTTACCCAG
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 CAGCACCAGAGCTCTCCCTCAACCCCAAGCCTTTCAAGCCTCTTCATGACCAACCAATCCATCTTTTGTA
 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
 45 TGTACCTTCAACCACTCCGTCTTCACTTCTTCCCCCACTCCCTACCGTTTGTACCATCTCAGTCATA
 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 TAAATGTCTACCCCTACCTACACTATACCTAAGCCAGAGAACCGTAGAGTCATTAACCTACCCCGCTAT



1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 AGTACCCCGATCTCTAGATAGAACATTTAGTAGACATTACCATCCCTAACTAATTTAACTTCACCATTTCT
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 CCGGTTTCATATTTCATTTTCATCCATTATACACTCTTAATCGTTTCCCGGTACAAOCCGNATATATACCAC
 5 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
 CATACCGTCTCGAGAACACGGCTTCCCGTCTCCTTCCCGTACTTAACCTATATATTCTACACCCCAAT
 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 ACTCAATGTCCCTTAACACCTAACCCGCACTCTACCGTAAGTCCCGGTCATATACGTCAGAACTCTTAA
 10 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960
 CACTCAAGACACCATATCACCGTTACCGTCCACCGTACCTACTACCTTCAATATCACTCTTTCACCATG
 1970
 CACACCGTCCAC.

15

3. Séquence d'ADN selon la revendication 1 ou 2, comprenant les séquences requises pour la transcription et la traduction du gène PAT de Penicillium chrysogenum.
- 20 4. Séquence d'ADN selon la revendication 3, dans laquelle les séquences qui sont requises pour la transcription et la traduction du gène PAT de Penicillium chrysogenum sont les séquences entre le gène de l'isopénicilline N synthétase et le gène PAT de Penicillium chrysogenum.
5. Protéine qui est codée par une séquence d'ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, sous forme purifiée et isolée.
- 25 6. Vecteur contenant une séquence d'ADN codant pour l'enzyme pénicillinacyltransférase (PAT), l'enzyme pénicillinacyltransférase présentant la séquence suivante :

10 20
 MetLeuHisIleLeuCysGlnGlyThrProPheGluIleGlyTyrGluHisGlySerAla
 30 40
 AlaLysAlaValIleAlaArgSerIleAspPheAlaValAspLeuIleArgGlyLysThr
 50 60
 LysLysThrAspGluGluLeuLysGlnValLeuSerGlnLeuGlyArgValIleGluGlu
 35 70 80
 ArgTrpProLysTyrTyrGluGluIleArgGlyIleAlaLysGlyAlaGluArgAspVal
 90 100
 SerGluIleValMetLeuAsnThrArgThrGluPheAlaTyrGlyLeuLysAlaAlaArg
 110 120
 AspGlyCysThrThrAlaTyrCysGlnLeuProAsnGlyAlaLeuGlnGlyGlnAsnTrp
 130 140
 AspPhePheSerAlaThrLysGluAsnLeuIleArgLeuThrIleArgGlnAlaGlyLeu
 150 160
 ProThrIleLysPheIleThrGluAlaGlyIleIleGlyLysValGlyPheAsnSerAla
 45 170 180
 GlyValAlaValAsnTyrAsnAlaLeuHisLeuGlnGlyLeuArgProThrGlyValPro

50

55



190 200
 SerHisIleAlaLeuArgIleAlaLeuGluSerThrSerProSerGlnAlaTyrAspArg
 210 220
 IleValGluGlnGlyGlyMetAlaAlaSerAlaPheIleMetValGlyAsnGlyHisGlu
 5 230 240
 AlaPheGlyLeuGluPheSerProThrSerIleArgLysGlnValLeuAspAlaAsnGly
 250 260
 ArgMetValHisThrAsnHisCysLeuLeuGlnHisGlyLysAsnGluLysGluLeuAsp
 10 270 280
 ProLeuProAspSerTrpAsnArgHisGlnArgMetGluPheLeuLeuAspGlyPheAsp
 290 300
 GlyThrLysGlnAlaPheAlaGlnLeuTrpAlaAspGluAspAsnTyrProPheSerIle
 15 310 320
 CysArgAlaTyrGluGluGlyLysSerArgGlyAlaThrLeuPheAsnIleIleTyrAsp
 330 340
 HisAlaArgArgGluAlaThrValArgLeuGlyArgProThrAsnProAspGluMetPhe
 20 350
 ValMetArgPheAspGluGluAspGluArgSerAlaLeuAsnAlaArgLeu.

