

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

211 207 B

(21) A bejelentés ügyszáma: 3720/86
(22) A bejelentés napja: 1986. 08. 28.
(30) Elsőbbségi adatok:
85/21495 1985. 08. 29. GB
(83) Letétbe helyezés: ATCC 20658, ATCC 26108, ATCC
26922

(51) Int. Cl.⁶

C 12 N 15/81

(40) A közzététel napja: 1987. 07. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1995. 11. 28.

(72) Feltalálók:

dr. Meyhack, Bernd, Magden (DE)
dr. Hinnen, Albert, Bázél (CH)

(73) Szabadalmas:

Ciba-Geigy AG., Bázél (CH)

(74) Képviselő:

S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54) **Eljárás élesztő PH05 gén upstream aktivációs szekvenciáit tartalmazó,
rekombináns DNS-molekulák előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás élesztő PH05-gén UAS1 és/vagy UAS2 elemeket tartalmazó rekombináns DNS fragmentumok előállítására oly módon, hogy ezeket a szekvenciákat a natív élesztő promoterből elkülönítik vagy analóg szekvenciákat kémiai úton szintetizálnak.

A találmány tárgya továbbá ezeket a szekvenciákat tartalmazó hibrid promoterek és vektorok, valamint ezeknek a szekvenciáknak a felhasználása élesztőben rekombináns fehérjék expressziójára.

peptidok előállítására élesztő gazdaszervezetekben, rekombináns-DNS technikai alkalmazásával. Közlebről, a találmány új, „upstream” aktivációs szekvenciák, az ezeket tartalmazó hibrid élesztő promoterek, élesztősejtek transzformálására használható új hibrid vektorok, az ezekkel transzformált élesztősejtek és az élesztő számára idegen polipeptidok előállítására vonatkozik.

Az utóbbi években nagy fejlődés volt a géntechnológiában, és jelenleg működik néhány olyan rendszer, amely genetikailag átalakított mikroorganizmusokat, különösképpen az *Escherichia coli* enterobaktérium törzseit és a sütőélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) törzseit használja fel. Igény van azonban további és jobb rendszerekre, különösen eukarióta rendszerekre, úgymint élesztőkre, amelyek alkalmasak proteinek gazdaságos és ipari méretű előállítására. Jelenleg különböző élesztővektorok állnak rendelkezésre génklónozásra. Ahhoz, hogy az idegen gének hatékonyan expresszálódhassanak az élesztőben, a strukturális kódoló szekvenciát olyan erős élesztő promoterekkel kell kombinálni, amelyek előnyösen szabályozó tulajdonságokkal rendelkeznek, ami lehetővé teszi a génextpresszálódás külső irányítását. Mivel úgy hiszik, hogy az expresszálódás (termékképződés) hatékonysága az alkalmazott promoter erősségének függvénye és azzal arányos, a géntechnológia területén dolgozók különleges figyelmet szentelnek erőteljes promoter rendszerek kiépítésének.

A fehérjét kódoló klónozott élesztőgének in vitro mutagenézise és visszaépítésük az élesztősejtbe funkcionális analízis céljából lehetővé tette számos különböző alapvető cisz-hatású promoter alkotórész azonosítását [összefoglaló irodalmi hivatkozás: Guarente, L.: *Cell*, 36, 799, (1984)]. Ezek közé az alkotórészek közé tartoznak – a felsorolást azokkal az alkotórészekkel kezdve, amelyek közvetlenül közrefogják a fehérjekódoló régiót a gén 5'-végénél – a következők:

- egy 5'-átírt vezetőrégió, amely A-T-ben meglehetősen gazdag, néha tartalmaz egy CAACAA-CAA, vagy ezzel rokon szekvenciát is,
- átírási kezdőpontok, amely a ATG translációs indítókodontól körülbelül 40–60 bázispárra – néha távolabb – helyezkednek el, és általában több különböző erősségű mRNS indítóhelyet jelölnek,
- egy (néha több) TATA-box, amely az átírási kezdőponttól körülbelül 40–80 bázispárra helyezkedik el, és feltehetően alapvető RNS-polimeráz-II felismerőhelyként működik,
- „upstream” aktivációs hely(ek) (rövidítése a továbbiakban UAS), amelyek a szabályozó fehérjék feltételezett célhelyei, és körülbelül 100–300 bázispárral a TATA-box „előtt” helyezkednek el.

Az „upstream” aktivációs hely más módon működik, mint a prokariótákban talált szabályozóhelyek, és inkább az emlős szervezetek gyorsítóhelyeire emlékeztet. Részletesebb adatok találhatóak a GAL 1, GAL 7, GAL 10 élesztőcsoportról, amelyeknél a pozitíven működő szabályozófehérje (GAL 4 géntermék) közvetlen

kölcsönhatásba lép a GAL 1 – GAL 10 UAS-ével [Giniger és munkatársai: *Cell*, 40, 767, (1985)].

Az élesztő CYC 1 gén TATA-box-a előtt elhelyezkedő, a GAL 1 – GAL 10 UAS-ét kódoló promoter szegmensek összeépítésével egy olyan hibrid promotert hoztak létre, amelynek átírása a GAL 1 – GAL 10 UAS-ének szabályozása alatt áll, azaz GAL 4-gén-függő [Guarente, L. és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7410, (1984)]. Hasonló szerkezetű promotert hoztak létre a CYC 1 és LEU 2 promoter alkotórészeinek összeépítésével [Guarente, L. és munkatársai: *Cell*, 36, 503, (1984)]. Mindkét rendszer élesztőből származó promoter alkotórészeket és protein kódoló szekvenciákat tartalmaz, és nincs bizonyíték arra, hogy olyan génekkel is működnek, amelyek az élesztő számára idegenek.

Egy nemrégiben közrebocsátott szabadalmi bejelentés (PCT 84/4757) az élesztő PGK-gén egy UAS alkotórészét írja le. Kimutatják egy alapvető promoter alkotórész jelentését, amely az ATG-től számítva a –324. és –455. bázisok között helyezkedik el. Feltételezik, hogy ennek az alkotórésznek a bevétele más promoterek elé felfokozná bármilyen más élesztő promoter erejét. Nem adnak azonban semmilyen, ezt a feltételezést alátámasztó példát; az érvelés teljesen negatív adatokon alapul (egy promoter elroncsolása). Könnyen lehetséges, hogy ez az alkotórész a PGK-promoter egy alapvető része, de kétséges, hogy egy ilyen alkotórész működne-e egy hibrid promoter részeként. A PGK UAS-e továbbá nem kapcsolódik egy szabályozó szignálhoz, azaz nem teszi lehetővé a „downstream” kódoló szekvencia expressziójának (átíródásának) irányítását egy specifikus fiziológiai szignál segítségével.

A glikoliitikus gének promotereinek egy része glükóz jelenlétében indukálódik. Ezek működhetnek hibásan is, ha a sejteket glükózmentes közegben tenyészítjük. Ez azt jelenti, hogy az élesztő gazdaségeket egy olyan közegben kellene transzformálni és regenerálni, amelyben a glükózt más szénforrással (acetát, glicerint, laktát, stb.) helyettesítették, hogy meg lehessen védeni a sejteket egy olyan, esetleg káros vagy pusztító génterméktől, amely a sejten belül gyúlik fel. Mivel a protoplaszt [Hinnen, A. és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1929 (1978) vagy a sóval kezelt teljes sejtek [Ito és munkatársai: *J. Bacteriol.*, 153, 163 (1983)] regenerálását általában gazdag tápközegben végzik, hogy lehetővé tegyék a sejtek gyors regenerálódását és telepek képződését, mindegyik jelenleg használt transzformációs előírat glükózt alkalmaz szénforrásként. Várható, hogy a regenerálódás és az újraképződés glükózmentes közegben igen rosszul vagy egyáltalán nem megy végbe.

Az irodalomban általánosan ismeretes, hogy az expresszálódás időzítését szabályozni kell annak biztosítására, hogy a fehérje csak akkor képződjön nagy mennyiségben, amikor a sejt legjobban bírja az idegen fehérje nagy mennyiségének jelenlétét, azaz a növekedési szakaszon kívül. Az is kívánatos, hogy az expresszió szabályozása ne függjön a mikrobiális növekedéshez legfontosabb szénforrás, azaz a glükóz jelenlé-

tétől vagy hiányától. Az irodalomból alig ismeretesek olyan szabályozható és erős promóter rendszerek, amelyek megfelelnek ezeknek a kívánalmaknak és idegen gének élesztőkkel végzett könnyű és technikailag alkalmazható expresszállására alkalmazhatók. Szükség van ezért ilyen promóter rendszerek kifejlesztésére.

Meglepő módon azt találtuk, hogy ha kombináljuk a glikolitikus anyagcserében részt vevő enzimek expresszállódását szabályozó promóterek – amelyeket jelenleg általánosan a legerősebb promóterekhez tartozóknak tartanak – TATA-box régióját egy olyan szabályozható promóter „upstream” promóter alkotórészeivel, amelynek represszállódása vagy derepresszállódása nem függ egy alapvető alkotórész – például egy esszenciális szén- vagy nitrogénforrás – jelenlététől vagy hiányától a tápközegben, akkor olyan erős hibrid promótereket kapunk, amelyek kielégítik a technikailag alkalmazható promóter rendszerekkel szemben támasztott követelményeket.

A találmány szerinti eljárással olyan hibrid promótereket, különösen olyan glikolitikus gének promótereit állítottunk elő, amelyeket a savas foszfátáz PH05-gén UAS-ének szabályozása alá helyeztünk, és amelyeket idegen gének élesztőkben való hatékony expresszállására alkalmaztunk.

A találmány tárgyát képezik tehát az élesztő PH05-gén újonnan elkülönített UAS-szignáljai, a PH05 UAS-szignálokot tartalmazó hibrid promóterek, az ilyen hibrid promótereket tartalmazó hibrid vektorok és az ilyen hibrid vektorokkal transzformált élesztő gazdaszervezetek előállítására, valamint a transzformált élesztő gazdaszervezetek felhasználása élesztő idegen polipeptid előállítási eljárása.

Részletesebben a találmány szerinti eljárás során

- UAS1 (PH05) és/vagy UAS2 (PH05) szekvenciákat tartalmazó DNS-fragmentumokat és szubfragmentumokat úgy állítottunk elő, hogy egy PH05-gént tartalmazó DNS-t, vagy a PH05-gént vagy annak 5'-terminális részét megfelelő restrikciós endonukleázokkal hasítottunk és adott esetben a fragmentumokat egy exonukleázal rövidítettük, majd az így kapott fragmentumok közül kiválogatjuk azokat, amelyeknek UAS-funkciója megmaradt, és a fragmentumokat vagy szubfragmentumokat elkülönítjük, vagy a fenti DNS-fragmentumokat vagy szubfragmentumokat kémiai DNS-szintézissel állítjuk elő;
- élesztő hibrid promótereket úgy állítunk elő, hogy egy, az élesztő PH05 gén upstream aktivációs szekvenciáját/szekvenciáit tartalmazó, 5' irányban elhelyezkedő, upstream promóter egységet, egy PH05-től különböző élesztő gén 3' irányban elhelyezkedő, működőképes TATA-boxot tartalmazó, és a translációs start-kódon közelében végződő downstream promóter egységéhez kapcsolunk;
- élesztő hibrid-vektorokat úgy állítunk elő, hogy egy hibrid-promótert – amely az élesztő PH05 gén UAS szekvenciáját/szekvenciáit magában foglaló, 5' irányban elhelyezkedő, upstream pro-

móter egységből, valamint egy PH05-től különböző élesztő gén 3' irányban elhelyezkedő, transzkripciósi iniciációs helyekkel rendelkező működőképes TATA-boxot is tartalmazó downstream promóter egységből áll – upstream irányban egy élesztő számára heterológ polipeptidet kódoló DNS fragmentum elé kapcsolunk és az ilymódon előállított NDS molekulák közül egyet, vagy többet élesztő vektor DNS-be inserálunk;

- transzformált élesztősejtek előállításánál a fenti hibrid-vektorokat alkalmazzuk; és
- élesztő-idegen polipeptidet úgy állítunk elő, hogy egy élesztő törzset – melyet olyan hibrid-vektorral transzformálunk, amely egy vagy több DNS inszertet tartalmaz, mely inszertek mindegyike tartalmaz egy hibrid-promóter transzkripciósi szabályozása alatt álló, élesztő számára heterológ polipeptidet kódoló DNS részletet, mely promóter az élesztő PH05 gén UAS szekvenciáját/szekvenciáit magában foglaló, 5' irányban elhelyezkedő, upstream promóter egységből, valamint egy PH05-től különböző élesztő gén 3' irányban elhelyezkedő, transzkripciósi iniciációs helyekkel rendelkező, működőképes TATA-boxot is tartalmazó downstream promóter egységből áll – tenyésztjük és az expresszállt polipeptidet izoláljuk.

Először ismertetjük az élesztő savas foszfátáz (PH05) gén „upstream” aktivációs szekvenciáját és ennek felhasználását hibrid promóter előállítására.

Ezelőtt nem volt ismert az irodalomban, hogy egy vagy több „upstream” aktivációs hely (vagy „upstream” aktivációs szekvencia, rövidítése UAS) létezik-e, amely az élesztő PH05-gén átírását befolyásolja. A PH05-gén egy represszibilis élesztő savas foszfátáz kódol. Ez szervesen foszfátok nagy koncentrációjánál represszálódik és szervesen foszfátok hiányában derepresszálódik [Meyhack, B. és munkatársai: EMBO J., 1, 675, (1982)].

A PH05-gén 5'-regiójának elemzése olyan cisz-hatású alkotórészek azonosításához vezetett, amelyek befolyásolják a PH05-gén átírását. A PH05-gén 5'-regiójának egy 623 bázispárnyi BamHI-SalI fragmentumát, amelyet az M13mp9 fág-vektorba (rekombináns vektor M13mp9/PH05 Bam-Sal, vö. 143 081. számú európai szabadalmi bejelentés) klónoztak, az egyik kísérletben a Bam-helytől, a másik kísérletben az Sal-helytől kiindulva emésztettek Ba131 exonukleázal. Így egy sorozat megrövidített PH05 promóter fragmentumot állítottak elő, amelyeket szekvenanciaanalízisnek vetettek alá és a megrövidített végeken szintetikus EcoRI-kapcsolókkal láttak el. Az Sal-helyen megrövidített fragmentumok („balkar promóter fragmentumok”) és a Bam-helyen megrövidített fragmentumok („jobbkar promóter fragmentumok”) kombinálásával a PH05 promóter régió deléciós mutánsainak egy sorozatát állították elő, amelyeknek a PH05 strukturgén expresszállódását befolyásoló képességét megvizsgálták. Megállapították, hogy a –225. és –263. nukleotidok közötti rész deléció-

ja a savas foszfatáz aktivitás ötszörös csökkenéséhez, és a -361. és -392., vagy a -346. és -369. nukleotidok közötti rész deléciója a savas foszfatáz aktivitás tízszeres csökkenéséhez vezet (a nukleotidok számozása az 1. ábrán látható). Ezek a hatások az „upstream” aktivációs helyeknek (UAS) tulajdoníthatók, amelyek alapvető fontosságúak a PH05 expresszióhoz. Azt az UAS-t, amely a -365. nukleotid szomszédságában helyezkedik el egy 268 bázispárnyi BamHI-ClaI fragmentumban (-274. – -541. nukleotidok a PH05-gén 5'-régijében, UAS1(PH05)-nek nevezik, míg a -245. nukleotid szomszédságában elhelyezkedő UAS régiót, amely a 100 bázispárnyi ClaI-BstEII fragmentumban (-174. – -273. nukleotid) helyezkedik el a PH05-gén 5'-régijében, UAS2(PH05)-nek nevezik.

Találmányunk különösképpen a PH05-gén BamHI-BstEII fragmentumában a -174. és -541. nukleotidok között elhelyezkedő UAS1 (PH05) és UAS2 (PH05) „upstream” aktivációs szekvenciák előállítására vonatkozik.

Találmányunk kiterjed továbbá a PH5-gén BamHI-ClaI fragmentumában a -274. és -541. nukleotidok között található UAS1 (PH05) „upstream” aktivációs szekvencia és a PH05-gén ClaI-BstEII fragmentumában a -174. és -273. nukleotidok között található UAS2 (PH05) „upstream” aktivációs szekvencia előállítására.

Különösen előnyös az UAS1 (PH05) „upstream” aktivációs szekvencia. Az UAS1 szabályozó szignál pontos helye a BamHI-ClaI fragmentumon belül meghatározható; egy 31 bázispárnyi DNS-fragmentumban (a PH05 promoter régió -381. és -351. pozíciója közötti rész) helyezkedik el. A fragmentum előnyösen bármelyik végén megfelelő restrikciós helyekkel ellátott tompa végű kapcsolókat tartalmaz, vagy egy restrikciós endonukleázra, úgymint EcoRI-re specifikus tapadós végeket tartalmaz. A 31 bázispárnyi fragmentum szekvenciája a következő:

```
GAAATATATATTAATTAGCACGTTTTTCGCA
CTTTATATATAATTTAATCGTGCAAAAGCGT
```

Az UAS1 (PH05) és/vagy UAS2 (PH05) szekvenciákat tartalmazó DNS-fragmentumok előállítási eljárásának lényege az, hogy a PH05-gént tartalmazó DNS PH05-génjét vagy annak 5'-vég részét megfelelő restrikciós endonukleázokkal hasítjuk és a kívánt fragmentumokat elkülönítjük. Így például a PH05 promotert és a PH05 kódoló régió egy részét tartalmazó PH05 (ismertése fent) 623 bázispárnyi BamHI-SalI fragmentumát a BamHI és BstEII restrikciós endonukleázokkal emésztjük és elkülönítjük a 368 bázispárnyi szubfragmentumot, amely tartalmazza mindkét „upstream” aktivációs helyet. Analóg módon a fenti BamHI-SalI fragmentumot BamHI-gyel és ClaI-gyel vagy ClaI-gyel és BstEII-gyel hasítva egy 268 bázispárnyi, UAS1(PH05)-öt tartalmazó BamHI-ClaI szubfragmentumot, illetve egy 100 bázispárnyi, UAS2(PH05)-öt tartalmazó ClaI-BstEII szubfragmentumot kapunk. A fragmentumok és szubfragmentumok elkülönítését és tisztítását szokásos módszerekkel, például agaróz gélelektroforézissel vagy poliakril-amid gélelektroforézissel végezzük.

A találmány szerinti eljárás során „upstream” aktivációs helyeket tartalmazó DNS-fragmentumokat önmagában ismert módon, például egy exonukleázal, úgymint Bal31-gyel végzett részleges emésztéssel rövidíthetjük úgy, hogy a megrövidített fragmentum AUS funkciója megmaradjon. A rövidítést végezhetjük a fragmentumok 5'- vagy 3'-végén, vagy mindkét végén. Azokat a szubfragmentumokat, amelyek megtartották az UAS funkciót, a fent leírt módon választjuk ki, azaz az eredeti, az UAS(eke)-t tartalmazó szekvenciákat a megrövidített fragmentumokkal helyettesítjük és megvizsgáljuk a kapott PH05 promoter deléciós mutáns, hogy mennyire tudja befolyásolni a PH05 strukturgén expresszáldását. A találmány szerinti fragmentumok és azok megrövidített származékai, amelyek a PH05-gén egyik vagy mindkét „upstream” aktivációs helyét tartalmazzák, elláthatók mesterséges kapcsoló szekvenciákkal, amelyek bármelyik véghez kapcsolhatók, hogy a hibrid promoterek előállítását, illetve egy vektorhoz való kapcsolódást megkönnyítsék.

A DNS-fragmentumokat, valamint a PH05 „upstream” aktivációs helyét/helyeit tartalmazó rövidített származékait kémiai DNS-szintézissel is előállíthatjuk, az irodalomból jól ismert szokásos módszerek alkalmazásával. Megfelelő technikát dolgozott ki S.A. Narang [Tetrahedron, 39, 3 (1983)]. Különösen a 146 785. számú európai szabadalmi bejelentésben leírt módszerek használhatók.

A találmány egy további részét képezi a PH05 „upstream” aktivációs helyeinek felhasználása hibrid promoterek előállítására, és a PH05-gén „upstream” aktivációs helyeit tartalmazó hibrid promoterek előállítására.

A találmány különösképpen élesztő hibrid promoterek előállítására irányul, amelyek magukba foglalnak egy 5' „upstream” promoter alkotórészt, amely tartalmazza az élesztő PH05-gén „upstream” aktivációs helyét/helyeit és egy olyan élesztőgén 3' „downstream” promoter alkotórészét, amely a PH05-géntől eltérő, és amely olyan átírási kezdőpontokat tartalmaz, amelyek magukban foglalnak egy funkcionális TATA-box-ot és a translációs start kodonhoz közel fejeződnek be; különleges esetben a hibrid promoter csak ezekből a részekből áll. Az 5' „upstream” promoter alkotórész speciálisan a fent meghatározott DNS-fragmentumok valamelyike, elsősorban a 368 bázispárnyi BamHI-BstEII fragmentum, amely UAS1(PH05)-öt és UAS2(PH05)-öt tartalmaz, vagy a 268 bázispárnyi BamHI-ClaI fragmentum, amely UAS1(PH05)-öt tartalmaz, vagy ennek rövidített származékai, amelyek megtartották az UAS funkciót, így a 31 bázispárnyi fragmentum, amely tartalmazza az UAS1(PH05)-öt, vagy ennek még kisebb szubfragmentumai.

A 3' „downstream” promoter előnyösen egy erősen expresszáldott élesztőgénből származik, különösképpen egy olyan élesztőgén promotereből, amely egy glikolitikus enzimet kódol, úgymint az enoláz, a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH), a 3-foszfoglucérat-kináz (PGK), a hexokináz, a piruvát-dekarboxiláz, a foszfofruktokináz, a glükóz-6-foszfát-

izomeráz, a 3-foszfogllicerát-mutáz, a piruvát-kináz (PyK), a triózfoszfát-izomeráz, a foszfoglükóz-izomeráz vagy a glükokináz gének promotereiből. A 3' promoter alkotórészek magukba foglalják a TATA-box-ot, amely részt vesz az RNS-polimeráz-II enzim elhelyezésében a helyes átírás elkezdéséhez és az átírás megfelelő kezdőpontjaihoz (fő mRNS kezdőpontok). A TATA-box-tól „lefelé” a 3' promoter alkotórész a fő mRNS kezdőpont és a transzlációs indítókodon (ATG) közötti régióig terjed, előnyösen a transzlációs indítókodon közelében. A TATA-box „előtti” oldalon a 3' promoter alkotórészek körülbelül 50–150 eredeti bázispárt tartalmaznak. Ennek az „elől” levő DNS-szekvenciának a pontos hossza nem kritikus tényező, mivel úgy látszik, hogy van bizonyos rugalmasság az UAS-ek és a TATA-box térbeli elhelyezkedésében.

A találmány szerinti eljárás előnyös 3' promoter alkotórésze a GAPDH promoterből származik, amelyet az irodalomban ismertett egyik legerősebb élesztő promoterként ismernek [a GAPDH enzim mennyisége körülbelül 5%-a lehet a *S. cerevisiae* szárazsúlyának, [vö. E. G. Krebs: *J. Biol. Chem.*, 200, 471, (1953)]. A 3' GAPDH promoter alkotórész előnyösen a –300. és a –180. nukleotid között kezdődik és a GAPDH-gén –1. nukleotidjénél végződik. A találmány egyik előnyös kiviteli alakjánál a 3' promoter alkotórész a GAPDH-gén –199. és –1. közötti nukleotidjeit tartalmazza. Egy másik előnyös kiviteli alak esetében a 3' promoter alkotórész a GAPDH-gén –263. és –1. közötti nukleotidjeit tartalmazza.

A találmány szerinti eljárással előállított hibrid promoterek tartalmazhatnak egyetlen UAS(PH05)-öt vagy több, azonos típusú UAS(PH05)-öt, úgymint UAS1(PH05)-öt, előnyösen „fejtől farokig” orientációban. Ami a 3' promoter alkotórészt illeti, az UAS(ek) orientációja az eredeti PH05 promoter orientációjához képest azonos vagy fordított lehet.

A találmány szerinti eljárással előállított hibrid promoterek alkotórészei, azaz a PH05 UAS-ét/UAS-eit tartalmazó promoter alkotórész és a TATA-box-ot tartalmazó promoter alkotórész mesterséges kapcsolókkal, tompa véghez való ligálással vagy – ha lehetséges – természetben előforduló kompatibilis hasítóhelyekkel vannak összekapcsolva. A találmány szerinti hibrid promoterek 5'- és 3'-végei megfelelően elvannak látva olyan mesterséges kapcsolókkal, amelyek lehetővé teszik a vektor-DNS-hez való ligálást, és a 3'-végen egy heterológ protein kódoló régióhoz való kapcsolódást.

A találmány szerinti eljárással előállított hibrid promoterek megfelelnek minden, a biotechnológiában felhasználható promoterekkel szemben támasztott kívánalomnak; erősek, a táptalaj esszenciális szén- vagy nitrogénforrásaitól eltérő vegyületekkel indukálhatók, és kényelmesen kezelhetők laboratóriumi vagy ipari méretben.

A találmány kiterjed olyan hibrid promoterek előállítására is, amelyek egy az élesztő PH05-gén „upstream” aktivációs helyét/helyeit tartalmazó 5' „upstream” promoter alkotórészből, és egy a PH05

élesztőgéntől eltérő élesztőgén 3' „downstream” promoter alkotórészből állnak, mely utóbbi kezdőpontokat tartalmaz, amelyek egy funkcionális TATA-box-ot foglalnak magukba és a transzlációs indítókodonhoz közel fejeződnek be; az eljárás értelmében egy 5' „upstream” promoter alkotórészt, amely az élesztő PH05-gén „upstream” aktivációs helyét/helyeit tartalmazza, hozzáképcsoljuk egy PH05-géntől eltérő élesztőgén 3' „downstream” promoter alkotórészehez, amely egy funkcionális TATA-box-ot tartalmaz és a transzlációs indítókodonhoz közel fejeződik be.

A találmány egyik előnyös kiviteli alakjánál a promoter alkotórész ligálását mesterséges kapcsolókkal hajtjuk végre.

A PH05-géntől eltérő élesztőgén fenti „downstream” promoter alkotórészt úgy állítjuk elő, hogy részlegesen emésztyük egy erős élesztőpromoter 5'-végét; ilyen promoter például a fent felsoroltak valamelyike, amely a fő mRNS kezdőpont és a transzlációs indítókodon közötti régióig terjed. Az emésztést egy exonukleázzal, például Ba131-gyel végezzük és a kópt 5' tompa végeket egy mesterséges kapcsoló DNS-hez kapcsoljuk. Olyan promoter alkotórészeket választunk, amelyek megtartják az átírási kezdőpontot/kezdőpontokat, és a TATA-box-ot, beleértve 50–150 bázispárnyit az 5' szekvenciából a TATA-box-ig. A kiválasztást például úgy hajtjuk végre, hogy a kapott promoter alkotórészeket hasfytjuk egy olyan restriktós endonukleázzal, amely felismeri a mesterséges kapcsoló szekvenciát az 5'-végen, és egy olyan restriktós endonukleázzal, amely felismeri a mesterséges kapcsoló szekvenciát a promoter alkotórész 3'-végen, és a kapott DNS-fragmentum hosszúságát agaróz gélelektroforézissel határozzuk meg. A 3' promoter alkotórészeket kémiai úton, az irodalomból ismert módszerekkel is előállíthatjuk.

A találmány szerinti hibrid promotereket emlésgének élesztőkben való expresszáldásának javítására és szabályozására használhatjuk.

A találmány körébe tartoznak olyan hibrid vektorok is, amelyek egy heterológ polipeptidet kódoló gént tartalmaznak; a gén hibrid promoterek szabályozása alatt áll. A találmány szerinti élesztő hibrid vektorok egy vagy több olyan beékelt DNS-szakaszt tartalmaznak, amelyek mindegyike egy az élesztő számára heterológ polipeptidet kódoló DNS-szegmenst tartalmaz; ez a szegmens egy olyan hibrid promoter átírási szabályozása alatt áll, amely egy az élesztő PH05-gén UAS-ét/UAS-eit tartalmazó 5' upstream promoter alkotórészből és egy olyan 3' downstream promoter alkotórészből áll, amely egy a PH05-géntől eltérő élesztőgéntől származik és átírási kezdési helyeket tartalmaz, amelyek egy funkcionális TATA-box-ot is magukba foglalnak.

A találmány szerinti hibrid vektorokat egy hibrid plazmidból és egy lineáris DNS-vektorból választjuk ki.

Egy DNS-szegmens, amely egy az élesztő számára heterológ polipeptidet kódol, egy olyan DNS (gén), amely számos különböző polipeptidet – beleértve a glikozilezett polipeptideket is – kódolhat, különösen a

magasabbrendű eukarióták, elsősorban az emlősök, úgymint az állatok és különösképpen az emberek polipeptidjeit, úgymint enzimeket, amelyek például tápanyagok előállítására és enzimatikus kémiai reakciók végrehajtására használhatók, vagy nem enzimjellegű polipeptideket, amelyek igen hasznosak és értékesek emberi és állati megbetegedések kezelésére vagy megelőzésére, így hormonokat, immunmodulátor, vírusellenes vagy tumorelles hatású polipeptideket, antitesteket, vírus antigéneket, véralvadási faktorokat, élelmiszereket és más hasonlókat.

Ilyen polipeptidek például az inzulin növekedési faktorok, úgymint az epidermális inzulinszerű, emlősejti, idegi vagy transzformációs növekedési faktor, a növekedési hormonok, úgymint az emberi vagy borjú növekedési hormonok, az interleukinok, úgymint az interleukin-1 vagy -2, az emberi makrofág migrációját gátló faktor (MIF), az interferonok, úgymint az emberi α -interferon, például az interferon- α A, - α B, - α D vagy - α F, a β -interferon, a γ -interferon vagy egy hibrid interferon, például egy α A- α D- vagy egy α B- α D-hibrid interferon, hepatitis vírus antigének, úgymint hepatitis B vírus felszíni vagy magi antigénje vagy hepatitis A vírus antigén, plazminogén aktivátorok, úgymint szöveti plazminogén aktivátor vagy urokináz, tumor nekrozis faktor, szomatosztatin, renin, β -endorfin, immunoglobulinok, úgymint az immunoglobulin D, E vagy G könnyű és/vagy nehéz lánci, immunoglobulin kötő faktorok, úgymint immunoglobulin E kötő faktor, kalcitonin, emberi kalcitonin-szerű peptid, véralvadási faktorok, úgymint a IX faktor vagy a VIIIc faktor, egy eglin, úgymint eglin C, egy deszulfátóhirudin HV1, HV2, vagy PA változat, vagy emberi szuperoxid dismutáz. Az előnyös gének azok, amelyek egy humán interferont vagy hibrid interferont, emberi szövet plazminogén aktivátort (t-PA), hepatitis-B vírus felszíni antigént (HBVsAg), inzulinszerű növekedési faktor I-et, eglin C-t vagy deszulfátóhirudin HV1 variánsát kódolják.

A hibrid promoter különösképpen a fent leírtak valamelyike.

A találmány szerinti hibrid vektorok egy vagy több beékelte DNS-szakaszt tartalmazhatnak, amelyek mindegyike tartalmazza egyebek között a hibrid promotert és egy olyan DNS-szegmenst, amely egy az élesztő számára heterológ polipeptidet kódol. Ha a hibrid vektor több, előnyösen 2–4 beékelte DNS-szakaszt tartalmaz, ezek tandem elrendezésben vagy a hibrid vektor különböző helyein lehetnek jelen. Az előnyös hibrid vektorok vagy egy beékelte DNS-szakaszt tartalmaznak, vagy több beékelte DNS-szakaszt, tandem elrendezésben.

A találmány szerinti hibrid vektorokban az élesztő hibrid promoter működőképesen a polipeptid kódoló régióhoz van kötve úgy, hogy biztosítsa a polipeptid hatékony expresszáldását. A találmány egyik előnyös kiviteli alakjánál az élesztő hibrid promoter közvetlenül a kész polipeptidet kódoló régióhoz van kötve egy translációs indító szignállal (ATG), amelyet az összekapcsolási helyhez ékelünk be. Az élesztő hibrid pro-

moternek a polipeptid kódoló régióhoz kapcsolására az egyik előnyös régió az, amely közvetlenül az endogén ATG szomszédságában helyezkedik el.

A találmány egy másik előnyös kiviteli alakja szerint egy jelző (szignál) szekvencia is jelen van. Megfelelő jelző szekvenciák például a PH05 jelző szekvencia, az élesztő invertáz gén jelző szekvenciája, vagy az α -faktor pre-pro szekvenciája, és az expresszáldandó polipeptid kódoló régióhoz természetesen kapcsolódó jelző szekvenciák. Egy másik megoldás szerint összeépített jelző szekvenciákat lehet létrehozni. Azokat a kombinációkat részesítjük előnyben, amelyek pontos hasítást tesznek lehetővé a jelző szekvencia és a kész polipeptid szekvenciája között. További szekvenciák, úgymint pro- vagy spacer-szekvenciák, amelyek vagy tartalmaznak specifikus átalakító szignálokat vagy nem, szintén jelen lehetnek, hogy megkönnyítsék a prekursor molekulák pontos átalakítását. Egy másik megoldás szerint létre lehet hozni olyan összeépített proteineket, amelyek belső átalakító szignálokat tartalmaznak, ami lehetővé teszi az in vivo és in vitro megfelelő maturációt. Az átalakító szignálok előnyösen tartalmaznak egy Lys-Arg maradékot, amelyet a kiválasztási folyamatban részt vevő élesztő endopeptidáz felismer.

A gén expresszáldásakor a géntermék belép a kiválasztási folyamatba és a periplazmatikus térbe kerül tovább. Ha el lehet érni a további kiválasztást a sejtfalon keresztül a tápközegbe, a kitermelést jelentősen lehet növelni. A kinyerési folyamatot tehát egyszerűsíteni lehet anélkül, hogy a sejteket el kellene roncsolni. A polipeptidet továbbá az N-végen egy további metionin jelenléte nélkül lehet kinyerni, mivel nincs szükség egy ATG-re translációs indító szignálként a kódoló szekvencia előtt. Mivel a glikozilezés kapcsolódik a kiválasztási folyamathoz, várható, hogy a termelt polipeptid glikozilezett lesz (amennyiben glikozilezési helyek jelen vannak). Több olyan jellemző van, amely a glikozilezett polipeptideket előnyösebbé teszi a nem glikozilezett polipeptideknél: A glikozilezett polipeptid jobban hasonlít az emlőssejtek eredeti polipeptidjére, mint a nem glikozilezett polipeptid. Az ilyen proteinek harmadlagos szerkezete továbbá valószínűleg bizonyos fókig függ a glikozilgyökök jelenlététől. Várható, hogy az ezekben a molekulákban jelenlevő szénhidrátgyökök kedvezően befolyásolják a kémiai stabilitást és a farmakológiai aktivitást.

A találmány szerinti hibrid vektorok előnyösen egy élesztőgén 3' határoló szekvenciáját is magukba foglalják, amely tartalmazza a megfelelő szignálokat az átírás befejezésére és a poliadenilezésre. Az előnyös 3' határoló szekvencia a PH05-génből származik.

A találmány különösképpen egy olyan lineáris DNS-molekula előállítására vonatkozik, amely lényegében egy hibrid promoterből (amely egy az élesztő PH05-gén UAS-ét/UAS-eit tartalmazó 5' upstream promoter alkotórészből és egy a PH05-géntől eltérő élesztőgén 3' downstream promoter alkotórészből) épül fel; a 3' downstream promoter alkotórész átírási kezdési helyeket tartalmaz, amelyek egy funkcionális

TATA-box-ot is magukba foglalnak), egy az ez által a hibrid promoter által szabályozott DNS-szegmensből, amely az élesztő számára heterológ polipeptidet kódol, és olyan DNS-szegmensből áll, amely az élesztő PH05-gén megfelelően elhelyezkedő átírási befejezési szignáljait tartalmazza.

A homológ 3' és 5' határoló szekvenciák révén a polipeptid kódoló régiót tartalmazó teljes lineáris DNS-vektor stabilan beépül az élesztőkromoszóma PH05 helyére.

A találmány tárgya közelebbről eljárás olyan gyűrűs hibrid plazmidok előállítására, amelyek a hibrid promoteren, a polipeptid kódoló régió és a 3' határoló szekvenciákon kívül olyan további DNS-szekvenciá(ka)t is tartalmaz, amelyek a promoter funkciója szempontjából – azaz a polipeptid kódoló régió expresszállásához – lényegtelenek vagy kevésbé fontosak, de lényeges funkciókat tölthetnek be például az említett hibrid vektorokkal transzformált élesztősejtek szaporításában. A további DNS-szekvencia/szekvenciák prokarióta és/vagy eukarióta sejtekből származhatnak és tartalmazhatnak kromoszomális és/vagy ekstrakromoszomális DNS-szekvenciákat. A további DNS-szekvenciák származhatnak (vagy állhatnak) például plazmid DNS-ből, úgymint bakteriális vagy eurakióta plazmid DNS-ből Vírus DNS-ből és/vagy kromoszomális DNS-ből, úgymint bakteriális, élesztő vagy magasabbrendű eukarióták kromoszomális DNS-éből. Az előnyös hibrid plazmidok olyan további DNS-szekvenciákat tartalmaznak, amelyek bakteriális plazmidokból, különösen az *Escherichia coli* plazmid pBR322-ből vagy ezzel rokon plazmidokból, bakteriofágokból élesztő 2 μ plazmidból és/vagy élesztő kromoszomális DNS-ből származnak.

A további DNS-szekvenciák elsősorban egy élesztő replikációs origót és egy élesztőre szelektív genetikai markert tartalmaznak. Az élesztő replikációs origót, például egy kromoszomális autonóm replikációs szegmenst (ars) tartalmazó hibrid plazmidok extrakromoszomálisan maradnak fenn az élesztősejten belül a transzformáció után és autonóm módon mitózis során replikálódnak. Olyan hibrid plazmidok is használhatunk, amelyek az élesztő 2 μ plazmid DNS-sel homológ szekvenciákat tartalmaznak. Ezek a hibrid plazmidok rekombinációval beépülnek a sejtben már jelenlevő 2 μ plazmidokba vagy autonóm módon replikálódnak. A 2 μ szekvenciák különösen alkalmasak a nagyfrekvenciás transzformációs plazmidokhoz és lehetővé teszik a nagy másolatszámot.

Élesztő szelektív génmarkerként bármelyik marker gén használható, amely fenotípusos expresszállása révén megkönnyíti a transzformánsok kiválasztását. Megfelelő élesztőmarkerek különösen azok, amelyek antibiotikus rezisztenciát expresszálnak, vagy auxotróf élesztőmutánsok esetében az olyan gének, amelyek a gazdaszervezet sérülését kiküszöbölik. A megfelelő gének például rezisztenciát hordoznak a cikloheximid antibiotikummal szemben, vagy egy auxotróf élesztőmutánsban prototrófiát biztosítanak; ilyen például az URA3, LEU2, HIS3 vagy TRP1 gén. Markerként olyan strukturgének is alkalmazhatók, amelyek egy

autonóm replikálódó szegmenshez kapcsolódnak, ezáltal biztosítva, hogy a transzformálódó gazdaszervezet auxotróf legyen a marker által expresszált termékre.

A találmány szerinti hibrid plazmidokban jelenlevő további DNS szekvenciák előnyösen egy replikációs origót és egy szelektív genetikai markert is tartalmaznak baktérium gazdaszervezetekre, különösen *Escherichia coli*-ra. Egy *E. coli* replikációs origó és egy *E. coli* marker egy élesztő hibrid vektorban való jelenlétének előnyei például a következők: először is nagy mennyiségű hibrid vektor DNS-t lehet előállítani *E. coli* tenyésztésével és szaporításával, másodsorban a hibrid vektorok létrehozása kényelmesen végrehajtható az *E. coli*-ban és az *E. coli*-ra alapozott klónozó technológia valamennyi módszerének felhasználásával. Az *E. coli* plazmidok, úgymint a pBR322 és más hasonlókat tartalmazzák mind az *E. coli* replikációs origót, mind az antibiotikumokkal, például tetraciklinnel és ampicillinnel szembeni rezisztenciát hordozó *E. coli* genetikai markereket, és előnyösen az élesztő hibrid vektorok részeiként kerülnek alkalmazásra.

A további DNS-szekvenciát, amely tartalmazza például a replikációs origót és a genetikai markereket az élesztőkre és egy baktérium gazdaszervezetre (amint ezt fent leírtuk), ezentúl „vektor-DNS”-nek nevezzük, amely az élesztő promoterrel és a polipeptid kódoló régióval együtt egy találmány szerinti hibrid plazmidot képez.

A találmány egyik előnyös kiviteli alakja olyan hibrid plazmidok előállítására vonatkozik, amelyek replikálódni tudnak, és fenotípusos kiválasztásukra egy élesztő gazdaszervezet törzsben, amely egy élesztő hibrid promotert és egy heterológ polipeptidet kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz; ez a DNS-szekvencia az átírási kezdési és befejezési szignálokkal együtt, valamint a translációs kezdési és befejezési szignálokkal együtt a hibrid plazmidban az említett hibrid promoter irányítása alatt áll, így egy transzformált élesztőtörzsben ez expresszállódik az említett polipeptid előállítására.

A hibrid vektorokat például úgy állítjuk elő, hogy összekapcsolunk egy hibrid promotert (amely egy az élesztő PH05-gén UAS-ét /UAS-eit tartalmazó '5' upstream promoter alkotórészből, és egy 3' downstream promoter alkotórészből áll, mely utóbbi egy a PH05-géntől eltérő élesztőgénből származik és olyan átírási kezdőpontokat tartalmaz, amelyek egy funkcionális TATA-box-ot is magukba foglalnak), egy az élesztő számára heterológ polipeptidet kódoló DNS-szegmenst, és egy élesztőgén 3' határoló szekvenciáit úgy, hogy a DNS-szegmens az említett hibrid promoter átírási szabályozása alatt álljon, és a vektor DNS-be adott esetben egy vagy több lineáris DNS-t is beviszünk. Célszerűen feltérképezett lineáris vagy – előnyösen – gyűrűs vektor DNS-t, például bakteriális plazmid DNS-t vagy ehhez hasonló DNS-t (vö. a fenti leírással) alkalmazunk, amelynek legalább egy, előnyösen két vagy több hasítóhelye van. A vektor DNS előnyösen már tartalmaz replikációs origókat és génmarkereket élesztőkhöz és/vagy egy baktérium gazdaszervezethez. A vektor DNS-t egy megfelelő restriktív endonukleáz

alkalmazásával hasítjuk. A hasított DNS-t ligáljuk egy olyan lineáris DNS fragmentumhoz, amely egyebek között tartalmazza az élesztő hibrid promotert, és a polipeptidet kódoló DNS-szegmenshez. A hibrid promoterhez és a polipeptid kódoló régióhoz való kapcsolat előtt vagy után (vagy egyidejűleg is) bevihetünk replikációs origókat és/vagy markereket is élesztőkhöz vagy egy bakteriális gazdaszervezethez. A hasítási és melegítési körülményeket minden esetben úgy kell megválasztani, hogy a vektor DNS alapvető funkciói ne ütközzenek a hibrid promotereivel. A hibrid vektort felépíthetjük szekvenciálisan vagy két olyan DNS-szegmens ligálásával, amelyek mindegyik fontos szekvenciát tartalmaznak.

Különböző technikák használhatók a DNS-szegmensek in vitro összekapcsolásához. Bizonyos restriktív endonukleázok által létrehozott tompa végek (teljesen bázispárosított DNS-duplek) közvetlenül ligálhatók T4 DNS-ligázzal. Szokásosabban úgy járunk el, hogy a DNS-szegmenseket egyfonalas kohézív végükön keresztül kapcsoljuk össze és kovalens módon zárjuk egy DNS-ligázzal, például T4 DNS-ligázzal. Az ilyen egyfonalas „kohézív végek”-et úgy hozhatjuk létre, hogy DNS-t egy másik endonukleáz csoporttal hasítunk, amely eltolt végeket hoz létre (a DNS kettős spirál két szálát különböző pontokon, néhány nukleotidnyi távolságra hasítjuk). Az egyfonalas formát úgy is létrehozhatjuk, hogy a nukleotidokat a tompa végekhez vagy az eltolt végekhez építjük terminális transzferázok alkalmazásával (homopolimer farkazás) vagy egy tompavégű DNS-szegmenst egy megfelelő exonukleázzal, úgymint λ -exonukleázzal egyszerűen visszahasítva.