- 25 7. Vecteur selon la revendication 6, dans lequel la séquence d'ADN, codant pour l'enzyme pénicillinacyl-transférase (PAT), comprend la séquence suivante :

10 20 30 40 50 60 70
 GTTCATGTCCTCATCAGTGTCTATCGTCCCAGATTGGTCCCTACCGCAATATAAATCTCACCATCCA
 80 90 100 110 120 130 140
 GTTCCCCCTCCATGATCATCCCCACGACCGCGTTTGTCTATCTCCGTCAOCCACGTCTCAGTTGTTTACCC
 150 160 170 180 190 200 210
 ATCTTCCGACCGCCACCAGAAATCGTTTCAGATCCTCTGTCAACCCACTCCCTTTCAAGTAAGTCTCCAC
 220 230 240 250 260 270 280
 TGAATACCAGATTTTTTCGTTCTGAATCTTCCGAGTTCTGACCTGATCCAGATCCOCTACCAACATCCGT
 35 290 300 310 320 330 340 350
 CTCTCTCCAAAGCCGTCATAGCCAGAACGATTGAGTTCCCGGTCCATCTCATCCGACCGAAACCAAGAA
 360 370 380 390 400 410 420
 CACCGACGAAGACCTTAACACAGTACTCTCCCAACTCCCCCGGTGATCCACGAAGATCCCCCAATAC
 430 440 450 460 470 480 490
 TACGACGAGATTCCCGGTGAGTCCCACTTCCGTCTTTCTGACATTTTCTGACCAATCCTGACCGATCAC
 500 510 520 530 540 550 560
 CCCCCAAAACCAAGTATTCCAAACCGCCCTCAACCCGATGTCTCCGAGATTGTATCCTTAATACCCCC
 570 580 590 600 610 620 630
 ACCGAATTTCCATACCGGCTCAACCCACCGCGTATCCCTCCACCACTCCCTATTGTCAACTTCCAAATC
 640 650 660 670 680 690 700
 CACCCCTCCAGCGCCAAAACCTCCGATGTACGTTAAGAGATTTTACCTCCTCATTTTATTCATCCAAATTT
 710 720 730 740 750 760 770
 CCCCCACTAATTTGTTGTTCAAGTTCTTTTCTCCACCAAGAGAACCTCATCCCGTTAAGCATCCGT
 50 780 790 800 810 820 830 840
 CACCCCGGACTTCCACCATCAAATTCATAACCGACCGTCCAAATCATCCGGAACGTTCCGATTTAACAGTG