Eltolt végek előnyösen úgy is létrehozhatók, hogy a tompavégű DNS-szegmenshez egy kémiai előállított kapcsoló DNS-t ligálunk, amely tartalmaz egy olyan felismerő helyet, amely felismeri az eltolt végeket képző endonukleázt, és a kapott DNS-t a megfelelő endonukleázzal emésztjük.

A hatékony expresszáldáshoz a génnek megfelelően kell elhelyezkednie az átírási (élesztő hibrid promoter) és a transzlációs funkciókat tartalmazó szekvenciákhoz képest. Először is a polipeptid kódoló régiót és a hibrid promotert magába foglaló DNS-szegmens ligálását a megfelelő orientációban kell végrehajtani. Ha két orientáció lehetséges, a helyeset szokásos hasítási elemzéssel kell meghatározni. A helytelenül orientált beékelt polipeptid gént tartalmazó hibrid vektorokat re-orientáljuk a beékelt gén kiasításával egy megfelelő restriktív endonukleázzal és a gén újraligálásával a hibrid vektor fragmentumba. A helytelen orientációt minden esetben elkerülhetjük úgy, hogy 2 olyan DNS-szegmenst ligálunk, amelyek végén különböző hasítható helyek vannak. A hibrid vektort továbbá úgy kell felépíteni, hogy lehetséges legyen az átírás helyes elkezdése és befejezése. Ami az utóbbit illeti, az átírt származék előnyös, ha az élesztő kromoszomális DNS-ből vagy élesztő 2μ plazmidból származó DNS-szekvencia az átírási egységre végződik. Előnyösen az átírt származék egy olyan DNS-szekvenciával végződik, amely tartalmazza egy élesztőgén, például a PH05

vagy a TRP1 átírási befejező szignálját. Másodszor létre kell hozni egy megfelelő leolvasási keretet. A promoter régió és a polipeptid kódoló régió nukleotid-szekvenciája általában ismert ligálás előtt, vagy könnyen meghatározható úgyhogy nincs nehézség a helyes leolvasási keret létrehozásával.

Ha az érett polipeptid közvetlenül expresszióját óhajtjuk, akkor el kell távolítani az adott esetben a hibrid promoter régiót követő és/vagy adott esetben az érett polipeptidet kódoló régiót megelőző jelzőszekvenciákat vagy azok részeit; az eltávolítás végrehajtható például egy exonukleázzal, úgymint Ba131-gyel végzett emésztéssel. Az élesztő promoternek a közvetlen hozzákapcsolására a polipeptid kódoló szekvenciához előnyös régió a fő mRNS indítókodon és az ATG transzlációs indítókodon közötti. Az ebben a régióban való összekapcsoláshoz a polipeptid kódoló szekvenciának saját ATG-je kell legyen a transzláció indításához, vagy ellenkező esetben el kell látni egy további szintetikus oligonukleotiddal. Az élesztő hibrid promotert a polipeptid kódoló szekvenciához egy szintetikus oligodezoxinukleotid mint összekötő molekula segítségével is hozzákapcsolhatjuk. Így a hibrid promoter régiót, ha az lehetséges, szabályozni lehet 3'-vége közelében úgy, hogy abból hiányozzon egy előre meghatározott számú bázispár. Analóg módon a polipeptid kódoló szekvenciát szabályozni lehet 5'-vége közelében. Ezután egy szintetikus oligodezoxinukleotidot lehet felépíteni olyan módon, hogy amikor az élesztő hibrid promotert és a polipeptid kódoló szekvenciát összekapcsoljuk az összekötő oligodezoxinukleotidon keresztül, a hiányzó bázispárokat pótoljuk beleértve egy ATG transzlációs kezdési szignált is, és a polipeptid kódoló szekvencia a promoterhez képest a megfelelő leolvasási keretben legyen.

A kívánt hibrid vektort tartalmazó ligáló keveréket közvetlenül felhasználjuk a transzformációs lépésben vagy először feldúsítjuk a hibrid vektorra nézve, például gélelektroforézissal, és ezután használjuk transzformálásra.

A közti termékeket, például az olyan vektorokat, amelyeknek egy vagy több alapvető funkciója még hiányzik, valamint a végső, találmány szerinti hibrid vektorokat adott esetben transzformáljuk egy bakteriális gazdaszervezetbe, különösen E. coli-ba, a fenti okok miatt (például nagy mennyiségű intermedier termék vagy hibrid plazmid előállítására). E miatt a bakteriális vektorok, úgymint az E. coli pBR322 plazmid és ezek bakteriális replikációs origót és génmarker(ek)-et tartalmazó fragmensei a legelőnyösebb vektorok. Amikor ilyen bakteriális vektort alkalmazunk, a végső lépések az élesztő hibrid vektorok előállítására előnyösen magukba foglalják az élesztőhöz való genetikai marker és egy replikációs origó bevitelét is.

A találmány egy másik része élesztők átalakítása polipeptid kódoló szekvenciát tartalmazó hibrid vektorokkal; ez tulajdonképpen egy olyan transzformált élesztősejtek előállítására irányuló eljárás, amelyek az élesztő számára heterológ polipeptidet tudnak termelni. Az eljárás élesztősejtek transzformálásából áll egy hibrid vektorral, amely egy vagy több DNS-inszertet tar-

talmaz; ezek mindegyikében van egy az élesztő számára heterológ polipeptidet kódoló DNS-szegmens, amely egy hibrid promoter átírási szabályozása alatt áll. Ez a hibrid promoter egy az élesztő PH05-gén AUS-ét/AUS-eit tartalmazó 5' upstream promoter alkotórészből és egy 3' downstream alkotórészből áll; ez utóbbi egy a PH05-géntől eltérő élesztőgénből származik és átírási kezdőpontokat tartalmaz, amelyek egy funkcionális TATA-box-ot is magukba foglalnak.

Az alkalmazható élesztők közé tartoznak a *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* vagy rokon nemzetségek fajai [vö. J. Lodder: „The Yeasts”, Amsterdam, (1971)], különösen a *Saccharomyces cerevisiae* törzsei.

Az élesztők transzformálása hibrid vektorokkal az irodalomból ismert módszerekkel hajtható végre, például a Hinnen és munkatársai által leírt módszerrel [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929, (1978)]. Ez a módszer három lépésre osztható:

- (1) az élesztősejtfalnak vagy részeinek eltávolítása,
- (2) a csupasz élesztősejtek (szferoplasztok) kezelése a transzformáló DNS-sel polietilén-glikol (PEG) és Ca^{2+} -ionok jelenlétében,
- (3) a sejtfal regenerálása és a transzformált sejtek kiválasztása egy szilárd agarrétegen.

Az előnyös módszerek

- (1) esetében: az élesztő sejtfalat enzimesen távolítjuk el különböző glükózidáz készítményekkel, úgymint csiga bélnedvekkkel (például Glusulase® és Helicase® néven forgalmazott termékek) vagy mikroorganizmusokból nyert enzimekkel (például a *Zymolyase*® néven forgalmazott termék) ozmotikusan stabilizált oldatokban (például 1 M szorbitol);
- (2) esetében: az élesztő szferoplasztok polietilén-glikol jelenlétében aggregálódnak és a citoplazmatikus membránok helyi összeolvadása indukálódik. Az összeolvadáshoz megfelelő körülmények megteremtése kritikus tényező és számos transzformált élesztősejt válik diploiddá vagy akár triploiddá a transzformálási eljárás alatt. Az összeolvadt szferoplasztok kiválasztását lehetővé tevő eljárások használhatók a transzformánsok dúsítására, azaz a transzformált sejteket könnyen ki lehet szűrni az előzőleg kiválasztott összeolvadási termékekből;
- (3) esetében: mivel a sejtfal nélküli élesztősejtek nem osztódnak, a sejtfalat regenerálni kell. Ezt a regenerálást célszerűen úgy hajtjuk végre, hogy a szferoplasztokat agarba ágyazzuk be. Így például olvasztott agart (körülbelül 50 °C-on) keverünk össze a szferoplasztokkal. Az oldatot az élesztők növekedési hőmérsékletére (30 °C körül) hűtve egy szilárd réteget kapunk. Ez az agarréteg arra szolgál, hogy megelőzze az esszenciális makromolekulák gyors diffúzióját és eltávozását a szferoplasztokból és ezáltal megkönnyíti a sejtfal regenerálódását. A sejtfal regenerálódást azonban úgy is el lehet érni (bár ez kevésbé hatékony), hogy a szferoplasztokat az előre megformált agarrétegek felületére telepítjük.

A regeneráló agart előnyösen úgy készítjük, hogy lehetséges legyen a transzformált sejtek egyidejű rege-

nerálása és kiválasztása. Mivel az aminosav bioszintézis utak enzimeit kódoló élesztőgéneket általában mint szelektív markereket használjuk (vö. a fentiekkel), a regenerálást előnyösen élesztő minimum agar tápközegen végezzük. Ha nagyon hatékony regenerálásra van szükség, akkor előnyösen egy kétlépéses eljárást kell követni: (1) a sejtfal regenerálása egy gazdag komplex tápközegben, és (2) a transzformált sejtek kiválasztása a sejtretteg átmásolásával szelektív agar lemezekre.

- 10 Ha a hibrid vektor nem tartalmaz semmilyen marker gént, a transzformált sejteket más módszerekkel is azonosítani lehet. Ilyen módszer például az in situ hibridizálás egy címkézett DNS-fragmentummal, amely homológ a hibrid vektor szekvenciáira például Hinnen és munkatársai fent említett módszerével, vagy in situ immunoassay-kkel, amennyiben a bevitt gén termékére rendelkezésre áll egy antitest, vagy más szűrési módszerekkel, amelyek a transzformáló plazmid(ok) által kódolt géntermékeket határozzák meg.

- 20 Egy másik megoldás szerint az élesztőt ko-transzformálhatjuk egy találmány szerinti hibrid vektorral és egy olyan másik vektorral, amely egy élesztő genetikai markert tartalmaz. Ha a két különböző vektornak vannak közös DNS-szekvenciái (ezek a vektorokban jelenlevő bakteriális szekvenciák lehetnek), akkor a végbenemő rekombináció egy összeolvadt, kiválasztható hibrid molekulához vezet.

- 30 Az élesztőt ko-transzformálhatjuk úgy is, hogy egy lineáris DNS-vektort – amely az élesztő hibrid promoterből, az ezáltal szabályozott heterológ polipeptid kódoló régióból és az élesztő PH05-gén átírási befejezési szignáljából áll – és egy élesztőre szelektív markert tartalmazó vektort alkalmazunk. A ko-transzformálás lehetővé teszi azoknak az élesztősejteknek a feldúsítását, amelyek olyan DNS-t vettek fel, amelyre közvetlenül nem lehet szelektálni. Mivel a megfelelő sejtek bármilyen típusú DNS-t felvesznek, egy szelektív vektorral transzformált sejtek nagy százaléka szintén felvesz bármilyen további DNS-t (úgymint a fenti lineáris DNS-t). Megfelelően hosszú homológ szekvenciák (például 20–100 dezoxinukleotid) segítségével a polipeptid gént stabilan be lehet építeni a gazdakromoszómába. A találmány szerinti különleges felépítés a heterológ gén stabil beépítését eredményezi a PH05-gén kromoszómájába, azaz a II-élesztő kromoszómába.

- 45 A találmány szerinti hibrid plazmidokat tartalmazó élesztőtörzsek heterológ polipeptid termelő képességét javíthatjuk mutációval és kiválasztással, az irodalomból ismert módszereket alkalmazva. A mutációt kiválthatjuk például UV-sugárzással vagy egy megfelelő kémiai reagenssel.

- 50 Azt találtuk, hogy a találmány szerinti hibrid vektorokkal végzett transzformálás és a sejtfal regenerálása szénforrásként glükózt tartalmazó gazdag tápközegben könnyen végrehajtható, és lényegesen egyszerűbb, mint azok a megfelelő lépések, amelyeket hagyományos, glükózzal indukálható promotereket tartalmazó hibrid vektorokkal hajtanak végre, amely esetben glükózmentes közegben kell dolgozni, hogy meg lehessen

akadályozni a pusztító géntermékek esetleges felhalmozódását a sejteken belül.

A találmány tehát kiterjed élesztő gazdaszervezeteknek olyan hibrid vektorokkal történő transzformálására is, amelyek egy vagy több beékelte DNS-szakaszt tartalmaznak; ezeknek a DNS-szakaszoknak mindegyike tartalmaz egy olyan DNS-szegmenst, amely az élesztő számára heterológ polipeptidet kódol, és egy olyan hibrid promoter szabályozása alatt áll, amely az élesztő PH05-gén UAS-ét/UAS-eit tartalmazó 5' upstream promoter alkotórészéből és egy olyan 3' downstream promoter alkotórészéből áll, amely a PH05-géntől eltérő élesztőgénből származik és olyan átírási kezdési helyeket tartalmaz, amelyek egy funkcionális TATA-box-ot is magukba foglalnak; és az ilyen törzsek mutánsaira.

A transzformált élesztősejtek tenyésztése és az expresszáldott polipeptid elkülönítése is a találmány körébe tartozik; az élesztő számára heterológ polipeptid előállítását úgy végezzük, hogy egy olyan élesztőtörzset vagy annak mutánsát tenyésztjük, amelyet egy vagy több beékelte DNS-szakaszt tartalmazó hibrid vektorral transzformáltunk; valamennyi beékelte DNS-szakasz tartalmaz egy az élesztő számára heterológ polipeptidet kódoló DNS-szegmenst, amely egy olyan hibrid promoter szabályozása alatt áll, amely egy az élesztő PH05-gén UAS-ét/UAS-eit tartalmazó 5' upstream promoter alkotórészéből és egy olyan 3' upstream promoter alkotórészéből tevődik össze, amely egy a PH05-géntől eltérő élesztőgénből származik, és átírási kezdési helyeket tartalmaz, amelyek egy funkcionális TATA-box-ot is magukba foglalnak; és az expresszáldott polipeptidet elkülönítjük.

A találmány szerinti eljárással transzformált élesztősejteket az irodalomból ismert módszerekkel tenyésztjük egy olyan folyékony közegben, amely asszimilálható szén- és nitrogénforrásokat és szervesen só forrásokat tartalmaz, és amennyiben szükséges, növekedést serkentő anyagok jelenlétében.

Különböző szénforrásokat alkalmazhatunk. Előnyösen alkalmazható szénforrások például az asszimilálható szénhidrátok, úgymint glükóz, maltóz, mannitol vagy laktóz, vagy egy acetát, úgymint nátrium-acetát, amelyet akár egymagában, akár megfelelő keverékben alkalmazhatunk. Az alkalmazható nitrogénforrás például egy aminosav, kazaminosav, peptid, fehérjék és bomlástermékek, például tripton, pepton vagy húsextraktumok, továbbá élesztőextraktumok, malátaextrakt, kukoricalékvár, valamint ammóniumsók, úgymint ammónium-klorid, -szulfát vagy -nitrát, amelyeket akár egymagukban, akár megfelelő keverékben alkalmazhatunk. Az alkalmazható szervesen sók közé tartoznak például a nátrium, kálium, magnézium és kalcium szulfátjai, kloridjai, foszfátjai és karbonátjai. Ezenkívül a tápközeg növekedést serkentő anyagokat is tartalmazhat. A növekedést gyorsító anyagok lehetnek például növekedésserkentők, nyomelemek, úgymint vas, cink, mangán és más hasonló elemek, vagy különálló aminosavak.

Mivel a találmány szerinti hibrid promoterek szabá-

lyozottak, a tápközeg összetételét a növekedési fázisokhoz kell igazítani. A növekedési szakasz alatt, nagy foszfátkoncentrációknál a találmány szerinti hibrid promoterek lényegében nem működnek. Így például a találmány szerinti legelőnyösebb hibrid promoter, amely tartalmazza a PH05 5' egy upstream promoter alkotórészét a PH05 UAS-eivel és a GAPDH egy 3' downstream promoter alkotórészét a TATA-box-szal, ilyen körülmények között ötvened részére csökkenti működését. Ezért az esetleges toxikus géntermékek csak igen kis mennyiségben termelődnek és a lehető legkisebbre csökken a sejt metabolizmusára kifejtett károsító hatás. Amikor a megfelelő sejtsűrűséget elértük, a tápközegben előnyösen csökkentjük a szervesen foszfátok szintjét (alacsony P_i közeg). Ennek hatására a találmány szerinti hibrid promoterek működni kezdenek (depresszáldnak) és a lehető legnagyobb számú átírt mRNS-t kapjuk.

A tenyésztést szokásos technikák alkalmazásával végezzük. A tenyésztési körülményeket, így a hőmérsékletet, a közeg pH-ját és a fermentációs időt úgy választjuk meg, hogy a kívánt polipeptid legnagyobb mennyisége keletkezzen. A tenyésztést általában aerob körülmények között, sültetett tenyészetben végezzük rázatással vagy keveréssel, körülbelül 25–35 °C hőmérsékleten, pH=4–8, például pH= körülbelül 7 értéken, körülbelül 4–20 órát, előnyösen addig, amíg a kívánt protein legnagyobb mennyiségét elérjük.

Az expresszáldott polipeptid elkülönítését és tisztítását kívánt esetben az irodalomból ismert módszerekkel végezzük.

Miután a transzformált sejteket megfelelő sejtsűrűségig tenyésztettük, az expresszáldott protein kinyerésének első lépése a protein kiszabadítása a sejt belsejéből. A legtöbb eljárásban először eltávolítják a sejtfalat enzimes emésztéssel, például glükozidázokkal. Ezt követően a kapott szferoplasztokat felületaktív anyagokkal, például Triton-nal kezeljük. Egy másik megoldás szerint a sejtek elroncsolására mechanikai erőket, úgymint nyíróerőt (például X-prés, franciaprés) vagy üveggyöngyökkel végzett rázást alkalmaznak. A kapott elegyet a kívánt polipeptidre nézve a szokásos módszerekkel dúsítjuk, például a nem fehérjejellegű anyag nagy részének eltávolításával polietilén-imines kezeléssel, a proteinek kicsapásával az oldat ammónium-szulfáttal vagy triklór-ecetsavval végzett telítéssel, gélelektroforézissel, dialízissel, kromatográfiásan, például ioncserés kromatográfiával, méret szerint szétválasztó kromatográfiás módszerrel, HPLC-vel vagy reverz fázisú HPLC-vel, molekuláris méret szerinti elkülönítéssel egy megfelelő Sephadex® oszlopon, vagy más hasonló módszerrel. Az előtisztított termék végső tisztítását például antitest affinitásos kromatográfiával végezzük.

Ha az élesztő a kívánt polipeptidet a plazmaközi térbe választja ki, egyszerűbben is eljárhatunk; a polipeptidet kinyerhetjük a sejt oldása nélkül, azaz a sejtfal enzimes eltávolításával, vagy vegyszerekkel, például tiolreagensekkel vagy EDTA-val végzett kezeléssel, amelyek lehetővé teszik a sejtfal roncsolódását és ezál-

tal a polipeptid kiszabadulását. Ha a polipeptid a tápközegbe választódik ki, akkor onnan közvetlenül kinyerhető.

A kapott, glikozilezett és glikozilezetlen proteinek tartalmazó elegyet szétválaszthatjuk például egy concavalin-A Sepharose® oszlopon végzett kromatográfálással. A glikozilezetlen termékek átmennek az oszlopon, miközben a glikozilezett termékek szelektíven adszorbeálódnak és szokásos módszerekkel eluálthatók, például α -metil-mannozid és egy kaotropikus szer, például KSCN kombinációjával.

A glikozilgyökök el is távolíthatók enzimesen, például endoglikozidáz-H-val vagy -F-fel. Ez a módszer lehetővé teszi glikozilezetlen termékek lényegében tiszta formában való előállítását.

A találmány tárgya tehát eljárás PH05 upstream aktivációs szekvenciák, a hibrid promoterek, a hibrid vektorok, transzformált élesztősejtek, valamint az élesztő számára heterológ polipeptidok előállítására, amint azt a példákban ismertetjük.

Az 1. ábra a PH05 promoter régió BamHI-SalI fragmentumának DNS-szekvenciáját mutatja.

A 2. ábra a GAPDH promoter régiójának DNS-szekvenciáját szemlélteti [491-es klón, (vö. Bitter, G. A. és munkatársai: Gene, 32, 263, (1984)].

A 3. ábra sematikus szemlélteti a pGAPDH-EL plazmid előállítását.

A 4. ábra a találmányban használt GAPDH-gén 3' promoter alkotórészeit mutatja.

Az 5. ábra a pJDB207R/PH05-EGL plazmid előállítását szemléltető diagram.

A 6. ábra a hibrid PH05/GAPDH promotert tartalmazó pJDB207/PAPEL-EGL (UAS1) plazmid létrehozását mutatja be.

A 7. ábra egy olyan sematikus diagram, amely a kész deszulfátohirudint kódoló DNS-fragmentum elkülönítését mutatja.

A 8. ábra a pJDB207/PH05-HIR plazmid előállítását szemlélteti sematikus.

A 9. ábra a pJDB207/PH05 (Eco)-HIR plazmid létrehozását bemutató diagram.

A 10. ábra a pJDB207/PAPFL-TPA (UAS1+UAS2) plazmid létrehozását bemutató sematikus diagram.

A találmány szerinti megoldást a következő nem korlátozó példákkal szemléltetjük.