850 860 870 880 890 900 910
 CCCCCGTCGGCTCAATTACAACCCCCCTTCACCTTCAACGCTCTTCGACCCACCGAGTTCCCTTCCCATAT
 920 930 940 950 960 970 980
 TCCCTCCCATACCCCTCGAAACCACTTCTCCTTCCCAACCCCTATGACCCGATCGTCCGACCAACCCCGA
 5 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 ATCCCCCACCCTTTTATCATCGTCCGCAATCCGACCCAGCCATTTCGTTTCCAATTCTCCCCCACC
 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 CCATCCCAAAACCACTCTCCGACCCCAAT.GTAGCATCGTCCACACCAACCACTCGTTCTTCAACACCG
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 CAAAAATCAGAAACAGCTCCATCCCTTACCGGACTCATCGAATCCCAACCACTGATCGAGTTCTCTCTC
 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GACCGCTTCGACCCACCAAAACAGCCATTTCGCCACCTCTCGCCCGACCAAGACAATTATCCCTTTACCA
 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 TCTCCCCCTTACGAGGACCCGAAGAGCAGAGCCCGGACTCTGTTCAATATCATCTACCAACCATCCCCG
 15 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TAGACACCCAACCGTCCCCCTTCCCCCGCCGACCAACCCCTGATGAGATGTTTGTATCCCGTTTCACGAG
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 CAGCAGGAGAGGTCTCCGCTCAACCCCAACCCCTTCAACCCCTCTTCATGACCAACCAATCCATCTTTTCTA
 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
 TGTACCTTCAACCCACTCCGCTCTTCACTTCTTCCCCCGCACTCCCTACCGTTTGTACCATCTCACTCATA
 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 TAAATCTCTACCCCTACCTACACTATACCTAACCGAGAGAACCGTAGAGTGATTAACGTACCCCCCTAT
 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 AGTACCCCGATCTCTAGATAGAACATTTAGTAGAGATTAGCATCCCTAACTAATTTAAGTTGACCAATTGT
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 CCCGTTTCATATTGATTTTCATCCATTATACACTCTTAATCGTTTCCCCGTAGAACCCCNATATATACGAC
 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
 CATACCGTCTCGAGAACACCCCTTCCCGCTCTCGTTCCCGTACTTAACCTATATATTCTACACCCCAAT
 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 ACTCAATGTCCCTTACCACTAACCCCGCACTCTACCGTAAGTCCCGGTATATACGTCAGAACTCTTAA
 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960
 CACTGAACACACCATATCAGCGGTTACCCCTCCACCGTACCTACTACCTTCAATATCACTCTTTACGATG
 1970
 CACACCGTCCAC .

- 40 8. Vecteur selon la revendication 6 ou 7, contenant d'autres gènes qui sont requis pour la transcription et la traduction du gène PAT de Penicillium chrysogenum.
9. Vecteur selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, contenant d'autres gènes qui permettent une sélection du plasmide dans des microorganismes producteurs de β -lactames.
- 45 10. Vecteur selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, contenant un autre gène qui code pour l'enzyme isopénicilline N synthétase.
11. Procédé pour la production de l'enzyme pénicillinacyltransférase (PAT), consistant en la transformation d'un hôte à l'aide d'un vecteur selon l'une quelconque des revendications 6 à 10 et l'isolement de la PAT exprimée.
- 50 12. Cellule contenant un vecteur selon l'une quelconque des revendications 6 à 10.
13. Procédé pour l'amélioration de la production d'une pénicilline, caractérisé en ce qu'on transforme une cellule productrice de pénicilline avec un vecteur selon l'une quelconque des revendications 6 à 10, et on isole la pénicilline.
- 55



Revendications pour les Etats contractants suivants : ES, GR

1. Procédé pour la production d'une séquence d'ADN codant pour l'enzyme pénicillinacyltransférase (PAT), sous forme purifiée et isolée, caractérisé en ce qu'on isole par des méthodes de recombinaison la séquence d'ADN qui code pour l'enzyme pénicillinacyltransférase présentant la séquence suivante :

	10	20
	MetLeuHisIleLeuCysGlnGlyThrProPheGluIleGlyTyrGluHisGlySerAla	
	30	40
10	AlaLysAlaValIleAlaArgSerIleAspPheAlaValAspLeuIleArgGlyLysThr	
	50	60
	LysLysThrAspGluGluLeuLysGlnValLeuSerGlnLeuGlyArgValIleGluGlu	
	70	80
	ArgTrpProLysTyrTyrGluGluIleArgGlyIleAlaLysGlyAlaGluArgAspVal	
15	90	100
	SerGluIleValMetLeuAsnThrArgThrGluPheAlaTyrGlyLeuLysAlaAlaArg	
	110	120
	AspGlyCysThrThrAlaTyrCysGlnLeuProAsnGlyAlaLeuGlnGlyGlnAsnTrp	
	130	140
20	AspPhePheSerAlaThrLysGluAsnLeuIleArgLeuThrIleArgGlnAlaGlyLeu	
	150	160
	ProThrIleLysPheIleThrGluAlaGlyIleIleGlyLysValGlyPheAsnSerAla	
	170	180
25	GlyValAlaValAsnTyrAsnAlaLeuHisLeuGlnGlyLeuArgProThrGlyValPro	
	190	200
	SerHisIleAlaLeuArgIleAlaLeuGluSerThrSerProSerGlnAlaTyrAspArg	
	210	220
	IleValGluGlnGlyGlyMetAlaAlaSerAlaPheIleMetValGlyAsnGlyHisGlu	
30	230	240
	AlaPheGlyLeuGluPheSerProThrSerIleArgLysGlnValLeuAspAlaAsnGly	
	250	260
	ArgMetValHisThrAsnHisCysLeuLeuGlnHisGlyLysAsnGluLysGluLeuAsp	
	270	280
35	ProLeuProAspSerTrpAsnArgHisGlnArgMetGluPheLeuLeuAspGlyPheAsp	
	290	300
	GlyThrLysGlnAlaPheAlaGlnLeuTrpAlaAspGluAspAsnTyrProPheSerIle	
	310	320
40	CysArgAlaTyrGluGluGlyLysSerArgGlyAlaThrLeuPheAsnIleIleTyrAsp	
	330	340
	HisAlaArgArgGluAlaThrValArgLeuGlyArgProThrAsnProAspGluMetPhe	
	350	
45	ValMetArgPheAspGluGluAspGluArgSerAlaLeuAsnAlaArgLeu ,	

et on purifie la séquence d'ADN isolée.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la séquence d'ADN comprend la séquence suivante :



10 20 30 40 50 60 70
 GTTCATGTCCCATCAGTGTTCATCCTATCGTCCCAGATTGGTCCGTACCCCAATATAAATCTCAGCATCCA
 80 90 100 110 120 130 140
 5 GTTCCCCCTCCATCATCATCCCCAGGACCCCGTTTGTCTATCTCCCTCAOCCAGGTCTCAGTTGTTTACCC
 150 160 170 180 190 200 210
 ATCTTCCGACCCCGCAGCAGAAATCGTTTCACATCCTCTCTCAAGCCACTCCCTTTCAAGTAAGTCTGTCAC
 220 230 240 250 260 270 280
 TCAATACCAGATTTTTTCTTCTCAATCTTCCGAGTTCTCAGCTGATCCAGATCCGCTACGAACATCGCT
 10 290 300 310 320 330 340 350
 CTGCTCCCAAAGCCGTGATAGCCAGAACGATTGACTTCCGCGTGGATCTCATCCGACGGAAAACGAAGAA
 360 370 380 390 400 410 420
 GACCGACCAAGACCTTAAACAGGTACTCTCCCAACTCCCCCGGTGATCCAGCAAGATCCCCCAAATAC
 430 440 450 460 470 480 490
 15 TACGAGGAGATTCCCGGTGAGTCCCACTTCCGTCTTTCCTACATTTTCTCCACCAATCCTGACCGATGAC
 500 510 520 530 540 550 560
 CCCCCAAAACACGATTTCCAAAGCCCGCTCAACCCCATGTCTCCGAGATTGTCTATCCTTAATACCCCG
 570 580 590 600 610 620 630
 ACCGAATTTGCATACCCCGTCAAGCCAGCCCGGTGATCCCTCCACCCTCCCTATTGTCAAGTTCCAAATG
 20 640 650 660 670 680 690 700
 GACCCCTCCAGCCGCAAAAGTCCGATGTACGTTAAGAGATTTTACCTGCTCATTTTATTCCATCGAATTT
 710 720 730 740 750 760 770
 CCCCCGACTAATTTGGTTGTCAAGTTCTTTTCTCCGACCAAGAGAACCTCATCCCGTTAACCATCCGT
 25 780 790 800 810 820 830 840
 CACCCCGGACTTCCCAACCATCAAATTCATAACCCAGCCCTCGAATCATCCCGAAGCTTGGATTTAACAGTG
 850 860 870 880 890 900 910
 CCCCCGTCCCGCTCAATTACAACCCCTTCACCTTCAAGCTCTTCCAGCCACCCGAGTTTCTTCCGATAT
 920 930 940 950 960 970 980
 30 TCCCTCCCGCATAGCCGTCCGAAACCACTTCTCCTTCCAGCCCTATGACCCGATCGTCCAGCAAGCCCGA
 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 ATCCCCCGACCCCTTTTATCATCGTCCGCAATCCGACAGGCAATTTGGTTTGAATTCTCCCCACCA
 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 CCATCCGAAACGAGTCTGCTCCACCCCAATCTACCATCGTCCACACCAACCACTCTTCTTCCACACCG
 35 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 CAAAAATGAGAAAGAGCTCCATCCCTTACCCGACTCATCGAATCCCAACCAACCGTATCGAGTTCTCTCTC
 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 CACCCGTTCCAGCCGACCAAAACAGCCATTTCCCACTCTCCCGCCAGCAAGACAATTATCCCTTTACCA
 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 40 TCTGCCCCCTTACGAGGAGCCCAAGAGCAGAGCCCGGACTCTGTTCAATATCATCTACGACCATCCCCG
 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TAGACAGCCAACCGTCCCGCTTCCCCCCCCACCAACCCTCATCAGATCTTTGTCTATCCCGTTTGACCAG
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 45 CAGCAGGAGAGCTCTCCCGTCAACCCGACCGTTTCAAGCCCTCTTCATCAGGACCCAATCCATCTTTTGT
 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
 TGTACCTTCAACCGACTCCGTCTTCACTTCTTCCCCCGGACTCCCTACCGTTTGTACCATCTGACTCATA
 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 50 TAAATGTCTAAGCCCTACCTACACTATACCTAAGCGAGAGAACCGTACAGTCATTAAAGTACCCCGCTAT