Kísérleti rész

1. példa

PH05 promoter deléciók létrehozása

a) Ba131 emésztés

PH05-promoter forrásként a PH05 BamHI-SalI 1. ábrán szemléltetett fragmentumát tartalmazó M13mp9/PH05 Bam-Sal rekombináns fágot használjuk [vö. 143 081. számú európai szabadalmi bejelentés]. A fág-DNS 20 μ g-ját (RF jelentése replikatív alak) SalI restrikciós endonukleázzal emésztjük, így egy körülbelül 9 kilobázisnyi lineáris DNS-t kapunk. Fenol és

kloroform keverékével végzett extrakció után a DNS-t etanollal kicsapjuk, majd újra szuszpendáljuk 10 mM pH=8,0 trisz-ben, 0,5 μ g/ml koncentrációban. 16 μ g SalI-gyel hasított DNS-t 2 egység Ba131 exonukleázzal (BRL) emésztünk 100 μ l-nyi 20 mM-os 8,0 pH-jú triszben, 199 mM nátrium-klorid, 12 mM magnézium-klorid, 12 mM kalcium-klorid és 1 mM EDTA jelenlétében. 1, 2, 3, 4 és 5 pernyi 30 °C-on végzett inkubálás után 2 μ g-os alikvot DNS-mintákat veszünk és ezeket azonnal összekeverjük 50 μ l fenollal, 60 μ l TNE-vel. Fenol és kloroform keverékével végzett extrakció és etanolos kicsapás után a DNS-ből 10 mM 8,0-as pH-jú trisz-szel 100 μ g/ml koncentrációjú szuszpenziót készítünk. A Ba131 exonukleotikus hasításának mértékét úgy határozzuk meg, hogy az egyes időpontokban vett minták DNS-ének 0,5 μ g-ját BamHI endonukleázzal emésztjük és 1,5%-os agaróz gélen, 8,3 pH-jú trisz-borát pufferrel (90 mM trisz \times HCl pH=8,3, 90 mM bórsav, 2,5 mM EDTA) vizsgáljuk. A Ba131-gyel végzett emésztéssel percenként átlagosan a fragmentum mindkét végéről 100 bázispárt távolítunk el.

b) EcoRI kapcsolók adagolása a Ba131-gyel kezelt DNS-hez

EcoRI kapcsolók (5'-GGAATTCC-3') két A₂₆₀ egységét újraszuszpendáljuk 250 μ l 10 mM trisz (pH=8) és 1 mM EDTA elegyében. 2 μ g EcoRI kapcsolót kinázzal kezelünk 75 μ l 60 mM trisz (pH=7,5), 10 mM magnézium-klorid, 15 mM DDT, 10 μ M ATP és 33 egység T4 polinukleotid kináz (gyártja a Boehringer) elegyében. Az elegyet 37 °C-on tartjuk 1 órát, majd hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni és ezután -20 °C-on tároljuk.

A hőkezelt kétfonális EcoRI kapcsolókat tompa végükkel a Ba131-gyel kezelt DNS-fragmentumokhoz ligáljuk. Ba131-gyel kezelt DNS [vö. 1. a) példa] fél mikrogrammját 16 órát inkubáljuk szobahőmérsékleten EcoRI kapcsolók ötvenszeres feleslegével, 20 μ l trisz (pH=7,5), 10 mM magnézium-klorid, 10 mM DTT, 4 mM ATP és 600 egység T4 DNS-ligáz (Biolabs gyártmány) jelenlétében. A T4 DNS-ligáz inaktiválása után (10 perc 65 °C-on) az EcoRI kapcsolók feleslegét 50 egység EcoRI-vel (Boehringer gyártmány) hasítjuk 50 μ l térfogatban. A DNS-t fenol és kloroform elegyével extraháljuk, etanollal kicsapjuk és újra szuszpendáljuk 10 mM triszben és 1 mM EDTA-ban (TE). Ezután a DNS-t 5 egység BamHI-gyel (Biolabs gyártmány) hasítjuk és az elegyet 1,5%-os kis olvadáspontú agarózgélre (Sigma termék) visszük trisz-borát pufferben (vö. a fent ismertetettel). A sávokat etidium-bromiddal színezzük és hosszúhullámú ultraibolya sugárzással, 366 nm-nél láthatóvá tesszük. A széles diffúziósávokat körülbelül 100 és 500 bázispár között kivágjuk a gélből és a DNS-t a következőképpen extraháljuk: az agaróz egy darabját 65 °C-on elfolyósítjuk, nátrium-kloriddal 500 mM-osra állítjuk be és 65 °C-on inkubáljuk 20 percig. Egy térfogatrész fenolt (10 mM trisz-hidrokloriddal (pH=7,5), 1 mM EDTA-val és 500 mM nátrium-kloriddal ekvilibálva) adunk hozzá, a vizes

fázist kétszer újra extraháljuk fenollal és egyszer kloroformmal. A DNS-t 2,5 térfogatrészt hideg abszolút etanollal kicsapjuk és centrifugálással összegyűjtjük. A DNS pelletet hideg 80%-os etanollal mossuk, majd vákuumban szárítjuk. A DNS-t újra szuszpendáljuk 10 µl TE-ben.

c) Ligálás M13mp9-hez

M13mp9 RF-jének 3 µg-ját 15 egység EcoRI-vel (Biolabs gyártmány) és 15 egység BamHI-gyel (Boehringer) emésztjük 50 µl térfogatban. Fenolos extrakció és etanos kicsapás után a DNS-t újra szuszpendáljuk 50 µl TE-ben. A hasított vektor DNS 5 µl-jét körülbelül 200 ng) összekeverjük a fenti minták 10 µl-jével [a DNS fragmentumok a különböző Ba131-es emésztésekből származnak, amint azt az 1. b) példában leírtuk] és 20 µl teljes térfogatban ligáljuk 60 mM trisz/hidrogén-klorid (pH=7,5), 6 mM magnézium-klorid, 10 mM DTT, 1 mM ATP és 200 egység T4 DNS-ligáz jelenlétében 15 órát. Az E. coli JM101 törzs megfelelő sejtjeinek transzdukcióját az „M13 cloning and sequencing system” kézikönyv szerint végezzük (kiadja a New England Biolabs). Számos fehér tarfoltból (plakkból) származó fágokat tenyésztünk és elemzünk beékelt DNS-szakaszaik méretének meghatározására, az EcoRI és BamHI restrikciós enzimekkel végzett hasítással.

d) A Ba131 deléciós végpontjainak meghatározása Sanger-féle szekvenálással (az Sall-helytől való deléciók)

A szekvenálást Sanger és munkatársai didezoxi-DNS szekvenciálási rendszerével [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, (1977)], a fent említett kézikönyvben leírt módon végezzük. A deléciós végpontokat az alábbiakban adjuk meg:

klón	a PH05-szekvencia utolsó nukleotidjának helyzete (vö. 1. ábra)
A	-502
B	-471
C	-422
D	-400
E	-392
F	-369
G	-350
H	-328
I	-300
K	-283
L	-255
M	-226
N	-211
O	-187
P	-111
Q	-88
R	-57
S	-33

e) A Ba131 deléciós végpontjainak meghatározása Sanger-féle szekvenálással (a BamHI-hely felőli deléciók)

A fenti a) – c) lépésekben leírthoz hasonló Ba131 deléciók sorozatát hajtjuk végre, azzal az eltéréssel, hogy az M13mp9 PH05 Bam-Sal-et BamHI-vel hasítjuk. A Ba131-gyel emésztett molekulákat EcoRI-vel és Sall-vel hasítjuk és a létrehozott fragmentumokat EcoRI-vel és Sall-vel emésztett M13mp9-be klónozzuk. A deléciós végpontokat az alábbiakban adjuk meg:

klón	a PH05-szekvencia utolsó nukleotidjának helyzete (vö. 1. ábra)
A'	-24
B'	-35
C'	-41
D'	-48
E'	-74
F'	-89
G'	-93
H'	-97
I'	-124
K'	-162
L'	-174
M'	-262
N'	-277
O'	-306
P'	-332
Q'	-346
R'	-361
S'	-382
T'	-393

f) Belső PH05 promoter deléciók létrehozása

A d) lépésben leírt Ba131 deléciós sorozat egy olyan „balkar” PH05 promoter fragmentumot hoz létre, amely egy EcoRI helyben végződik, és a fenti e) lépésben leírt Ba131 deléciós sorozat egy olyan „jobbkar” PH05 promoter fragmentumot hoz létre, amely egy EcoRI hellyel végződik. A különböző helyzetű „balkar”-okat és „jobbkar”-okat kombinálva belső deléciókat hozunk létre, amelyek egy EcoRI kapcsoló szegmenst tartalmaznak a kivágott DNS helyén.

Az egyéni belső deléciókat úgy hozzuk létre, hogy az M13mp9-származékokból a „balkar”-okat és a „jobbkar”-okat EcoRI és BamHI restrikciós endonukleázokkal („balkar”-ok) vagy EcoRI és Sall endonukleázokkal („jobbkar”-ok) hasítjuk és a megfelelő fragmentumokat lágy agaróz gélelektroforézissel különítjük el a b) lépésben leírt módon. A „balkar”-ok, a „jobbkar”-ok ekvimoláris mennyiségét és 200 ng BamHI-gyel és Sall-gyel emésztett M13mp9 vektor DNS-t ligálunk a c) lépésben leírt módon. Az E. coli JM101-

be való transzdukción után a fehér tarfoltokat kiemeljük, RF-et állítunk elő és restriktációs vizsgálattal elemezzük (BamHI, Sall, EcoRI). A következő karokat kombináljuk specifikus belső deléciók létrehozására (a nukleotidok számozásához vö. 1. ábra):

„balkar”	„jobbkar”	deléció	mettől meddig	kivágott nukleotidok
A	T'	Δ7	-501 -- -394	108
B	T'	Δ8	-470 -- -394	77
C	T'	Δ9	-421 -- -394	28
D	S'	Δ10	-399 -- -383	17
E	R'	Δ11	-391 -- -362	30
F	Q'	Δ12	-368 -- -347	22
G	P'	Δ13	-349 -- -333	17
H	O'	Δ14	-327 -- -307	21
I	N'	Δ15	-329 -- -278	22
K	M'	Δ16	-282 -- -263	20
L	L'	Δ17	-254 -- -175	80
M	L'	Δ18	-225 -- -175	51
N	L'	Δ19	-210 -- -175	36
O	L'	Δ20	-186 -- -175	12
O	K'	Δ21	-186 -- -163	24
O	I'	Δ22	-186 -- -125	62
O	H'	Δ23	-186 -- -98	89
P	H'	Δ24	-110 -- -98	13
P	G'	Δ25	-110 -- -94	17
P	F'	Δ26	-110 -- -90	21
Q	E'	Δ27	-87 -- -75	13
R	D'	Δ28	-56 -- -49	8
R	C'	Δ29	-56 -- -42	15

GATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTAATTTGGAAGTCATCTTATGTGCGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGCTATAAACTTCAAACGAAGGTAAGGTTTCATAGCGCTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAATTAGCACGTTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAGAGTTAATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAAT, az UAS2 egy 100 bázispárnyi ClaI-BstEII fragmentumban helyezkedik el, amelynek képlete

CGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAGCACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTATCAAATTG

és mind az UAS1, mind pedig az UAS2 jelen van egy 368 bázispárnyi BamHI-BstEII fragmentumban, amelynek képlete

GATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTAATTTGGAAGTCATCTTATGTGCGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGCTATAAACTTCAAACGAAGGTAAGGTTTCATAGCGCTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAATTAGCACGTTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAGAGTTAATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAGCACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTATCAAATTG

„balkar”	„jobbkar”	deléció	mettől meddig	kivágott nukleotidok
R	B'	Δ30	-56 -- -36	21
S	A'	Δ31	-32 -- -25	8

5

2. példa

A PH05 promotor belső delécióinak in vivo elemzése

10 Az 1. f) példában ismertetett különböző deléciókat a pJDB207/PH05 plazmidba klónozzuk [Haguenauer-Tsapis, R., Hinnen, A.: Molecular and Cellular Biology, 4, 2668-2675, (1984)] úgy, hogy a vad típusú PH05 Bam-Sal fragmentumot a kivágással helyettesítjük. Az S. cerevisiae AH216 élesztőtörzs transzformálása után (vö. 143 081. számú európai szabadalmi bejelentés) a savas foszfatáz aktivitást meghatározzuk Tohe és munkatársai módszerével [J. Bacteriol., 113, 727, (1973)]. A Δ11 és Δ12 deléciók a PH05 aktivitás körülbelül tízszeres csökkenését mutatják és egy upstream régiót határoznak meg („upstream aktivációs hely”, UAS), amely alapvető a PH05 expresszióhoz. Hasonló csökkentő hatást figyelünk meg a Δ7 deléciónál (körülbelül ötszörös csökkenés) és a Δ23-Δ26 TATA-box delécióknál (körülbelül harmincszoros csökkenés). Valamennyi más deléció esetében az aktivitás körülbelül megfelel a vad típus szintjének. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a PH05 expresszió három alapvető információs területe a következőképpen helyezkedik el:

1. a -349. és -383. helyzet között (UAS1),
2. a -225. és -263. helyzet között (UAS2),
3. a -87. és -125. helyzet között (TATA-box).

35 A PH05 UAS1-ét vagy UAS2-jét, vagy UAS1-ét és UAS2-jét tartalmazó DNS-fragmentumokat az M13mp9/PH05 Bam-Sal rekombinációs fágból állíthatjuk elő (vö. 1. példa), a megfelelő restriktációs endonukleázokkal végzett hasítással. Az UAS1 egy 268 bázispárnyi BamHI-ClaI fragmentumban helyezkedik el, amelynek képlete

3. példa

Összeolvasztott PH05-GAPDH hibrid promoterek létrehozása

Az 1. és a 2. példa egy a -365. helyzet UAS1(PH05) körüli, és egy másik, a -180. helyzet UAS2(PH05) körüli régiót hoz létre a PH05-génben, és ezek megfelelő jelöltek a szabályozó funkcióval rendelkező UAS-hez. Az UAS1(PH05) egy 268 bázispárnyi BamHI-ClaI fragmentumban helyezkedik el, míg az UAS1(PH05) és az UAS2(PH05) egyaránt benne vannak egy 368 bázispárnyi BamHI-BstEII fragmentumban.

A két fragmentum mindegyikét két különböző GAPDH downstream promoter alkotórészrel olvasztjuk össze, amelyek tartalmazzák a GAPDH TATA-box-át és átírási kezdési helyeit.

a) Egy élesztő géntár előállítása

Saccharomyces cerevisiae S288C törzs vad típusából származó teljes nagy molekulású DNS 30 µg-ját [Olson, M. V. és munkatársai: J. Mol. Biol., 132, 387, (1979)] 30 percig inkubáljuk 37 °C-on 2 egység EcoRI-metilázzal (New England Biolabs gyártmány) 250 µl EcoRI metilező pufferben, a szállító által javasolt módon. A DNS-t etanollal kicsapjuk, újra szuszpendáljuk 500 µl 25 mM trisz.HCl-ban (pH=8,5) és 2 mM magnézium-kloridban (EcoRI⁺ puffer) [Meyer, H.: FEBS Lett., 90, 341, (1979)], és EcoRI-vel (Boehringer gyártmány) emésztjük, amíg a DNS-fragmentumok méret szerinti eloszlása legfeljebb 30–50 kilobázis tartományban mozog (a λ DNS XhoI-el végzett emésztése megfelelő 33 kilobázisos és 17 kilobázisos markereket eredményez). Az EcoRI⁺ körülmények között emésztett élesztő DNS-t méret szerint frakcionáljuk egy szukróz gradiensen [5–20% szukróz 10 mM trisz × HCl-ban (pH=7,5), és 1 mM EDTA-ban] 6 órát 38 ezer/perc fordulatszámra egy SW 40 rotorban. A gradiens tetejéről 30, egyenként 0,4 ml-es frakciót szedünk. A 16. frakció 30–40 kilobázis méretű DNS-fragmentumokat tartalmaz. Ennek a frakciónak a DNS-ét (3 µg) etanollal kicsapjuk és 16 órát ligáljuk 15 °C-on 15 µl teljes térfogatban, egy pYcl kozmid vektor 1 µg-jához [Hohn, B. és munkatársai: Genetic Engineering, 2. kötet, 169. oldal, New York, (1980)], amelyet EcoRI-vel linearizáltunk. A ligálást 300 egység T4 DNS-ligázzal (New England Biolabs gyártmány) végezzük, a szállító által ismertetett pufferrendszert alkalmazva. A DNS-t in vitro becsomagoljuk λ-bakteriofágba [Hohn, B.: Methods in Enzymology, 68. kötet, 299. oldal, New York, (1979)] és az így létrehozott kapcsolt fágokat az E. coli HB101 törzs transzdukálására használjuk (r_k mM⁻⁴⁰ leu⁻, pro⁻, recA). A transzdukció hatékonysága körülbelül 5000 ampicillinrezisztens telep a pYcl vektor 1 µg-jára számítva.

3000 amp^R telepet kiválasztunk és egyénileg tenyésztünk mikrotitráló edények üregeiben LB közegen [10 g Bacto-Tryptone (Difco), 5 g Bacto élesztőextraktum (Difco), 10 g nátrium-klorid], amely 100 µg/ml ampicillint tartalmaz.

b) Az élesztő GAPDH-gén elkülönítése

A fent leírt géntárat egy szintetikus oligonukleotid-

dal [előállítás a foszfátriészter módszer alkalmazásával; Itakura, K. és munkatársai: J. Am. Chem. Soc., 97, 7327, (1975); de Rooij, J.F.M. és munkatársai: Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 98, 537, (1979)] screen-eljük, amelynek szerkezete a következő: 5'-GCTCCATCTTCCACCGCCCC-3'. Az oligonukleotid 10 µg-ját kinázzal kezeljük 10 µl γ³²P-ATP-t (3000 Ci/mmól, 10 µCi/µl, Amersham gyártmány) alkalmazva, T4 polinukleotid-kináz (Boehringer gyártmány) felhasználásával, 50 µl teljes térfogatban, Maniatis és munkatársai módszerével [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratórium, 125. oldal, (1982)]. A telephibridizálást ugyanennek a szerzőnek a módszerével végezzük (312. oldal). A pozitív klónokat autoradiográfiásan mutatjuk ki, Kodak X-5 röntgenfilmet alkalmazva. A plazmid DNS elkülönítése (vö. 100 561. számú európai szabadalmi bejelentés) egy olyan hibrid klónt eredményez, amely egy 2100 bázispárnyi, GAPDH-t kódoló HindIII-fragmentumot [Holland, J.P. és munkatársai: J. Biol. Chem., 254, 9839. oldal, (1979)] tartalmaz. A klónozott DNS azonosságának végső bizonyítékát a DNS-szekvenálási kísérlet szolgáltatja a fent említett oligonukleotidot, a didezoxiszekvenálási eljárással együtt alkalmazva, G. F. Hong kétfonalas DNS-re vonatkozó leírása szerint [Bioscience Reports, 1, 243, (1981)]. A klónozott GAPDH-gén szekvenciája azonos a pgap491-ével, amit Holland és munkatársai ismertetnek [J. Biol. Chem., 255, 2596, (1980)].

c) GAPDH downstream promoter alkotórészek előállítása

(2. és 3. ábra)

A GAPDH-gén ATG-jének -27. – -675. pozíciót magába foglaló 649 bázispárnyi TaqI fragmentumot (lásd 2. ábra) úgy különítjük el, hogy a fent említett hibrid plazmidot TaqI-el (New England Biolabs gyártmány) emésztjük, a DNS-fragmentumokat 1,2%-os lágy agaróz gélen elkülönítjük és a DNS-t forró fenollal extraháljuk (vö. 1. példa). A TaqI-fragmentum klónozását a pBR322 ClaI-helyére végezzük; 1 µg pBR322-t 3 egység ClaI-vel (New England Biolabs gyártmány) hasítunk, a szállító által leírt módon. A fenollal kezelt és hasított vektor 300 ng-ját körülbelül 300 ng beékelt DNS-hez (649 bázispárnyi TaqI fragmentum) ligáljuk, 200 egység T4 DNS-ligázt alkalmazva, 20 µl teljes térfogatban [vö. 1. b) példa]. A transzformálást E. coli HB101-be végezzük, hogy ampicillinrezisztencia jöjjön létre, a plazmid DNS-t kinyerjük és restrikciós analízissel elemezzük (TaqI, DraI). A TaqI-fragmentum orientációját a DraI restrikciós endonukleáz alkalmazásával határozzuk meg, kombinációban a plazmidok BamHI-helyével, és kiválasztunk egy olyan plazmidot, amelynek a -675. pozíciójú Taq-helye a pBR322 HindIII-helyéhez közel van. Ezt a plazmidot pBR322/GAPDH-nak nevezzük és BamHI (New England Biolabs gyártmánya) alkalmazásával linearizáljuk, és a Ba131gyel végzett emésztést az 1. példában leírt módon hajtjuk végre, azzal az eltéréssel, hogy BgIII-kapcsolókat (5'-CAGATCTG-

3', a New England Biolabs gyártmánya) alkalmazunk és az emésztett plazmidot közvetlenül gyűrűssé alakítjuk 5 µg/ml koncentrációban, 20 µl teljes térfogatban. A Ba131-gyel rövidített TaqI-fragmentum méretét restrikciós elemzéssel (BglII-t és HindIII-t használva) határozzuk meg. Kiválasztunk két klónt, amelyek olyan DNS-fragmentumokat tartalmaznak, amelyek az ATG-től körülbelül 200 és 265 bázispárnnyira benyúlnak „felé” a GAPDH-promoterbe. Mindkét fragmentum tartalmazza a vélelmezett TATA-box-ot körülbelül a -140. bázispárnál. Ezek a klónok még mindig tartalmazzák a replikációs origót a DNS pBR322-ből származó részében, és pGAPDH-F-nek, illetve pGAPDH-E-nek nevezzük őket.

d) A downstream GAPDH alkotórész kombinálása a PH05 UAS1(PH05)-jével és az eglin C protein kódoló régiójával

1) GAPDH alkotórészek (3. ábra)

Annak érdekében, hogy a GAPDH promoter alkotórészeket kivigyük a -27. pozíciónál levő TaqI-helytől a GAPDH-gén ATG-je mellett közvetlenül elhelyezkedő pozícióba, két szintetikus komplementer oligonukleotidot hozunk létre, amelyek szerkezete a következő:

5' CGAATAAACACACATAAATAAAG 3'
3' TTATTTGTGTGTTATTTCTTAA 5'

Ezek az oligonukleotidok biztosítják az eredeti GAPDH promoter szekvenciát a -26. pozíciótól a -5. pozícióig, egy terminális EcoRI-hely létrehozásával. A pGAPDH-E és -F plazmidok 2-2 µg-ját 6 egység TaqI-vel emésztjük 50 µl térfogatban, és a kapott elegyeket fenollal kezeljük, etanollal kicsapjuk és 10 µl vízben újra szuszpendáljuk. A szintetikus oligonukleotidokat hőkezeljük mindegyik szimpla fenol 2 µl-ét belekeverve 100 µl olyan oldatba, amely 10 mM trisz × HCl-ot (pH=7,5), 10 mM magnézium-kloridot és 50 mM nátrium-kloridot tartalmaz, az oldatot 3 percre 90 °C-ra melegítve majd lassan szobahőmérsékletre hűtve (körülbelül 3 óra alatt). A TaqI-el emésztett plazmidok mindegyikének 1 µg-ját összekeverjük a hőkezelt oligonukleotidok hússzoros moláris feleslegével 20 µl térfogatban, körülbelül 18 órát, 800 egység T4 DNS-ligáz alkalmazásával. A teljes elegyet emésztjük 3 egység BglII-vel (New England Biolabs gyártmánya). A DNS-fragmentumokat 1,5%-os lágy agaróz gélen elválasztjuk. A körülbelül 200 bázispárnnyi, illetve 265 bázispárnnyi BglII-EcoRI fragmentumokat kivágjuk a gélből, extraháljuk és etanollal kicsapjuk.

A pGAPDH-E plazmidot BglII-vel és EcoRI-vel emésztjük és a nagy (körülbelül 3,5 kilobázisnyi) fragmentumot elkülönítjük. Ezt a fragmentumot vektorként használjuk a 265 bázispárnnyi és 200 bázispárnnyi BglII-EcoRI-fragmentumok klónozására, olyan ligálási, transzformálási és plazmid elkülönítési körülményeket alkalmazva, amelyeket fent ismertettünk. Az előállított plazmidokat pGAPDH-EL-nek és pGAPDH-FL-nek nevezzük. A 4. ábrán láthatók a BglII-EcoRI fragmentumok DNS-szekvenciái pGAPDH-EL-be és pGAPDH-FL-be klónozva. A fragmentumok pontos mérete 266 illetve 201 bázispár.

II) Az UAS1(PH05) szabályozó alkotórész

A p31/Y plazmid (vö. 100 561. számú európai szabadalmi bejelentés) 3 µg-ját 6 egység ClaI-gyel (New England Biolabs gyártmánya) emésztjük. A 3' recesszált végeket az E. coli DNS-polimeráz-I Klenow-fragmentumával (Bethesda Research Laboratories) végzett reakcióval töltjük ki, Maniatis fent említett eljárásával. BglII-kapcsolókat (5'-CAGATCTG-3') adagolunk, amint azt az 1. példában leírtuk. A DNS-t SalI-gyel és BglII-vel (New England Biolabs gyártmánya) emésztjük és 1%-os lágy agaróz gélen futtatjuk. Az 548 bázispárnnyi fragmentumot kivágjuk a gélből, fenollal kezeljük és etanollal kicsapjuk a fent leírt módon.

15 III) A pJDB207R/PH05-EGL plazmid létrehozása (5. ábra)

Ez a plazmid a forrása egy olyan DNS-fragmentumnak, amely az eglin C kódoló régiójából és a PH05 átírási terminátorból áll.

20

A) A pJDB207 vektor fragmentum elkülönítése

A pJDB207R/IF (α-3) plazmid (100 561. számú európai szabadalmi bejelentés) 6 µg-ját BamHI restrikciós endonukleázzal teljesen emésztjük. A kapott 6,85 kilobázis és 1,15 kilobázis méretű DNS-fragmentumokat etanollal kicsapjuk és újra szuszpendáljuk 400 µl 50 mM trisz-HCl-ban (pH=8,0). Hozzáadunk 4,5 egység borjú bél alkálikus foszfatázt (Boehringer, Mannheim gyártmánya), és az elegyet 37 °C-on inkubáljuk 1 órát. Ezt követően a foszfatázt inaktíváljuk 65 °C-on végzett 1 órás inkubálással. Az oldatot 150 mM nátrium-klorid koncentrációra állítjuk be. A DNS-oldatot felvisszük egy DE 52 (Whatman gyártmánya) anioncserélőt tartalmazó 100 µl-es ágyra; az anioncserélőt 150 mM nátrium-kloridot és 1 mM EDTA-t tartalmazó 10 mM trisz-HCl-dal (pH=7,5) ekvilibráltuk. Ugyanezzel a pufferrel végzett mosás után a DNS-t eluáljuk 400 µl 1,5 M nátrium-klorid, 10 mM trisz-HCl (pH=7,5) és 1 mM EDTA alkalmazásával, és etanollal kicsapjuk. A nagy, 6,85 kilobázis méretű BamHI-fragmentumot a kis fragmentumoktól 0,6%-os, kis olvadáspontú agaróz gélen választjuk el, 8,3 pH-jú trisz-borát-EDTA pufferben.

45 B) Egy 534 bázispárnnyi PH05 promoter fragmentum elkülönítése

A p31/R plazmid (100 561. számú európai szabadalmi bejelentés) 10 µg-ját EcoRI és BamHI restrikciós endonukleázokkal emésztjük. A kapott 3 fragmentumot 0,6%-os, kis olvadáspontú agaróz gélen, 8,3 pH-jú trisz-borát pufferben szétválasztjuk; elkülönítünk egy 534 bázispárnnyi BamHI-EcoRI-fragmentumot, amely tartalmazza az mRNS indítási helyeket magába foglaló PH05 promotert.

55

C) Egy 221 bázispárnnyi, az eglint kódoló szekvenciát tartalmazó DNS-fragmentum elkülönítése

A pML147 plazmid (146 785. számú európai szabadalmi bejelentés) 8 µg-ját BamHI és EcoRI restrikciós endonukleázzal emésztjük. A kapott 2 DNS-frag-

60

mentumot 0,6%-os, kis olvadáspontú agaróz gélen, 8,3 pH-jú trisz-borát pufferben választjuk szét. A 221 bázispárnyi fragmentumot elkülönítjük.

D) DNS-fragmentumok ligálása

3 fent leírt [3. d) III.A-C példák], megfelelő ragadós végekkel rendelkező DNS-fragmentumot egy reakcióban ligálunk: a ligáláshoz 0,1 pmól (0,45 µg) 6,85 kilobázisnyi BamHI vektor fragmentumot, 0,2 pmól (70 ng) 534 bázispárnyi BamHI-EcoRI PH05 promoter fragmentumot és pML147 221 bázispárnyi EcoRI-BamHI-fragmentumának 0,2 pmól-ját (29 ng) használjuk.

Mindhárom DNS-fragmentum alacsony olvadáspontú agaróz kis gélblokkjaiban helyezkedik el. A 3 agaróz gél darabkát összekeverjük, 65 °C-on elfolyósítjuk és kétszer hígítjuk. A ligálást 270 µl 60 mM trisz-HCl (pH=7,5), 10 mM magnézium-klorid, 10 mM DTT és 1 mM ATP teljes térfogatában végezzük 16 egység T4 DNS-ligázzal (Boehringer, Mannheim) 15 °C-on 16 órát. A ligálási elegy 10 µl-es alikvot részét hozzáadjuk 100 µl-nyi, kalciummal kezelt, transzformálásra alkalmas *E. coli* HB101 sejthez.

24 különálló transzformált, amp^R telepet tenyésztünk 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB-közegen. Plazmid DNS-t állítunk elő Holmes és munkatársai módszere szerint [Anal. Biochem. 114, 193, (1981)] és HindIII/EcoRI kettős emésztéssel elemezzük. A 600 bázispárnyi EcoRI-HindIII fragmentum megjelenése azt mutatja, hogy a szóbanforgó klón a megfelelő orientációban tartalmazza a PH05 promoter – eglin C – DNS-fragmentum részt az expressziós vektorba beékelve. Amint azt vártuk, a klónok körülbelül 50%-a tartalmazza a beékelte részt ahelyes orientációban. E klónok egyikét elkülönítjük és pJDB207R/PH05-EGL-nek nevezzük el.

A pJDB207R/PH05-EGL plazmid 6 µg-ját HindIII és SallI restrikciós endonukleázokkal teljesen emésztjük. A nagy, 6,1 kilobázisnyi (vektorrész) fragmentumot elkülönítjük lágy agaróz gél elektroforézissel, fenolos extrakcióval és etanolos kicsapással. A vektor DNS-t 20 µl vízben újra szuszpendáljuk. Az eglin fragmentumot úgy hozzuk létre, hogy pJDB207R/PH05-EGL-t HindIII-mal és EcoRI-vel emésztjük. A kapott 600 bázispárnyi fragmentumot lágy agaróz gél elektroforézissel választjuk el, fenollal extraháljuk és etanollal kicsapjuk. Az eglin fragmentumot újra szuszpendáljuk 20 µl vízben.

IV. A fragmentumok ligálása UAS1(PH05) alkotórészek alkalmazásával (6. ábra)

A ligálást a következő 4 komponens felhasználásával végezzük: 0,5 g 6,1 kilobázisnyi HindIII-SallI vektor fragmentum, 100 ng 600 bázispárnyi EcoRI-HindIII eglin C fragmentum, 200 ng 266 bázispárnyi BglII-EcoRI fragmentum (pGAPDH-EL-ből) és 100 ng UAS1(PH05)-öt magába foglaló 548 bázispárnyi SallI-BglII fragmentum. A ligálást a fent leírt módon hajtjuk végre. Az *E. coli* HB101 transzformálását ampicillin rezisztenciára, a plazmid elkülönítést és a pozitív klónok restrikciós elemzését a korábban leírt módon hajt-

juk végre, HindIII, EcoRI, BglII és SallI restrikciós endonukleázokat alkalmazva. Egy pozitív klónt kiválasztunk és pJDB207/PAPFL-EGL (UAS1)-nek nevezzük el.

- 5 Analóg módon járunk el a pGAPDH-FL 201 bázispárnyi BglII-EcoRI fragmentumával. A kapott plazmidot pJDB207/PAPFL-EGL (UAS1)-nek nevezzük.

V. Hibridek létrehozása UAS1(PH05) és

- 10 UAS2(PH05) alkotórészekkel

A IV. részben előállított plazmidok 3 µg-ját BglII-vel emésztjük. Fenolos extrakció és etanolos kicsapás után a DNS-t vízben újra szuszpendáljuk. A 3' recesszált végeket Klenow DNS-polimerázzal töltjük ki, amint azt a II. részben ismertettük. A plazmidokat 70 °C-ra melegítjük 10 percig az enzim inaktiválására. SallI-vel (Biolabs gyártmány) végzett emésztés után a nagy fragmentumokat (körülbelül 7,2 kilobázis) lágy agaróz gél elektroforézissel és fenolos extrakcióval elkülönítjük el, és az etanollal kicsapott DNS-t vízben újra szuszpendáljuk.

A p31/Y plazmidot hasonló módon emésztjük BstEII-vel, DNS-polimerázzal (Klenow-fragmentum) kezeljük és SallI-vel hasítjuk. A 651 bázispárnyi fragmentumot a fent leírt módon elkülönítjük. A fenti vektor DNS-ek 200 ng-jának ligálása a 651 bázispárnyi fragmentumhoz a következő plazmidokat eredményezi:

- 30 pJDB207/PAPFL-EGL (UAS1+UAS2) (magába foglalja a pGAPDH-EL 266 bázispárnyi BglII-EcoRI fragmentumát),
pJDB207/PAPFL-EGL (UAS1+UAS2) (magába foglalja a pGAPDH-FL 201 bázispárnyi BglII-EcoRI fragmentumát).

4. példa

- 35 a) *Saccharomyces cerevisiae* GRF18 transzformálása

A 3. d/IV. és 3.d/V. példák 4 plazmidjának mind-egyikét bevisszük *Saccharomyces cerevisiae* GRF18 törzsbe (α, his3-11, his3-15, leu2-3, leu2-112, canR), a Hinnen és munkatársai által leírt transzformációs előíratot [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929, (1978)] követve. A transzformált élesztősejteket leucinhiányos élesztő minimum tápközeg lemezein választjuk szét. A különálló transzformált élesztőtelepeket elkülönítjük és *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207/PAPFL-EGL (UAS1), /PAPFL-EGL (UAS1+UAS2) és PAPFL-EGL (UAS1+UAS2) elnevezéssel hivatkozunk rájuk.

b) A transzformánsok fermentálása

- 50 A 4 *S. cerevisiae* GRF18 transzformáns mindegyikének sejteit 10 ml élesztő minimum tápközegben (Difco Yeast Nitrogen Base, aminosavak nélkül, 2% glükóz és 20 mg/l L-hisztidin hozzáadásával) tenyésztjük 50 ml-es Erlenmeyer lombikban rázatás közben 30 °C-on 24 óra hosszat, 3×10^7 sejt/ml sűrűségig. A sejteket 0,9%-os nátrium-klorid oldattal mossuk és egy magas P_i közeg (mint fent) és egy alacsony P_i minimum tápközeg 50-50 ml-ének inokulálására használjuk; ez utóbbit a Difco Yeast Nitrogen Base tápközeg receptje alapján készítjük (aminosavak nélkül), 0,03 g/l

kálium-dihidrogén-foszfáttal, 1 g/l kálium-kloriddal, 10 g/l L-aszparaginnal ammónium-szulfát helyett, 2% glükózzal és 1 g/l L-hisztidinnel. A közeget 0,03-as kezdeti optikai sűrűsége (600 nm-en mérve) inokuláljuk. A sejteket 500 ml-es lombikban tenyésztjük 30 °C-on 24 órát (optikai sűrűség 600 nm=1,8 az alacsony P_i tápközegre, optikai sűrűség 600 nm=3,0 a magas P_i tápközegre).

C) Az eglin C titerek meghatározása

Amikor a sejtek elérték a fent megadott sejtsűrűséget (optikai sűrűséget), azokat kinyerjük, centrifugáljuk és üvegyöngyökkel elroncsoljuk. Az elegyek eglin aktivitását meghatározzuk az emberi leukocita elasztáz gátlásának mérésével U. Seemüller és munkatársai módszerével [Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 358, 1105, (1977)]. A következő aktivitásértékeket kaptuk:

S. cerevisiae extraktum	eglin C aktivitás (mg/l/a tenyészet optikai sűrűsége)	
	indukált (alacsony P _i)	nem indukált (magas P _i)
pJDB207/PAPFL-EGL (UAS1)	14	0,7
pJDB207/PAPFL-EGL (UAS1)	17	0,7
pJDB207/PAPFL-EGL (UAS1 + UAS2)	14	1
pJDB207/PAPFL-EGL (UAS1 + UAS2)	11	0,7

5. példa

Deszulfátohirudin expressziója a PH05-GAPDH hibrid promotor szabályozása alatt

1. A nukleotidszekvencia módosítása a deszulfátohirudin HVI gén 5'-végén

A deszulfátohirudint kódoló nukleotidszekvencia (vö. 168 342. számú európai szabadalmi bejelentés) GTT-vel kezdődik, ami a végső géntermék NH₂-terminális valin aminosavának felel meg. Az E. coli-ban való egyszerű szubklonozáshoz és expresszióhoz a kódoló szekvenciát 5'-végén meghosszabbítjuk 8 nukleotiddal, amelyben egy EcoRI restrikciós hely és egy ATG indítókodon is van. Ezeket a hozzáépített nukleotidokat el kell távolítani a hirudin kódoló szekvenciának a PH05 jelzőpeptidet kódoló szekvenciához való pontos kereten belüli fúziójához. Ezt úgy érjük el, hogy az EcoRI restrikciós helyet egy síkban levő véghelyre alakítjuk át, egy szintetikus oligonukleotid hozzáadásával, amely olyan pozícióban tartalmazza a HgaI felismerőhelyet, hogy az ezt követően HgaI-gyel végzett hasítás közvetlenül a GTT-kodontól „felfelé” megy végbe.

Egy HgaI restrikciós hely bevitele a deszulfátohirudin gén elé (7. ábra)

8 µg pML310 plazmidot (168 342. számú európai szabadalmi bejelentés) EcoRI restrikciós endonukleázzal teljesen emésztünk. A DNS-t (pML310/EcoRI) fe-

nol és kloroform elegyével extraháljuk és etanollal kicsapjuk. Az 5' túlnyúló végeket SI-nukleázzal eltávolítjuk. 4 µg pML310/EcoRI DNS-t 100 µl 250 mM nátrium-klorid, 1 mM cink-szulfát, 30 mM nátrium-acetát (pH=4,6) jelenlétében emésztünk 20 egység/ml SI-nukleázzal (Sigma gyártmány) 45 percig 37 °C-on.

A DNS-t fenol és kloroform elegyével extraháljuk és etanollal kicsapjuk. A DNS-t (pML130/EcoRI/SI) újra szuszpendáljuk 10 µl 50 mM trisz-HCl-ban (pH=8,0) és 2 egység borjú bél alkálikus foszfatázzal (CIAP, Boehringer gyártmány) inkubáljuk 1 óra hosszat 37 °C-on. Az enzimet 65 °C-on, 1,5 óra hosszat inaktíváljuk.

Az inkubált elegy nátrium-klorid koncentrációját 150 mM-ra állítjuk be. A defoszforilezett DNS-t (pML310/EcoRI/SI/CIAP) adszorpcióval tisztítjuk DE52 (Whatman gyártmány) ioncserélő oszlopon, kis sótartalmú pufferben [150 mM nátrium-klorid, 10 mM trisz-HCl (pH=8,0) 1 mM ADTA], majd egy nagy sótartalmú pufferoldattal [1,5 M nátrium-klorid, 10 mM trisz-HCl (pH=8,0), 1 mM EDTA] eluáljuk. A DNS-t etanollal kicsapjuk és vízben újra szuszpendáljuk 0,8 g/ml koncentrációban.

Egy 5'-AGCGTCGACGCT-3' képletű oligonukleotidot állítunk elő a foszfortriészter módszerrel [Itakura és munkatársai: J. Am. Chem. Soc., 103, 706, (1981)]. Az oligonukleotid szekvenciája önkiegészítő és tartalmazza a -GACGC-felismerőhelyet a HgaI restrikciós endonukleázhoz. A két szimpla fonál melegeitése egy 12 bázispárnyi kétfonális DNS-kapcsolót eredményez.

A szintetikus egyfonális oligodezoxi-nukleotid 1,2 µg-ját foszforilezzük 10 µl 60 mM trisz-HCl-ben (pH=7,5), 10 mM magnézium-klorid 5 mM DTT, 30 µCi [³²P] ATP (3000 Ci × mmól⁻¹), (Amersham gyártmány jelenlétében 6 egység T4 polinukleotid-kinázzal (Boehringer gyártmány) 30 percig 37 °C-on, majd 15 percig 37 °C-on 0,5 mM ATP jelenlétében. Az elegyet tovább inkubáljuk 10 percig 75 °C-on az enzim inaktíválására, majd a hőkezelésre hagyjuk szobahőmérsékletre hűlni. 0,6 µg (170 pmól) ³²P-jelzett kapcsoló DNS-t összekeverünk 2,4 µg (1,75 pmól végek) pML310/EcoRI/SI/CIAP-vel és 20 µl 60 mM trisz-HCl-ben (pH=7,5) 10 mM magnézium-klorid, 5 mM DTT és 3,5 mM ATP jelenlétében ligáljuk 800 egység T4 DNS-ligázzal (Biolabs gyártmány) 20 órát 15 °C-on. A ligázt 85 °C-on 10 percig inaktíváljuk és a kapcsolómolekulák feleslegét eltávolítjuk a DNS kicsapásával 10 mM EDTA (pH=7,5), 300 mM nátrium-acetát (pH=6,0) és 0,54 térfogatrész izopropanol jelenlétében. 30 percnyi szobahőmérsékleten tartás után a DNS-t pelletezzük, újra szuszpendáljuk 45 µl ligáló elegyben (fent ismertettük) és 6 órát ligáljuk 15 °C-on gyűrűs DNS kialakítására.

A ligáló elegy 1 µl-es és 3 µl-es alikvot részeit hozzáadjuk 100 µl-nyi kalciummal kezelt, transzformálható E. coli HB101 sejthez [előállítás D. Hanahan módszerével, J. Biol. Chem., 166, 557, (1983)]. A sejteket 30 percig jégen hagyjuk, majd 3 percig 42 °C-on inkubáljuk, jégen hűtjük 2 percig, majd 1 órát inkubál-

juk 37 °C-on 400 µl SOC közegben. A sejtmintákat egyenként 100 µl-re töményítjük be és LB agarlemezre helyezük, amelyek 50 µg/ml ampicillint tartalmaznak.

12 transzformált, amp^R telepet tenyésztünk külön-külön 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB-közegben. Plazmid DNS-t állítunk elő D.S. Holmes és munkatársai módszere szerint [Anal. Biochem., 114, 193, (1981)]. A szintetikus oligonukleotid kapcsoló jelenlétét DNS-szekvenálással erősítjük meg, primerként egy olyan egyfonalas DNS-fragmentumot alkalmazva, amely a hirudin kódoló fonalára hibridizálódik. Egy a kapcsoló DNS-t helyes pozícióban, a hirudin gén előtt tartalmazó klónt pML310L-nek nevezünk.

II. A PH05 jelzőszekvencia és a deszulfátóhirudin struktúrájának összeolvasztása

a) A 0,2 kilobázisnyi deszulfátóhirudin fragmentum (7. ábra) elkülönítése

12 µg pML310L plazmidot teljesen emésztünk BamHI és PvuI restriktív endonukleázokkal. A DNS fenol és kloroform elegyével végzett extrakciója és etanolos kicsapása után a két restriktív fragmentumot elválasztjuk 1,2%-os agaróz gélen 8,3 pH-jú trisz-borát-EDTA pufferben. Az etidium-bromiddal megfestett 0,84 kilobázisnyi PvuI-BamHI fragmentumot egy gélselezen különítjük el. A DNS-t elektromos úton eluáljuk egy dializáló zacskóban, amely 3 ml 0,2 × TBE pufferrel van megtöltve. A zárt zacskót 8,3 pH-jú TBE pufferbe (90 mM trisz bázis, 90 mM bórsav, 2,5 mM ADTA) merítjük. 30 percig 100 mA áramot vezetünk át, majd az áram polaritását 45 másodpercre megfordítjuk, hogy a DNS-t eltávolítsuk a dializáló membránból. Kinyerjük a puffert, amely körülveszi a gélseletet a dializáló edényben, nátrium-klorid koncentrációját 150 mM-ra állítjuk be és átengedjük egy DE52 (Whatman gyártmány) ioncserélő oszlopon. A DNS-t nagy sótartalmú pufferrel [1,5 M nátrium-klorid, 10 mM trisz-HCl (pH=8,0), 1 mM EDTA]] eluáljuk, etanollal kicsapjuk és újra feloldjuk vízben, 0,1 mg/ml koncentrációban.

A pML310L 0,84 kilobázisnyi PvuI-BamHI fragmentumát tovább emésztjük HgaI restriktív endonukleázzal. Ez az emésztés egy 198 bázispárnyi HgaI-BamHI fragmentumot eredményez, amely tartalmazza a kész deszulfátóhirudin teljes kódoló szekvenciáját. Az AluI-gyel végzett további emésztés nem változtatja meg a 198 bázispárnyi HgaI-BamHI fragmentumot, de eltávolítja a többi hasonló méretű HgaI fragmentumot.