1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 AGTACCCCGATCTCTAGATAGAACATTTAGTAGACATTACGATCCCTAACTAATTTAACTTCACCATTCGT
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 CCCCTTCATATTTCATTTTCATCCATTATACACTCTTAATCGTTTCCCGGTACAAACCCGNATATATACGAC
 5 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
 CATACCGTGTGAGAAACACCCCTTCCCGTCTCGTTCCCGTACTTAACCTATATATTCTACACCCCAAT
 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 ACTCAATGTCCCTTACCACTAACCCCGACTCTACCGTAAGTCCCGGTATATACGTCAGAACTCTTAA
 10 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960
 GACTGAAGACACCATATCAACCCGTTACCCTCCACCGTACCTACTACCTTCAATATCACTCTTTCACCATG
 1970
 CACACCGTCCAC.

15

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel la séquence d'ADN comprend les séquences requises pour la transcription et la traduction du gène PAT de Penicillium chrysogenum.
- 20 4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel les séquences qui sont requises pour la transcription et la traduction du gène PAT de Penicillium chrysogenum sont les séquences entre le gène de l'isopénicilline N synthétase et le gène PAT de Penicillium chrysogenum.
- 25 5. Procédé pour la production d'un vecteur qui contient une séquence d'ADN qui code pour l'enzyme pénicillinacyltransférase (PAT), caractérisé en ce que la séquence d'ADN qui code pour l'enzyme pénicillinacyltransférase présentant la séquence suivante :

10 20
 MetLeuHisIleLeuCysGlnGlyThrProPheGluIleGlyTyrGluHisGlySerAla
 30 40
 AlaLysAlaValIleAlaArgSerIleAspPheAlaValAspLeuIleArgGlyLysThr
 50 60
 LysLysThrAspGluGluLeuLysGlnValLeuSerGlnLeuGlyArgValIleGluGlu
 70 80
 ArgTrpProLysTyrTyrGluGluIleArgGlyIleAlaLysGlyAlaGluArgAspVal
 35 90 100
 SerGluIleValMetLeuAsnThrArgThrGluPheAlaTyrGlyLeuLysAlaAlaArg
 110 120
 AspGlyCysThrThrAlaTyrCysGlnLeuProAsnGlyAlaLeuGlnGlyGlnAsnTrp
 130 140
 40 AspPhePheSerAlaThrLysGluAsnLeuIleArgLeuThrIleArgGlnAlaGlyLeu
 150 160
 ProThrIleLysPheIleThrGluAlaGlyIleIleGlyLysValGlyPheAsnSerAla
 170 180
 45 GlyValAlaValAsnTyrAsnAlaLeuHisLeuGlnGlyLeuArgProThrGlyValPro
 190 200
 SerHisIleAlaLeuArgIleAlaLeuGluSerThrSerProSerGlnAlaTyrAspArg