A 0,2 kilobázisnyi HgaI-BamHI fragmentumot a többi fragmentumtól 1,5%-os agaróz gélen TBE pufferben választjuk el és elektromos úton végrehajtott eluálással (amint fent leírtuk) különítjük el. A DNS-t DE52 ioncserés kromatográfiával és etanolos kicsapással tisztítjuk. A DNS-t újra szuszpendáljuk vízben 30 µg/ml koncentrációban (0,2 pmól/µl).

b) A PH05 promotor régió elkülönítése a PH05 jelzőszekvencia egy részével együtt (8. ábra)

A p31/PH05-TPA18 plazmid (vö. 143 081. számú európai szabadalmi bejelentés) egy idegen struktúrán

(t-PA) keretében olvasztva tartalmazza a PH05 promotert és a PH05 jelzőszekvenciát. Egy 584 bázispárnyi BamHI-BalI fragmentum tartalmazza a PH05 promotert és a teljes PH05 jelzőszekvenciát, kivéve 8 nukleotidot a 3'-végen.

8 µg p31/PH05-TPA18 DNS-t emésztünk BalI restriktív endonukleázzal (16 óra 37 °C-on). A DNS-t fenol és kloroform elegyével extrahálva és etanollal kicsapva tisztítjuk. A DNS-t vízben újra szuszpendáljuk 0,7 mg/ml koncentrációban.

A megfelelő összekapcsolást a PH05 jelzőszekvencia és a deszulfátóhirudint kódoló régió között egy

(1) 5'-CCAATGCA-3'

(2) 3'-GGTTACGTCAACA-5'

képletű szintetikus kapcsoló biztosítja.

A kapcsoló 5'-végén 8 nukleotid (5'-CCAATGCA) a PH05 jelzőszekvencia részét képezi a BalI-helytől az átalakítási helyig. A (2) oligonukleotid 5'-végén túlnyúló 5 nukleotidja beleillik a HgaI hasítóhelybe a deszulfátóhirudint kódoló szekvencia végén.

Az (1) és (2) egyfonalas egyedi nukleotidokat a foszfortriészter módszerrel [Itakura és munkatársai fent hivatkozott módszere] állítjuk elő. 1,1 µg (1) nukleotidot és 1,8 µg (2) nukleotidot külön-külön foszforilezünk 5'-végükön, ekvimoláris arányban összekeverjük és az 5.1. példában leírt módon hőkezeltük őket.

A foszforilezett, kétfonalas kapcsoló DNS 1,3 µg-ját (200 pmól) 7 µg (1,8 pmól) BalI-gyel hasított p31/PH05-TPA18-hoz ligáljuk 40 µl 60 mM trisz-HCl (pH=7,5), 10 mM magnézium-klorid, 3,5 mM ATP, 5 mM DTT és 1400 egység T4 DNS-ligáz (Biolabs gyártmány) jelenlétében 15 °C-on 16 óra hosszat. A ligázt 10 percig inaktíváljuk 85 °C-on. A kapcsolók feleslegét a DNS-kicsapásával távolítjuk el 10 mM EDTA, 300 mM nátrium-acetát (pH=6,0) és 0,54 térfogatrés izopropanol jelenlétében. A DNS-t újra szuszpendáljuk és tovább emésztjük BamHI restriktív endonukleázzal. A DNS fenol és kloroform elegyével végzett extrahálása és etanolos kicsapása után a két restriktív fragmentumot 1,2%-os agaróz gélen, 8,3 pH-jú Trisz-borát-EDTA pufferben szétválasztjuk. A 0,6 kilobázisnyi fragmentumot elkülönítjük a gélből. A DNS-t elektromos úton eluáljuk és tovább tisztítjuk DE52 ioncserés kromatográfiával és etanolos kicsapással. A 0,6 kilobázisnyi BamHI-HgaI DNS-fragmentumot vízben újra szuszpendáljuk 40 µg/ml koncentrációban.

c) Egy pJDB207 élesztő vektor fragmentum elkülönítése (8. ábra)

A pJDB207R/PH05-TPA (12-2) plazmid (143 081. számú európai szabadalmi bejelentés) DNS-ének 9 µg-ját BamHI restriktív endonukleázzal emésztjük. A teljes emésztés után a DNS-t extraháljuk fenol és kloroform elegyével és etanollal kicsapjuk. A DNS-t újra szuszpendáljuk 50 mM trisz-HCl-ban (pH=8,0), 0,1 mg/ml koncentrációban, és 7 egység borjú bél alkalikus foszfatázzal emésztjük 1 óra hosszat 37 °C-on. A foszfatázt inaktíváljuk 1,5 óra hosszat 65 °C-on és a DNS-t DE52 ioncserés kromatográfiával és etanolos

kicsapással (vö. 5.I. példa) tisztítjuk. A 6,8 kilobázis nagyságú BamHI fragmentumot elválasztjuk 1,2%-os agaróz gélen, 8,3 pH-jú trisz-borát-EDTA pufferben. A DNS-t elektromosan eluáljuk és DE52 ioncserés kromatográfiával és etanolos kicsapással tisztítjuk. A DNS-t vízben oldjuk 0,4 mg/ml koncentrációban (0,1 pmól/μl).

d) A PH05 promoter fragmentum és a deszulfátóhirudin strukturgén ligálása a pJDB207 élesztő vektor fragmentumhoz (8. ábra)

A pJDB207 élesztő vektort, a PH05 promoter fragmentumot a PH05 jelzőszekvenciával és a deszulfátóhirudin strukturgént egyaránt DNS-fragmentumok formájában [vö. 5.II. a)–c) példa] különítjük el, amelyeket egy expressziós plazmid készítésére ligálunk.

A p31/PH05-TPA18 0,6 kilobázisnyi BamHI-HgaI fragmentumának 0,3 pmól-ját és a pML310L 0,2 kilobázisnyi HgaI-BamHI-fragmentumának 0,3 pmól-ját a pJDB207/PH05-TPA (12-2) 6,8 kilobázisnyi BamHI fragmentumának 0,1 pmól-jához ligáljuk 10 μl 60 mM trisz-HCl (pH=7,5), 10 mM magnézium-klorid, 5 mM DTT, 1 mM ATP és 400 egység T4 DNS-ligáz jelenlétében 20 óra hosszat 15 °C-on.

A ligálási elegy 1 μl-nyi alikvot részét hozzáadjuk 100 μl transzformálásra alkalmas E. coli BH101 sejtéhez, amelyeket Hanahan fent említett módszere szerint állítottunk elő. A transzformálási előíratot is ebből a közleményből vettük át. A sejteket 500 μg/ml ampicillint tartalmazó LB agarlemezre telepítjük.

24 amp^R telepet tenyésztünk külön-külön LB tápközegen, 100 μg/ml ampicillinnel. A plazmid DNS méretét és a beékelt rész helyzetét PstI restrikciós endonukleázzal végzett hasítással határozzuk meg. Azt a klónt, amelyik a beékelt részt helyes orientációban tartalmazza, pJDB207/PH05-HIR-nek nevezzük.

III. A pJDB207/PH05(Eco)-HIR plazmid előállítás (9. ábra)

Az UAS(PH05)-GAPDH hibrid promoter alkotórészek megfelelő csatlakoztatására a deszulfátóhirudin PH05 jelzőszekvenciát is tartalmazó kódoló régiójához (mint a pJDB207)PH05-HIR plazmidban) egy EcoRI hasítóhelyet viszünk be az 5' le nem fordított régióba az mRNS indítóhelyek és a kódoló régió ATG-je közé.

15 μg pJDB207/PHO-HIR plazmidot DraI restrikciós endonukleázzal (Boehringer gyártmány) emésztünk. A kapott 4 fragmentumot 0,8%-os agaróz gélen különítjük el 8,3 pH-jú trisz-borát-EDTA pufferben. A 4,2 kilobázisnyi DNS-fragmentumot kinyerjük a gélből, elektromosan eluáljuk és etanollal kicsapjuk. A DNS-t újra szuszpendáljuk vízben 0,6 mg/ml koncentrációban.

Az 5'-AATTGCATTACCAATGTTT-3' szintetikus oligonukleotid 2,3 μg-ját illetve a 3'-GCTA-ATGGTTACAAA-5' képletű szintetikus oligonukleotid 2,9 μg-ját kinázzal kezeljük 20 μl 60 mM triszben (pH=7,5), 10 mM magnézium-klorid, 5 mM DTT, 0,5 mM ATP és 20 egység T4 polinukleotid-kináz (Boehringer gyártmány) jelenlétében. 45 perc múlva

37 °C-on a két reakcióelegyet egyesítjük, 10 percre 75 °C-ra melegítjük és hagyjuk szobahőmérsékletre hűlni. A hőkezelt oligonukleotid kapcsolót -20 °C-on tároljuk.

5 A 4,2 kilobázisnyi DraI DNS-fragmentum 6,5 μg-ját (2,3 pmól) 16 órát inkubáljuk 15 °C-on a kinázzal és hővel kezelt oligonukleotid kapcsoló hetvenszeres feleslegének jelenlétében, 50 μl 60 mM trisz-szel (pH=7,5), 10 mM magnézium-kloriddal, 5 mM DTT-vel, 3,5 mM ATP-vel és 800 egység T4 DNS-ligázzal (Biolabs gyártmány). A T4 DNS-ligázt 10 percig inaktiváljuk 85 °C-on, majd a kapcsolók feleslegét a DNS kicsapásával távolítjuk el 10 mM EDTA, 300 mM nátrium-acetát (pH=6,0) és 0,54 térfogatrészes izopropanol jelenlétében. A DNS-t EcoRI-gyel és HindIII-mal emésztjük. A kapott fragmentumokat 1%-os agaróz gélen, 8,3 pH-jú trisz-borát-EDTA pufferben választjuk szét. A 643 bázispárnyi fragmentumot a gélből elektromosan eluálással és etanolos kicsapással távolítjuk el. A DNS-t újra szuszpendáljuk 0,1 pmól/μl koncentrációban. Az EcoRI-HindIII fragmentum tartalmazza a PH05 jelzőszekvenciáját, a deszulfátóhirudint kódoló szekvenciát és a PH05 átírási terminátort.

25 Az 534 bázispárnyi PH05 promoter fragmentumot a p31/R plazmidból különítjük el (100 561. számú európai szabadalmi bejelentés).

30 10 μg p31/R-et EcoRI és BamHI restrikciós endonukleázokkal hasítunk. A kapott 3 fragmentumot 0,6%-os, kis olvadáspontú agaróz gélen, 8,3 pH-jú trisz-borát-EDTA pufferben választjuk szét. Elkülönítünk egy 534 bázispárnyi BamHI-EcoRI fragmentumot, amely tartalmazza PH05 promotert, beleértve az mRNS indítóhelyeket is.

35 A vektor fragmentumot a pJDB207/PH05-HIR plazmidból különítjük el. Ennek a plazmidnak 6 μg-ját BamHI-gyel és HindIII-mal emésztjük. A nagy, 6,5 kilobázisnyi BamHI-HindIII fragmentumot a kis fragmentumtól 0,6%-os, kis olvadáspontú agaróz gélen, 8,3 pH-jú trisz-borát-EDTA pufferrel választjuk el.

40 Három fent leírt, megfelelő ragadós végekkel rendelkező DNS-fragmentumot ligálunk a következő reakcióban: a PH05 promoter 534 bázispárnyi BamHI-EcoRI fragmentumának 0,2 pmól-ját (70 ng), a 643 bázispárnyi EcoRI-HindIII fragmentum (hirudin kódoló szekvencia) 0,2 pmól-ját (85 ng) és a 6,5 kilobázisnyi BamHI-HindIII vektor fragmentum 0,1 pmól-ját (0,4 μg) ligáljuk 10 μl 60 mM trisz-ben (pH=7,5), 10 mM magnézium-klorid, 5 mM DTT, 1 mM ATP és 400 egység T4 DNS-ligáz jelenlétében 6 órát 15 °C-on.

45 A ligálási elegy 1 μl-nyi alikvot részét hozzáadjuk 100 μl-nyi, kalciummal kezelt, transzformálásra alkalmas E. coli HB101 sejtekhez.

50 12 transzformált, amp^R telepet tenyésztünk külön-külön, 100 μg/ml ampicillint tartalmazó LB közegen.

55 A plazmid DNS-t Holmes és munkatársai módszerével állítjuk elő [Anal. Biochem., 114, 193, (1981)], és az EcoRI és BamHI restrikciós emésztési termékek elemzése alapján vizsgáljuk. Egy a várt restrikciós fragmentumokat eredményező gént elkülönítünk és pJDB207/PH05(Eco)-HIR-nek nevezünk el.

IV. Az UAS1(PH05)-GAPDH hibrid promoterek ligálása a deszulfátohirudin protein kódoló régiójához

15 µg pJDB207/PH05(Eco)-HIR plazmidot EcoRI-gyel és HindIII-mal emésztünk. A DNS-fragmentumokat 1%-os agaróz gélen választjuk szét 8,3 pH-jú trisz-borát-EDTA pufferben.

A 643 bázispárnyi fragmentumot elkülönítjük a gélből, elektromosan eluáljuk és etanollal kicsapjuk. A DNS-t újra szuszpendáljuk vízben 0,1 pmól/µl koncentrációban.

6 µg pJDB207/PH05-HIR plazmidot teljesen emésztünk HindIII és SallI restriktív endonukleázzal. A nagy, 6,3 kilobázisnyi fragmentumot (vektor rész) lágy géll elektroforézissel, fenolos extrakcióval és etanolos kicsapással különítjük el. A vektor DNS-fragmentumot vízben újra szuszpendáljuk 0,05 pmól/µl koncentrációban.

10 µg pGAPDH-EL plazmidot (vö. 3. d/I. példa) BglII-vel és EcoRI-gyel emésztünk. A 266 bázispárnyi BglII-EcoRI fragmentumot 1,2%-os agaróz gélen, 8,3 pH-jú trisz-borát-EDTA pufferben választjuk el, elektromosan eluáljuk a gélből és etanollal kicsapjuk. A DNS-t újra szuszpendáljuk vízben 0,3 pmól/µl koncentrációban.

Az UAS1(PH05)-öt tartalmazó 548 bázispárnyi SallI-BglII fragmentum (3. d/II. példa) 0,3 pmól-ját, a pGAPDH-EL 266 bázispárnyi BglII-EcoRI fragmentumának 0,3 pmól-ját, a pJDB207/PH05(Eco)-HIR 643 bázispárnyi EcoRI-HindIII fragmentumának 0,3 pmól-ját és a 6,3 kilobázisnyi SallI-HindIII vektor fragmentum 0,12 pmól-ját ligáljuk 20 µl 60 mM trisz-ben (pH=7,5), 10 mM magnézium-klorid, 5 mM DTT, 1 mM ATP és 400 egység T4 DNS-ligáz (Bio-labs gyártmány) jelenlétében 6 órát 15 °C-on. A ligálási elegy 1 µl-nyi és 3 µl-nyi alikvot részeit 100 µl-nyi kalciummal kezelt, E. coli HB101 sejtekhez adjuk. Az amp^R telepekből a plazmid elkülönítését és a restriktív elemzést SallI, BglII, EcoRI és HindIII alkalmazásával a fent leírt módon hajtjuk végre (3. d/III. példa). Egy pozitív klónt kiválasztunk és pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1)-nek nevezzük el. Analóg módon járunk el a pGAPDH-FL-ből elkülönített 201 bázispárnyi BglII-EcoRI-fragmentummal. Egy kiválasztott plazmidot pJDB207/PAPFL-HIR(UAS1)-nek nevezzük el.

V. UAS1(PH05)-UAS2(PH05)-GAPDH hibrid promoterek ligálása a deszulfátohirudin protein kódoló frakciójához

A pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1) és a pJDB207/PAPFL-HIR(UAS1) plazmidok 3-3 µg-ját BglII-vel emésztjük. Fenolos extrakció és etanolos kicsapás után a DNS 3' recesszált végeit E. coli DNS-polimerázával (Klenow-fragmentum; Bethesda Research Laboratories) végzett reakcióval töltjük ki Maniatis és munkatársai fent hivatkozott módszerével. Az enzimet 70 °C-on inaktíváljuk 10 percig. A DNS-eket SallI-gyel tovább emésztjük és a nagy, 7,2 kilobázisnyi fragmentumot lágy agaróz géll elektroforézissal,

fenolos extrakcióval és etanolos kicsapással különítjük el. Mindegyik fragmentumot újra szuszpendáljuk vízben 0,05 pmól/µl koncentrációban. A fragmentumok tartalmazzák a hirudint kódoló régiót, a legtöbb vektor szekvenciát és a pGAPDH-EL-ből vagy pGAPDH-FL-ből elkülönített 2 promotor alkotórész bármelyikét.

A p31/Y plazmidot (100 561. számú európai szabadalmi bejelentés) BstEII-vel emésztjük, E. coli DNS-polimerázal (Klenow-fragmentum) inkubáljuk a fent leírt módon és SallI-gyel hasítjuk. A 649 bázispárnyi fragmentumot lágy agaróz gélen elválasztjuk és fenolos extrakcióval és etanolos kicsapással kinyerjük.

A p31/Y 649 bázispárnyi fragmentumának – amely tartalmazza az UAS1–UAS2(PH05) promoter alkotórészt – 0,3 pmól-ját és a 7,2 kilobázisnyi fragmentumok bármelyikét ligáljuk és E. coli HB101-be transzformáljuk a fent leírt módon. Az amp^R telepekből plazmidokat állítunk elő és a restriktív emésztéssel nyert termékek alapján vizsgáljuk őket. Egyes klónokat kiválasztunk és plazmid DNS-üket pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1+UAS2)-nek és pJDB207/PAPFL-HIR(UAS1+UAS2)-nek nevezzük el.

6. példa

Egy 31 bázispárnyi DNS-szekvencia hatékony mint foszfatáz szabályozó alkotórész

A PH05 promoter upstream régiójának egy 31 bázispárnyi szekvenciája (a –381. – –351.), amelyet a közrefogó Δ10 és Δ13 deléciók határoznak meg (vö. 1. f/ példa) tartalmazhat egy szabályozó szignált. Ezt meg lehet vizsgálni úgy, hogy a következő két komplementer oligonukleotidot állítjuk elő kémiai úton:

5' –AATTCGAAATATATATATAAATTAG–
CACGTTTTCGCAG–3'
3' –GCTTTATATATAATTTAATCGTGCAAA–
AGCGTCTTAA–5'

Ez a szekvencia tartalmazza az EcoRI hasítóhelyek által körülvevett 31 bázispárnyi szekvenciát. Az EcoRI-helyek megkönnyítik a szekvencia polimerizálását multimerek képzésére.

a) A 31 bázispárnyi alkotórész klónozása az LT98 vektorba

A két szintetikus oligonukleotid 50–50 pmól-ját kinázzal kezeljük 20 ml triszben (pH=7,5), 10 mM magnézium-klorid, 5 mM DTT, 0,5 mM ATP és 20 egység T4 polinukleotid-kináz (Boehringer gyártmány) jelenlétében. 37 °C-on végzett 45 perces reakció után a két reakcióelegyet egyesítjük, 10 percig 75 °C-ra melegítjük és hagyjuk szobahőmérsékletre hűlni. A hőkezelt oligonukleotidokat –20 °C-on tároljuk. A kinázzal és hővel kezelt oligonukleotidok 7,5 pmól-ját 30 percig ligáljuk a fent leírt módon (5. III. példa) 15 µl teljes térfogatban. Ezután hozzáadunk 5 µl (0,075 pmól) EcoRI-gyel hasított LT98 vektor DNS-t [Dixon és munkatársai: Gene, 25, 198, (1983)] és az inkubálást folytatjuk, összesen 6 óráig. Az E. coli HB101-be való transzformálás után a plazmidokat elkülönítjük és

BamHI-gyel végzett emésztéssel elemezzük. Az elemzés adatokat szolgáltat a beékelt rész teljes hosszáról és lehetővé teszi a klónozott EcoRI fragmentumok származnak megbecsülését. 1, 2, 3, 4 vagy 5 EcoRI fragmentumot tartalmazó egyedi plazmidokat választunk ki és DNS-szekvenálásuk (Sanger-módszer) azt mutatja, hogy a 31 bázispárnyi alkotórészek „fejtől farokig” orientációban klónozódnak.

b) Klónozás pJDB207-be

A 31 bázispárnyi oligomerek promoter szabályozó funkcióját úgy vizsgáljuk meg, hogy beékeljük őket a GAPDH promoter F alkotórésztől „felfelé”. A pJDB207/PAPFL-EGL(UAS1) plazmidot rövidítjük egy olyan plazmid előállítására, amelyből az UAS1 alkotórész hiányzik; a plazmidot SallI és BglII alkalmazásával emésztjük, gélen tisztítjuk és elkülönítjük a nagy vektor fragmentumot. Egy független reakcióelegyben ugyanezt a plazmidot BamHI alkalmazásával emésztjük. A 3' recesszált végeket Klenow DNS-polimerázzal töltjük ki, mind a négy dNTP-t használva. A tompavégű helyeket foszforilezett BglII-kapcsolókkal (CAGATCTG, Biolabs gyártmány) megtoldjuk és SallI és BglII alkalmazásával végzett emésztés után egy körülbelül 400 bázispárnyi DNS-fragmentumot különítünk el gélen tisztítva. A nagy vektor fragmentumot a körülbelül 400 bázispárnyi SallI-BglII fragmentumhoz ligáljuk T4 DNS-ligáz alkalmazásával. Az E. coli HB101-be végrehajtott transzformáció és plazmid elkülönítés után egy olyan plazmidot kapunk, amelyben nincs PH05 UAS. Ezt a plazmidot pJDB207/GAPFL-EGL-nek nevezzük. A plazmidot BglII-vel emésztjük és vektorként szolgál a 31 bázispárnyi oligomerek klónozásához. Az 1, 2, 3, 4 vagy 5 beékelt oligonukleotid részt tartalmazó LT98-at BamHI-gyel emésztjük. A különböző méretű fragmentumokat gélen végzett tisztítással különítjük el és egymástól függetlenül ligáljuk a BglII-vel hasított pJDB207/GAPFL-EGL-hez. A ligálási elegyet BglII-vel emésztjük a nem kívánt újraligált vektor eltávolítására, amelyben nincs beékelt DNS, majd E. coli HB101 transzformálására használjuk. A kapott plazmidokat restriktív elemzéssel vizsgáljuk SallI és DraI (egy a GAPDH promoter részen belüli hely) alkalmazásával. A GRF18 emésztőtörzs transzformálása után ez eglin C titereket a 4. c) példában leírt módon határozzuk meg. 46 óra fermentálás után a következő specifikus aktivitásokat mértük:

pJDB207/klón	a 31 bázispárnyi beékelt részek	orientáció ^a	eglin C titer (mg/l optikai sűrűség)	
			alacsony P _i	magas P _i
PAPFLI (+)-EGL	1	→	9,2	5,2
PAPFLI (-)-EGL	1	←	10,2	2,1
PAPFLII (+)-EGL	2	→	10,2	3,5

pJDB207/klón	a 31 bázispárnyi beékelt részek	orientáció ^a	eglin C titer (mg/l optikai sűrűség)	
			alacsony P _i	magas P _i
5 PAPFLIII (-)-EGL	3	←	11,2	1,4
PAPFLIV (+)-EGL	4	→	10,7	1,5
10 PAPFLV (-)-EGL	5	←	12,6	1,4

^a→ jelentése ugyanaz az orientáció, mint a PH05 promoterben

← jelentése ellentétes orientáció, mint a PH05 promoterben

7. példa

20 *Inzulinszerű növekedési faktor (IGF-1) expressziója egy PAPFL promoterből*

A 123 228. számú európai szabadalmi bejelentésben leírt pAB113-IGF-1 plazmidot PstI alkalmazásával emésztjük. Két szintetikus oligonukleotidot (50 pmól) készítünk, amelyek képlete a következő:

AATTCATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCA
GTACTCTAAAGGAAGTTAAAAATG

30 és mindkettőt kinázzal és hővel kezeljük a fent leírt módon. A hőkezelt kétfonalas adaptert a PstI-gyel hasított plazmidhoz ligáljuk, EcoRI és BamHI alkalmazásával emésztjük és a körülbelül 800 bázispárnyi EcoRI-BamHI fragmentumot gélen végzett tisztítással elkülönítjük. A pJDB207/PAPFL-EGL(UAS1) plazmidot SallI és EcoRI alkalmazásával emésztjük és a körülbelül 700 bázispárnyi fragmentumot gélen végzett tisztítással elkülönítjük. Egy hármas ligálásban a pCI/1 plazmid (123 228. számú európai szabadalmi bejelentés; BamHI-gyel és SallI-gyel emésztve, a vektor gélen tisztítva) 0,5 µg-ját a két kisebb gén és promoter rész 100–100 ng-jához ligáljuk. E. coli-ba végzett transzformálás után a plazmidokat EcoRI, BamHI és SallI felhasználásával emésztéssel elemezzük. Az AB103 élesztőtörzs transzformálása [az ATCC-ben 20 673-as számon deponálva; a pYIGF-1-10/1 rosszabb változata, élesztősejteknek komplex közegben egy éjszakán át végzett tenyésztésével, az egyes telepek megvizsgálásával az IGF-1 plazmid jelenlétére, a Hinne és munkatársai által leírt telephibridizálással (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978))] olyan transzformánsokat eredményez, amelyek csak indukált (alacsony P_i) körülmények között (1 mg/l) termelnek IGF-1-et; ennek meghatározását szokásos kompetitív radioimmunoassay-vel végezzük, radioaktív izotóppal jelzett IGF-1-et [Anderson és munkatársai: Somatomedins/Insulin-Like Growth Factors, Spencer, E. M. kiadó Walter de Gruyter, Berlin] használva. A klónokat pCI/1/PAPFL-IGF-1(UAS1)-nek nevezzük.