50

55



210 220
 IleValGluGlnGlyGlyMetAlaAlaSerAlaPheIleMetValGlyAsnGlyHisGlu
 230 240
 AlaPheGlyLeuGluPheSerProThrSerIleArgLysGlnValLeuAspAlaAsnGly
 5 250 260
 ArgMetValHisThrAsnHisCysLeuLeuGlnHisGlyLysAsnGluLysGluLeuAsp
 270 280
 ProLeuProAspSerTrpAsnArgHisGlnArgMetGluPheLeuLeuAspGlyPheAsp
 10 290 300
 GlyThrLysGlnAlaPheAlaGlnLeuTrpAlaAspGluAspAsnTyrProPheSerIle
 310 320
 CysArgAlaTyrGluGluGlyLysSerArgGlyAlaThrLeuPheAsnIleIleTyrAsp
 15 330 340
 HisAlaArgArgGluAlaThrValArgLeuGlyArgProThrAsnProAspGluMetPhe
 350
 ValMetArgPheAspGluGluAspGluArgSerAlaLeuAsnAlaArgLeu,

est liée à un vecteur par des méthodes de recombinaison.

6. Vecteur selon la revendication 5, dans lequel la séquence d'ADN, qui code pour l'enzyme pénicillina-cyltransférase (PAT), comprend la séquence suivante :

25 10 20 30 40 50 60 70
 GTTCATGTCCTCATCAGTGTCTATCGTCCACATTCGTCGCTACCCCAATATAAATCTCAGCATCCA
 80 90 100 110 120 130 140
 GTTCCCCCTCCATCATCATCCCCACGACCCCGTTTGTCTATCTCCGTCAGCCAGGTCTCAGTTGTTTACCC
 150 160 170 180 190 200 210
 30 ATCTTCCGACCCCAACAGAAATCGTTTACATCTCTCTCAACCCACTCCCTTTCAAGTAAGTCTCCAC
 220 230 240 250 260 270 280
 TCAATACCAGATTTTTCCTTCTCAATCTTCCAGTTCTCACCCTGATCCAGATCCCGTACCAACATCGCT
 290 300 310 320 330 340 350
 35 CTGCTCCGAAACCCGTCATACCCAGAACCATTCGACTTCCCGTCGATCTCATCCGACCGAAACGAAGAA
 360 370 380 390 400 410 420
 CACCGACCAAGACCTTAAACACGTAATCTCTCCAACTCCCGCCGTCATCCAGCAAGATCCCGCAATAC
 430 440 450 460 470 480 490
 TACGACGAGATTCCCGTCAGTCCCACTTCCGTCCTTCTACATTTTCTCCACCAATCTCACCAGATGAC
 500 510 520 530 540 550 560
 40 CCCCCGAAACCAAGTATTCCAAACCCCGCTCAACCCCATGCTCTCCGACATTCTCATCTTAAATACCCCG
 570 580 590 600 610 620 630
 ACCGAATTTCCATACCCCGTCAACCCACCCCGTCATCCGTCACCACTCCCTATTGTCAGTTCCAAATC
 640 650 660 670 680 690 700
 45 CACCCCTCCAGCCCCCAAACTCCGATGTACGTTAAGACATTTTACCTCCTCATTTTATTCCATCGAATTT
 710 720 730 740 750 760 770
 CCCCCGACTAATTTCTGTTCTCAAGTTCTTTTCTCCACCAAGAGAACCTGATCCCGTTAACCATCCGT



780 790 800 810 820 830 840
 CACCCCGACTTCCCACCATEAAATTCATAACCGACCGCTCGAATCATCCCGAACGTTGGATTAAACAGTG
 5 850 860 870 880 890 900 910
 CCCCCGTCCCGTCAATTACAACCCCTTCACGTTCAACGTTCTCCACCCACCCGAGTTCCTTCCCATAT
 920 930 940 950 960 970 980
 TCCCTCCCGATACCGCTCGAAACCACTTCTCCTTCCACCCCTATGACCCGATCGTCCGACCAACCCCGA
 10 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 ATCCCCCGCACCGCTTTTATCATCGTGGCAATCGCCACCGACCCATTTCGTTTCCAAATTCCTCCCCACCA
 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 CCATCCGAAACGACGCTCCTCCACCCGAATGTACGATCGTCCACACCAACCACTCCTTCTTCACCACCG
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 15 CAAAAATCAGAAACGCTCGATCCCTTACCCGACTCATCGAATCGCCACCGACCGTATCGAGTTCCTCCTC
 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GACCCGTTCCGACCCACCAAAACAGCCATTTCCCGACGCTCTCCCGGACCAAGACAATTATCCGTTTACCA
 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 TCTCCCCCGCTTACCACCGCCCAAGACGACGCCCCGACTCTGTTCAATATCATCTACGACCATCCCCG
 20 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TAGAGACCCAAACCGTCCCCCTTCCCCCGCCGACCAACCCTCATGAGATGTTTGTATCCCGTTTCACGAG
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 CACGACGACAGGTCTCCCTCAACCCCAACGCTTTCAACCGTCTTCATGACGACCCAAATCCATCTTTTGT
 25 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
 TGTACCTTCAACCGACTCCGTCTTCACTTCTTCCCCCGACTCCCTACCGTTTGTACCATCTCACTCATA
 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
 TAAATCTCTACCCCTACCTACACTATACCTAACCGACAGAACCGTAGAGTCATTAAACGTACCGCCCTAT
 30 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 AGTACCCCGATCTCTAGATAGAACATTTAGTAGACATTACGATCCCTAACTAATTTAACTTGACCATTTGT
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750
 CCCGTTTCATATTGATTTTCATCCATTATACACTCTTAATCGTTTCCCGGTAGAACCCGNATATATACGAC
 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820
 35 CATACCGTGTGAGAACAGCCGTTCCCGTCTCCTTCCCGGTACTTAACCTATATATTCTACACCGCCAAAT
 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 ACTCAATGTCCCGTTACACCTAAGCCCGACTCTACCGTAAGTCCCGTCATATACGTCAGAACTCTTAA
 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960
 GACTCAACACACCATATACCGGTTACCGTCCACCGTACCTACTACGTTCAATATCACTCTTTCACGATG
 40 1970
 CACACCGTCCAC.

- 45
7. Procédé selon la revendication 5 ou 6, dans lequel le vecteur contient d'autres gènes qui sont puis pour la transcription et la traduction du gène PAT de Penicillium chrysogenum.
 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, dans lequel le vecteur contient d'autres gènes qui permettent une sélection du plasmide dans des micro-organismes producteurs de β -lactames.
 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, dans lequel le vecteur contient un autre gène qui code pour l'enzyme isopénicilline N synthétase.
 - 55 10. Procédé pour la production de l'enzyme pénicillinacyltransférase (PAT), consistant en la transformation d'un hôte à l'aide d'un vecteur tel que défini à l'une quelconque des revendications 6 à 9 et l'isolement de la PAT exprimée.



11. Procédé pour la production de cellules contenant un vecteur tel que défini à l'une quelconque des revendications 5 à 9, caractérisé en ce qu'on transforme les cellules avec un vecteur tel que défini à l'une quelconque des revendications 5 à 9.
- 5 12. Procédé pour l'amélioration de la production d'une pénicilline, caractérisé en ce qu'on transforme une cellule productrice de pénicilline avec un vecteur tel que défini à l'une quelconque des revendications 5 à 9, et on isole la pénicilline.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55