8. példa

Szöveti plazminogén aktivátor (t-PA) expressziója egy PH05-GAPDH hibrid promoter szabályozása alatt (10. ábra)

12 µg pJDB207/PH05-TPA18 plazmidot (143 081. számú európai szabadalmi bejelentés) teljesen emésztünk Sall és HindIII restrikciós endonukleázokkal. a kapott 2 DNS-fragmentumot 0,8%-os agaróz gélen, 8,3 pH-jú trisz-borát-EDTA pufferben választjuk szét. A kis, 2,6 kilobázisnyi Sall-HindIII fragmentumot elektromos eluálással, fenolos extrakcióval és etanolos kicsapással különítjük el. A DNS-t Ball-gyél tovább emésztjük. Az 1,8 kilobázisnyi fragmentumot a PH05 jelzőszekvencia egy részével, a t-PA kódoló szekvenciájával és a PH05 terminátorral a fent leírt módon elkülönítjük és tisztítjuk, és vízben újra szuszpendáljuk 0,1 pmól/µl koncentrációban.

A hibrid promoter fragmentumot elkülönítjük a pJDB207/PAPFL-HIR UAS1+UAS2 plazmidból (vö. 5. V. példa). A plazmid DNS 12 µg-ját Sall és HindIII alkalmazásával emésztjük. A kapott 1, kilobázisnyi fragmentumokat Ball-gyél tovább emésztjük. Egy 920 bázispárnyi, a hibrid promotert és a PH05 jelzőszekvencia egy részét tartalmazó fragmentumot 1,5%-os agaróz gélen különítünk el. A DNS-t elektromosan eluáljuk, fenollal extraháljuk, etanollal kicsapjuk és vízben újra szuszpendáljuk 0,1 pmól/µl koncentrációban.

A 920 bázispárnyi Sall-Ball fragmentum 0,2 pmól-ját, az 1,8 kilobázisnyi Ball-HindIII fragmentum 0,2 pmól-ját és az Sall-gyél HindIII-mal hasított pJDB207 vektor 0,1 pmól-ját 16 órát ligáljuk 15 °C-on, 10 µl teljes térfogatban. A ligálási elegy egy 1 µl-es alikvot részét hozzáadjuk 100 µl-nyi, kalciummal kezelt, transzformálásra alkalmas E. coli HB101 sejtekhez.

12 transzformált, amp^R telepet tenyésztünk külön-külön 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB közegen. A plazmid DNS-t Holmes és munkatársai módszerével [Anal. Biochem., 114, 193, (1981)] állítjuk elő és a PstI-gyél és BamHI/EcoRI-gyél kapott restrikciós emésztési termékeken keresztül elemezzük. Izolálunk egy klónt, amely tartalmazza a várt restrikciós fragmentumokat, és pJDB207/PAPFL-TPA(UAS1+UAS2)-nek nevezzük el.

Analóg módon járunk el az UAS1(PH05) alkotórész vonatkozásában; a pJDB207/PAPFL-HIR(UAS1) (5. IV. példa) egy 820 bázispárnyi Sall-Ball fragmentumát elkülönítjük és az 1,8 bázispárnyi Ball-HindIII fragmentumhoz és az Sall-gyél és HindIII-mal hasított vektorhoz ligáljuk. A kapott plazmidot pJDB207/PAPFL-TPA(UAS1)-nek nevezzük.

Analóg módon járunk el a megfelelő, pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1)-ből vagy pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1+UAS2)-ből (5. példa) származó fragmentumokkal is. A kapott plazmidokat pJDB207/PAPEL-TPA(UAS1)-nek, illetve pJDB207/PAPEL-TPA(UAS1+UAS2)-nek nevezzük.

9. példa

Polipeptidok expressziója PH05-GAPDH hibrid promoterek szabályozása alatt

a) *Saccharomyces cerevisiae* GRF18 transzformálása
Saccharomyces cerevisiae GRF18 törzset (alfa,

his3-11, his3-15, lue2-3, lue2-112, can^R) transzformálunk a következő plazmidokkal:

- 5 pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1)
pJDB207/PAPFL-HIR(UAS1)
pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1+UAS2)
pJDB207/PAPFL-HIR(UAS1+UAS2)
10 pJDB207/PAPFLI(+)-EGL
pJDB207/PAPFLI(-)-EGL
pJDB207/PAPFLII(+)-EGL
pJDB207/PAPFLII(-)-EGL
pJDB207/PAPFLIV(+)-EGL
pJDB207/PAPFLY(-)-EGL
pJDB207/PAPEL-TPA(UAS1)
pJDB207/PAPFL-TPA(UAS1)
15 pJDB207/PAPEL-TPA(UAS1+UAS2)
pJDB207/PAPFL-TPA(UAS1+UAS2)
pCI1/PAPFL-IGF-I(UAS1)
a Hinnen és munkatársai által leírt előíratot [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929, (1978)] alkalmazva.
20 A transzformált élesztősejteket leucinhiányos élesztő minimum tápközeg lemezekben választjuk szét. Egyes transzformált élesztőtelepeket kiválasztunk és a következőképpen nevezzük el azokat:
25 *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1)
Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPFL-HIR(UAS1)
Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1+UAS2)
30 *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207/PAPFL-HIR(UAS1+UAS2)
Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPFLI(+)-EGL
Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPFLI(-)-EGL
35 *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207/PAPFLII(+)-EGL
Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPFLII(-)-EGL
40 *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207/PAPFLIV(+)-EGL
Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPFLIV(-)-EGL
45 *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207/PAPEL-TPA(UAS1)
Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB206/PAPFL-TPA(UAS1)
50 *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207/PAPEL-TPA(UAS1+UAS2)
Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPFL-TPA(UAS1+UAS2)
55 *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pCI1/PAPFL-IGF-I(UAS1)

b) *A transzformánsok fermentálása*

S. cerevisiae GRF18 transzformánsok sejtjeit külön-külön 10 ml élesztő minimum tápközegben (Difco Yeast Minimum Base – aminosavak nélkül –, amelyhez 2%

glükózt és 20 mg/l L-hisztidint adtunk) tenyésztjük 50 ml-es Erlenmeyer-lombikban rázatás közben 30 °C-on 24 órát 3×10^7 sejt/ml sűrűségig. A sejteket 0,9%-os nátrium-klorid oldattal mossuk és egy olyan alacsony P_i minimum tápközeg 50 ml-ének inokulálására használjuk, amelyet a Difco Yeast Nitrogen Base tápközeg receptje szerint készítettünk (aminosavak nélkül), de 0,03 g/l kálium-dihidrogén-foszfátot, 1 g/l kálium-kloridot és ammónium-szulfát helyett 10 g/l L-aszparagint tartalmaz, továbbá 2% glükózt és 1 g/l L-hisztidint. A tenyészeteket 4×10^6 sejt/ml sejtsűrűségig inokuláljuk és 30 °C-on keverjük 200 fordulat/perc sebességgel 42 órát.

c) Az expresszált géntermék titere

Az élesztő a deszulfátóhirudin vegyületeket a tápközegbe választja ki. 22 óra fermentálás után 10 ml-es mintát veszünk a tápközegből és proteinben dúsítjuk kisózással és Bond Elut C-18 oszlopon (1 ml, Analytichem International gyártmány) végzett töményítéssel. Az oszlopot kétszer mossuk víz és acetonitril 9:1 arányú elegyével, amely 0,1% trifluor-ecetsavat is tartalmaz. A deszulfátóhirudin vegyületeket az oszlopról víz és acetonitril 6:4 térfogatarányú, 0,1% trifluor-ecetsavat is tartalmazó elegyével eluáljuk. 2 ml eluátumot Speed Vac koncentrátorban (Savant gyártmány) 400 µl végső térfogatra sűrítünk. A deszulfátóhirudint HPLC elemzéssel azonosítjuk, hiteles deszulfátóhirudinnal összehasonlítva és trombin inhibíciós vizsgálat [vö. Bergmeyer, M.U. szerkesztése: Methods in Enzymatic Analysis, II. kötet, 314-316, Verlag Chemie, Weinheim, Német Szövetségi Köztársaság, (1983)] alkalmazásával.

Az eredmények az 1. táblázatban láthatók.

1. táblázat

Különböző plazmidokkal transzformált *S. cerevisiae* GRF18 törzs deszulfátóhirudin kiválasztása a tápközegbe

plazmid	deszulfátóhirudin (mg/l tápközeg/600 nm-en mért optikai sűrűség)
pJDB207/PAPEL-HIR (UAS1)	2,0
pJDB207/PAPFL-HIR (UAS1)	2,2
pJDB207/PAPFL-HIR (UAS1 + UAS2)	3,0
pJDB207/PAPEL-HIR (UAS1 + UAS2)	2,8

A szöveti plazminogén aktivátor (t-PA) felhalmozódik az élesztősejtekben. Sejtextraktumokat készítünk és meghatározzuk a t-PA aktivitást a következőképpen: 35 ml alacsony P_i tápközeg [Meyhack, B. és munkatársai: EMBO-J., 1, 675, (1982)] sejtjeit (sejtsűrűség $1-2 \times 10^7$ ml) Sorval SS34 rotorban 3000 fordulat/perc sebességgel 10 percig végzett centrifugálással összegyűjtjük. A sejteket a tápközeg sókomponenseit tartalmazó pufferben (azaz aminosavak, glükóz, vitaminok,

nyomelemek nélkül) mossuk. A sejteket szobahőmérsékleten centrifugáljuk 5 percig, 3000 fordulat/perc sebességgel. A kiülepedett sejteket újra szuszpendáljuk 4 ml hideg 66 mM nátrium-foszfát puffer (pH=7,4) és 0,1 térfogat% Triton X-100 teljes térfogatában. A sejtszuspenziót átvisszük egy 30 ml-es Corex csőbe, hozzáadunk 8 g 0,4 mm átmérőjű üvegyöngyöt és Vortex Mixer-en (Scientific Instruments Inc., USA, gyártmány) rázatjuk teljes sebességgel 4 percig, majd jeges fűrdőben lehűtjük. Ezzel az eljárással a sejtek több mint 90%-át elroncsoljuk. A sejttermelékeket és az üvegyöngyöket Sorvall HB-4 rotorban 10 percig 8000 fordulat/perc sebességgel 4 °C-on végzett centrifugálással kiüleptjük. A felülúszót Eppendorf-csővekbe tesszük át, folyékony nitrogénben megfagyasztjuk és -60 °C-on tároljuk. A t-PA aktivitást Ranby kicsit módosított módszere szerint [Biochim. Biophys. Acta, 704, 461, (1982)] határozzuk meg. Szubsztrátként D-Val-Leu-Lys-pNA-t (Kabi S-2251) használunk. A 405 nm-en mért abszorpciót korrigáljuk a nem specifikus hasítás miatt és egy urokináz standard-hoz viszonyítjuk. Az eredmények a 2. táblázatban láthatók.

2. táblázat

Különböző plazmidokkal transzformált *S. cerevisiae* GRF18 törzs t-PA aktivitása

plazmid	t-PA aktivitás (nemzetközi egység/l élesztősejt/600 nm-en mért optikai sűrűség)
pJDB207/PAPFL-TPA UAS1	300
pJDB207/PAPFL-TPA UAS1 + UAS2	200

10. példa

IGF-1 elkülönítése és jellemzése transzformált élesztőtörzsből

a) IGF-1 elkülönítése a tápközegből

pCI/PAPFL-IGF-1 (UAS1) élesztőtörzset 60 órát tenyésztünk. 3 l tápközegbe kiveszünk és a 9. példában leírt módon centrifugáljuk. 2 ml felülúszót (1:10 koncentráció) reverz fázisú HPLC-vel vizsgálva 1 mg/l IGF-1 titert kapunk. A felülúszót pH=3,0-nál 20 ml SP-Sephadex C-25-tel (Pharmacia gyártmány) kezeljük és 60 percig keverjük 4 °C-on. Az abszorbeált IGF-1-et a mosott gyantáról nátrium-acetát puffer gradienssel (50 mM, pH=3,0-6,0) eluáljuk és két lépésben végzett ioncserével tisztítjuk; az első lépést egy CM-52 oszlopon hajtjuk végre (Whatman gyártmány, 1,5 cm×8,5 cm, gradiens. A puffer 20 mM-os, 4,0 pH-jú ammónium-acetát, B puffer 100 mM-os, 6,8 pH-jú ammónium-acetát). A második lépést egy DE-53 anioncserélő oszlopon (Whatman gyártmány) végezzük (körülmények: 1,5 cm×10,5 cm-es oszlop, áramlási sebesség 1 ml/perc, gradiens, A puffer 20 mM-os, 9,0 pH-jú ammónium-acetát, B puffer 200 mM-os, 6,5 pH-jú ammónium-acetát). A végső tisztítást egy szemipreparatív RP-HPLC oszlopon végezzük. Az ak-

tív frakció 21,3 perces retenciós idővel eluálódik, és 1,1 mg 95%-os tisztaságú IGF-1-et eredményez.

Kísérleti körülmények: Vydac 218 TP 510 RP-HPLC oszlop, 10x250 mm-es; elválasztásonként aliquot részek (200 µl 1:10-re besűrítve); AUFS 0,5 200 nm-nél; áramlási sebesség: 3 ml/perc. Eluálószer: A – 0,1% trifluor-ecetsav, B – acetonitril és víz 8:2 arányú elegye + 0,07% trifluor-ecetsav; 3 percig a B részaránya 35%, majd 30 perc alatt 45%-ra növeljük. A kapott frakciókat vízzel hígítjuk 1:1 arányban és liofilizáljuk.

b) A pCIV/PAPFL-IGF-1(UAS1) törzs fermentációjából nyert IGF-1 jellemzése

RP-HPLC elemzés szerint a tápközegből ekülönített IGF-1 [vö. 10. a) példa] azonos a hiteles, szérumból nyert IGF-1-gyel.

Izoelektromos pont: pI=8,6 (izoelektromos fókuszálás, a protein TCA-val végzett kicsapása).

Az aminosavösszetétel meghatározása

A tiszta IGF-1 körülbelül 2,5 µg-ját 24 órát hidrolizáljuk 6 n sósavoldattal 110 °C-on, majd a Chang és munkatársai által leírt módszerrel [DABS-Cl módszer:

Eredmények:

Ciklus	1	5	10
Aminosav	Gly-Pro-Glu-Thr-Leu-Cys*-Gly-Ala-Glu-Leu-		
Ciklus	11	15	20
Aminosav	Val-Asp-Ala-Leu-Gln-Phe-Val-Cys*-Gly-Asp-		
Ciklus	21	25	30
Aminosav	Arg-Gly-Phe-Tyr-Phe-Asn-Lys-Pro-Thr-Gly-		
Ciklus	31	35	40
Aminosav	Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-		
Ciklus	41	45	50
Aminosav	Thr-Gly-Ile-Val-Asp-Glu-n.d.-n.d.-Phe-Arg-		

n.d. jelentése: nem határoztuk meg

* jelentése: a Cys(6)-ot és Cys(18)-at külön határozzuk meg jó-d-acetammiddal végzett karboximetilézéssel.

A részleges szekvencia az 1. aminosavtól az 50-ig ennek alapján azonos a hiteles IGF-1 közzétett primer szekvenciájával.

C-terminális elemzés

A tiszta IGF-1-et Y-karboxipeptidázzal emésztjük és a felszabadult aminosavakat aminosav analízátorral határozzuk meg [vö. Chang, J.Y., Knedel, R., Braun, D.G.: Biochem. J., 199, 547].

Eredmények:

aminosav	70
5 perces emésztés:	-Ala
120 perces emésztés:	Ser-Ala

Látszólagos molekulatömeg

30 µg IGF-1-et SDS karbamid gélen SUDS-gél; [vö. Kyte és munkatársai: Anal. Biochem., 133, 515, (1983)] elemzünk. Egy sávot észlelünk, amely 6000–7000 Dalton látszólagos molekulatömegnek felel meg.

Methods in Enzymology, 91, 41, (1983)] elemezzük. A hidrolizátum összetétele a következő:

	Aminosav	Hidrolizátum	Aminosav	Hidrolizátum
5	Asp	5,7 (5)	Ile	0,7 (1)
	Thr	3,2 (3)	Leu	5,9 (6)
	Ser	5,2 (5)	Tyr	2,8 (3)
10	Glu	6,5 (6)	Phe	3,9 (4)
	Pro	5,3 (5)	His	–
	Gly	7,2 (7)	Lys	3,0 (3)
	Ala	6,1 (6)	Arg	6,0 (6)
15	Val	2,7 (3)	Met	0,9 (1)
	Cisztin	2,2 (3)	összes	(70)

Részletes szekvenciaelemzés

A tiszta IGF-1 70 µg-ját (10 nmól) szokásos szekvenciaelemzésnek vetjük alá Edman módszere szerint. Az N-terminális PTH-aminosavakat RP-HPLC segítségével határozzuk meg.

Molekulatömeg meghatározása FAB-MS-sel

Az IGF1-et gyors atom bombázásos pozitív ion tömegspektrometriának (FAB-MS) vetjük alá. Készülék: ZAB-HF tömegspektrométer a VG-Analytical Ltd-től (Manchester); mátrix: tioglicerin; bombázás xenonnal; ionenergia 3 keV; külső kalibrálás Cs₃₀J₂₉-el (molekulatömege 7667,4).

tapasztalati képlet	C ₃₃₁ H ₅₁₈ N ₉₄ O ₁₀₁ S ₇
molekulatömeg (számított)	7648,71
molekulatömeg (talált)	7648,07

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás UAS1 (PHO5) és/vagy UAS2 (PHO5) szekvenciákat tartalmazó DNS-fragmentumok és szubfragmentumaik előállítására, amelyekben az UAS funkció megmarad, *azzal jellemezve, hogy egy PHO5-gént tartalmazó DNS-t, vagy a PHO5-gént vagy annak 5'-terminális részét megfelelő restrikciós endonukleázokkal hasítunk és adott esetben a fragmentumokat egy*

exonukleázzal rövidítjük, majd az így kapott fragmentumok közül kiválogatjuk azokat, amelyeknek UAS-funkciója megmaradt, és a fragmentumokat vagy szubfragmentumokat elkülönítjük, vagy a fenti DNS-fragmentumokat vagy szubfragmentumokat kémiai DNS-szintézissel állítjuk elő.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás UAS1 (PH05) és UAS2 (PH05) szekvenciákat tartalmazó fragmentum előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a PH05-gént tartalmazó DNS-t, a PH05-gént vagy annak 5'-terminális részét a BamHI és BstII restrikciós endonukleázokkal hasítjuk, majd a 368 bázispárnyi fragmentumot elkülönítjük.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás UAS1 (PH05)-öt tartalmazó fragmentum előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a PH05-gént tartalmazó DNS-t, a PH05-gént vagy annak 5'-terminális részét BamHI és ClaI restrikciós endonukleázzal hasítjuk, majd a 268 bázispárnyi fragmentumot elkülönítjük.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy

GAAATATATATTAAATTAGCACGTTTTTCGCA
CTTTATATATAATTTAATCGTGCAAAAAGCGT

szekvenciájú DNS-t kémiai DNS-szintézissel állítjuk elő és adott esetben az előállított DNS-t szintetikus kapcsoló szekvenciákkal látjuk el.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás UAS2 (PH05)-t tartalmazó fragmentum előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a PH05-gént tartalmazó DNS-t vagy annak 5'-terminális részét ClaI és BstEII restrikciós endonukleázzal hasítjuk, majd a 100 bázispárnyi fragmentumokat elkülönítjük.

6. Eljárás élesztő hibrid-promoter előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, az élesztő PH05 gén UAS1 és/vagy UAS2 szekvenciáját tartalmazó 5' irányban elhelyezkedő upstream promoter egységet, egy PH05-től különböző élesztő gén 3' irányban elhelyezkedő, működőképes TATA-boxot tartalmazó, és a translációs start-kódon közelében végződő downstream-promoter egységéhez kapcsolunk.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az élesztő PH05-gén UAS1 és/vagy UAS2 szekvenciáját tartalmazó, 5' irányban elhelyezkedő, upstream promoter egységet az élesztő GAPDH gén 3' irányban elhelyezkedő a GAPDH gén -300. és -180. nukleotidja között kezdődő és a -1. nukleotidjánál végződő downstream promoter egységhez kapcsoljuk.

8. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 5' irányban elhelyezkedő, upstream promoter egységként az élesztő PH05 gén 5' régiójának 368 bázispár hosszúságú BAMHI-BSTEII fragmentumát alkalmazzuk.

9. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 5' irányban elhelyezkedő, upstream promoter egységként az élesztő PH05 gén 5' régiójának 268 bázispár hosszúságú BamHI-ClaI fragmentumát alkalmazzuk.

10. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 5' irányban elhelyezkedő, upstream promoter egységként az élesztő PH05 gén 5' régiójának 100

bázispár hosszúságú ClaI-BsteII fragmentumát alkalmazzuk.

11. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 5' irányban elhelyezkedő, upstream promoter egységként az alább megadott szekvenciájú, 31 bázispáros DNS-fragmentumot alkalmazzuk:

GAAATATATATTAAATTAGCACGTTTTTCGCA
CTTTATATATAATTTAATCGTGCAAAAAGCGT

12. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 5' irányban elhelyezkedő, upstream promoter egységként UAS1 (PH05) és UAS2 (PH05) szekvenciákat tartalmazót alkalmazzunk.

13. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 5' irányban elhelyezkedő, upstream promoter egységként UAS1 (PH05) szekvenciát tartalmazót alkalmazzunk.

14. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 5' irányban elhelyezkedő, upstream promoter egységként az UAS2 (PH05) szekvenciát tartalmazót alkalmazzunk.

15. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 3' irányban elhelyezkedő, downstream promoter egységként valamely glikolitikus enzimet kódoló élesztő gén promoteréből származtathatót alkalmazzunk.

16. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 3' irányban elhelyezkedő, downstream promoter egységként az élesztő GAPDH gén promoteréből származtathatót alkalmazzunk.

17. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 3' irányban elhelyezkedő, downstream promoter egységként az élesztő GAPDH gén -199-től -1-ig terjedő nukleotidjainak szekvenciáját tartalmazót alkalmazzunk.

18. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 3' irányban elhelyezkedő, downstream promoter egységként az élesztő GAPDH gén -263-től -1-ig terjedő nukleotidjainak szekvenciáját tartalmazót alkalmazzunk.

19. Eljárás élesztő hibrid-vektor előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, a 6. igénypont szerint előállított hibrid-promotert upstream irányban egy élesztő számára heterológ polipeptidet kódoló DNS fragmentum elé kapcsolunk, és az ilymódon előállított DNS molekulák közül egyet vagy többet élesztő vektor DNS-be inszertálunk.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy, a 7. igénypont szerint előállított hibrid-promotert upstream irányban egy élesztő számára heterológ polipeptidet kódoló DNS-fragmentum elé kapcsolunk, és az ilymódon előállított DNS molekulák közül egyet vagy többet élesztő vektor DNS-be inszertálunk.

21. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hibrid-promoterként a 8-18. igénypontok bármelyike szerinti eljárás alapján előállított promotert alkalmazzunk.

22. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az élesztő vektor DNS-be 1-4 darab DNS-molekulát inszertálunk.

23. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az élesztő vektorba egy DNS molekulát inszertálunk.

24. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hibrid-plazmidot vagy pedig lineáris hibrid-vektort állítunk elő.

25. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy magasabbrendű eukariótából származtatható polipeptidet kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó hibrid-vektort állítunk elő.

26. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az élesztő hibrid-promotert közvetlenül az érett heterológ polipeptid kódoló régiójához kapcsoljuk, oly módon, hogy a kapcsolási helyre egy ATG kódot inszertálunk.

27. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szignál szekvenciát tartalmazó polipeptid kódoló DNS-fragmentumot alkalmazunk.

28. Eljárás transzformált élesztősejtek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az élesztősejteket a 19. igénypont szerint előállított hibrid-vektorral transzformáljuk.

29. A 28. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az élesztősejteket a 20. igénypont szerint előállított hibrid-vektorral transzformáljuk.

30. A 28. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az élesztősejteket a 21–27. igénypontok bármelyike szerinti eljárás alapján előállítható hibrid-vektorral transzformáljuk.

31. A 28. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy élesztő gazdaként valamely *Saccharomyces cerevisiae* törzset használunk.

32. Eljárás heterológ polipeptid előállítására élesztőben, *azzal jellemezve*, hogy a 28. igénypont szerint előállított élesztő sejteket tenyésztjük és az expresszált heterológ polipeptidet izoláljuk.

33. A 32. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a 29. igénypont szerint előállított élesztő sejteket tenyésztjük és az expresszált polipeptidet izoláljuk.

34. A 32. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az élesztő sejteket asszimilálható formában szén, nitrogén és szervetlen só forrásokat, valamint kívánt esetben egyéb növekedést elősegítő anyagokat is tartalmazó folyékony táptalajban tenyésztjük.

35. A 32. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a 25. igénypont szerint előállított vektorral transzformált élesztő sejteket tenyésztünk.

36. A 32. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy élesztő gazdaként valamely *Saccharomyces cerevisiae* törzset használunk.

37. A 32. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a 21–27. igénypontok bármelyike szerint előállított hibrid-vektorral transzformált élesztő sejteket tenyésztünk.

38. A 32. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a 28–31. igénypontok bármelyike szerint előállított transzformált gazdasejteket tenyésztünk.

1. ÁBRA

BamHI
 ↓
 GG

-540 -530 - 520 -510 -500
 ATCCGAAAGT TGTATTCAAC AAGAATGCGC AAATATGTCA ACGTATTTGG

-490 -480 -470 -460 -450
 AAGTCATCTT ATGTGCGCTG CTTTAAATGTT TTCTCATGTA AGCGGACGTC

-440 -430 -420 -410 -400
 GTCTATAAAC TTCAAACGAA GGTAAGAGGT TCATAGCGCT TTTTCTTTGT

-390 -380 -370 -360 -350
 CTGCACAAAG AAATATATAT TAAATTAGCA CGTTTTTCGCA TAGAACGCAA

-340 -330 -320 -310 -300
 CTGCACAATG CCAAAAAAAG TAAAAGTGAT TAAAAGAGTT AATTGAATAG

-290 -280 ClaI -270 -260 -250
 GCAATCTCTA AATGAATCGA TACAACCTTG GCACTCACAC GTGGGACTAG

-240 -230 -220 -210 -200
 CACAGACTAA ATTTATGATT CTGGTCCCTG TTTTCTGAAGA GATCGCACAT

-190 -180 BstEII-170 -160 -150
 GCCAAATTAT CAAATTTGGT ACCTTACTTG GCAAGGCATA TACCCATTTG

-140 -130 -120 -110 -100
 GGATAAGGGT AACATCTTT GAATTGTCGA AATGAAACGT ATATAAGCGC

-90 -80 -70 -60 -50
 TGATGTTTTG CIAAGTCGAG GTTAGTATGG CTTTATCTCT CATGAGAATA

-40 -30 -20 -10 -1 10
 AGAACAAACA CAAATAGAGC AAGCAAATTC GAGATTACCA ATGTTTAAAT

20 30 40 50 60

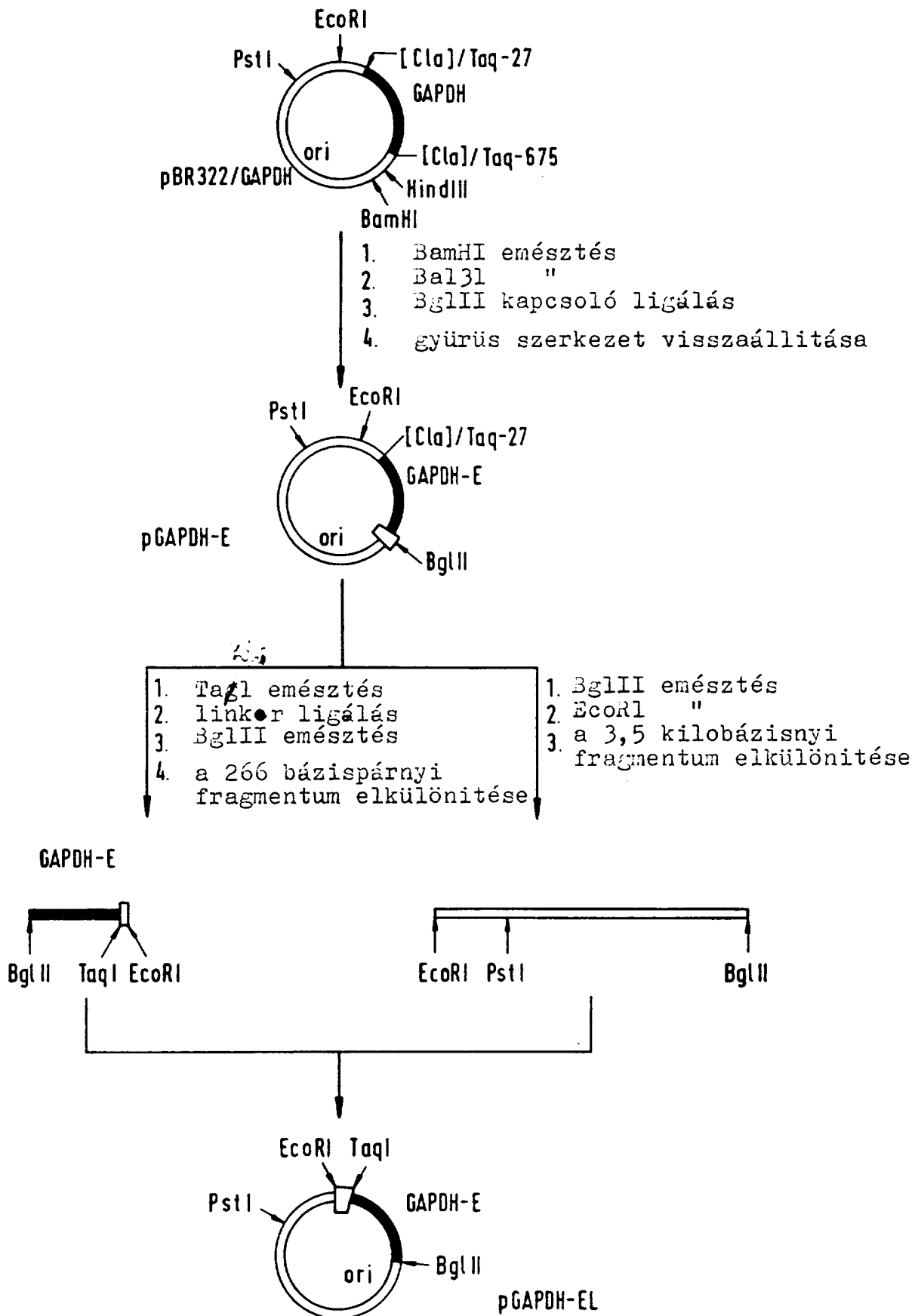
CTGTTGTTTA TTCAATTTTA GCCGCTTCTT TGGCCAATGC AGGIACCATT

70 80 SallI
 ↓
 CCCTTAGGCA AACTAGCCGA TGTCGAC

2. ÁBRA

TaqI -670 -660 -650 -640
TCGAGT TTATCATTAT CAATACTCGC CATTTC[!]CAAAG AATACGTAAA
-630 -620 -610 -600 -590
TAATTAATAG TAGTGATTTT CCTAACTTTA TTTAGTCAAA AAATTAGCCT
-580 -570 -560 -550 -540
TTTAATTCTG CTGTAACCCG TACATGCCAA AATAGGGGGC GGGTTACACA
-530 -520 -510 -500 -490
GAATATATAA CACTGATGGT GCTTGGGTGA ACAGGTTTAT TCCTGGCATC
-480 -470 -460 -450 -440
CACTAAATAT AATGGAGCCC GCTTTTTAAG CTGGCATCCA GAAAAAAAAA
-430 -420 -410 -400 -390
GAATCCCAGC ACCAAAATAT TGTTTTCTTC ACCAACCATC AGTTCATAGG
-380 -370 -360 -350 -340
TCCATTCTCT TAGCGCAACT ACAGAGAACA GGGCACAAAC AGGCAAAAAA
-330 -320 -310 -300 -290
CGGGCACAAAC CTCAATGGAG IGATGCAACC TGCCTGGAGT AAATGATGAC
-280 -270 -260 -250 -240
ACAAGGCAAT TGACCCACGC ATGTATCTAT CTCATTTTCT TACACCTTCT
-230 -220 -210 -200 -190
ATTACCTTCT GCTCTCTCTG ATTTGGAAAA AGCTGAAAAA AAAGGTTGAA
-180 -170 -160 -150 -140
ACCAGTCCC TGAAATTATT CCCCTACTTG ACTAATAAGT ATATAAAGAC
-130 -120 -110 -100 -90
GGTAGGTATT GATTGTAATT CTG[!]TAAATCT ATTTCTTAAA CTTC[!]TAAAT
-80 -70 -60 -50 DraI -40
TCTACTTTTA TAGTTAGTCT TTTTTT[!]TAGT TTT[!]AAAACAC CAAGA[!]ACTTA
-30 TaqI -20 -10 -1
GTTTCGAATA AACACACATA AATAAACAAA ATG

3. ÁBRA



4 . ÁBRA

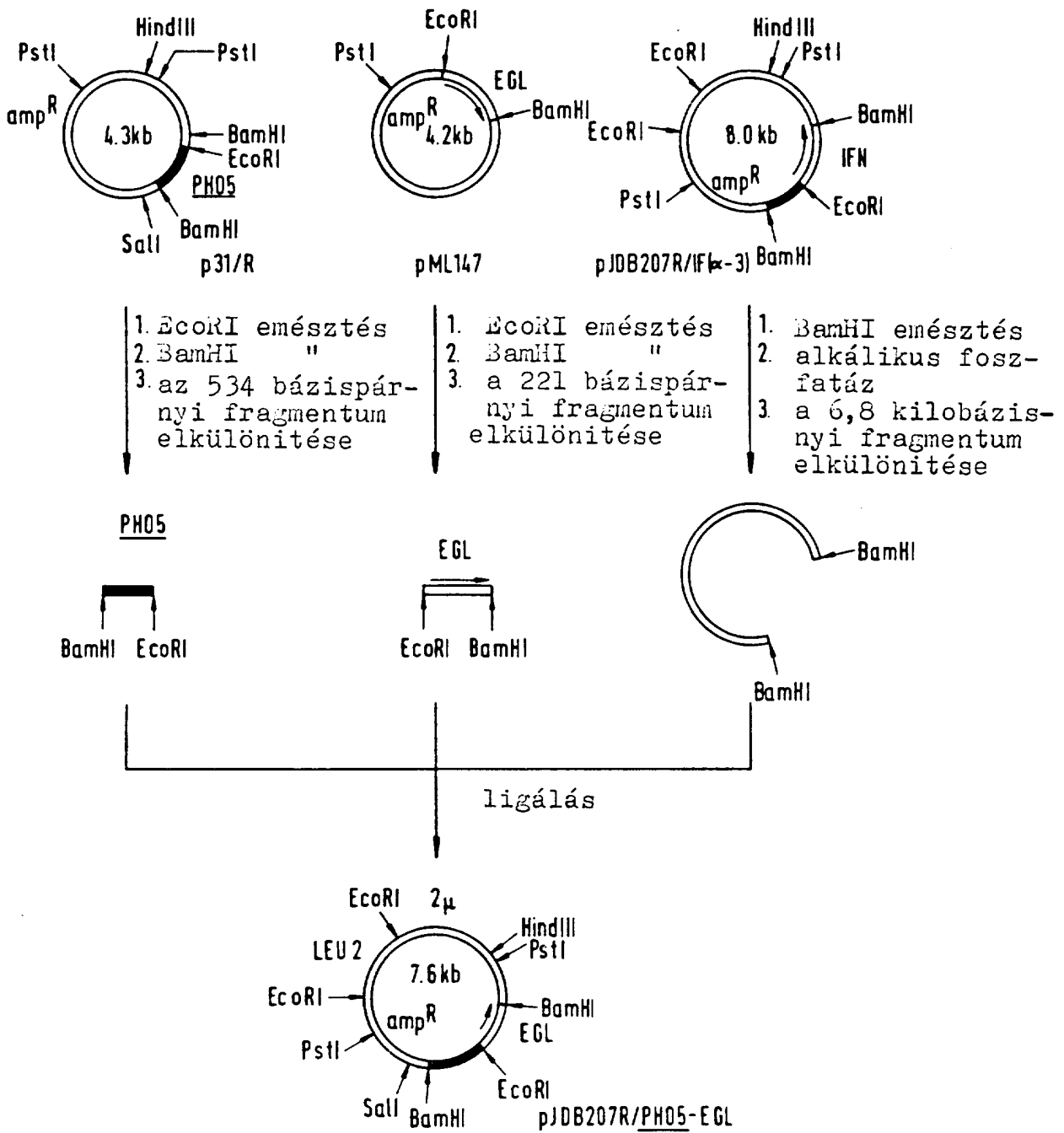
a. pGAPDH-FL

5'-GATC TGCTGAAAA AAAGTTGAA
ACCAGTCCC TGAAATTATT CCCCTACTTG ACTAATAAGT ATATAAAGAC
GGTAGGTATT GATTGTAATT CTGTAAATCT ATTTCTTAAA CTTCTTAAAT
TCTACTTTTA TAGTTAGTCT TTTTTTTAGT TTTAAAACAC CAAGAACTTA
GTTTCGAATA AACACACATA AATAAAG-3'

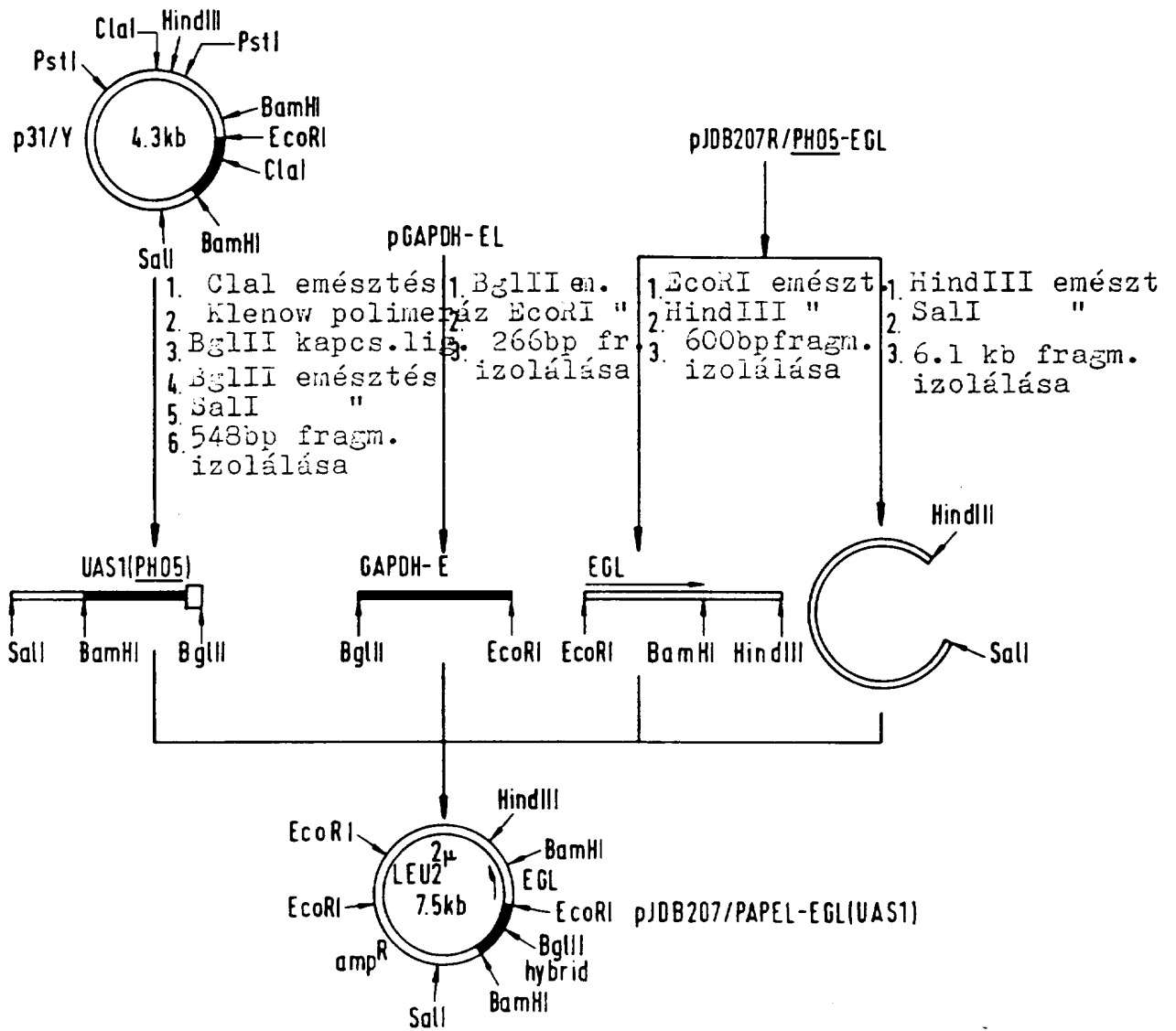
b. pGAPDH-EL

5'-GATCTGCGC ATGTATCTAT CTCATTTTCT TACACCTTCT
ATTACCTTCT GCTCTCTCTG ATTTGGAAAA AGCTGAAAA AAAGTTGAA
ACCAGTCCC TGAAATTATT CCCCTACTTG ACTAATAAGT ATATAAAGAC
GGTAGGTATT GATTGTAATT CTGTAAATCT ATTTCTTAAA CTTCTTAAAT
TCTACTTTTA TAGTTAGTCT TTTTTTTAGT TTTAAAACAC CAAGAACTTA
GTTTCGAATA AACACACATA AATAAAG-3'

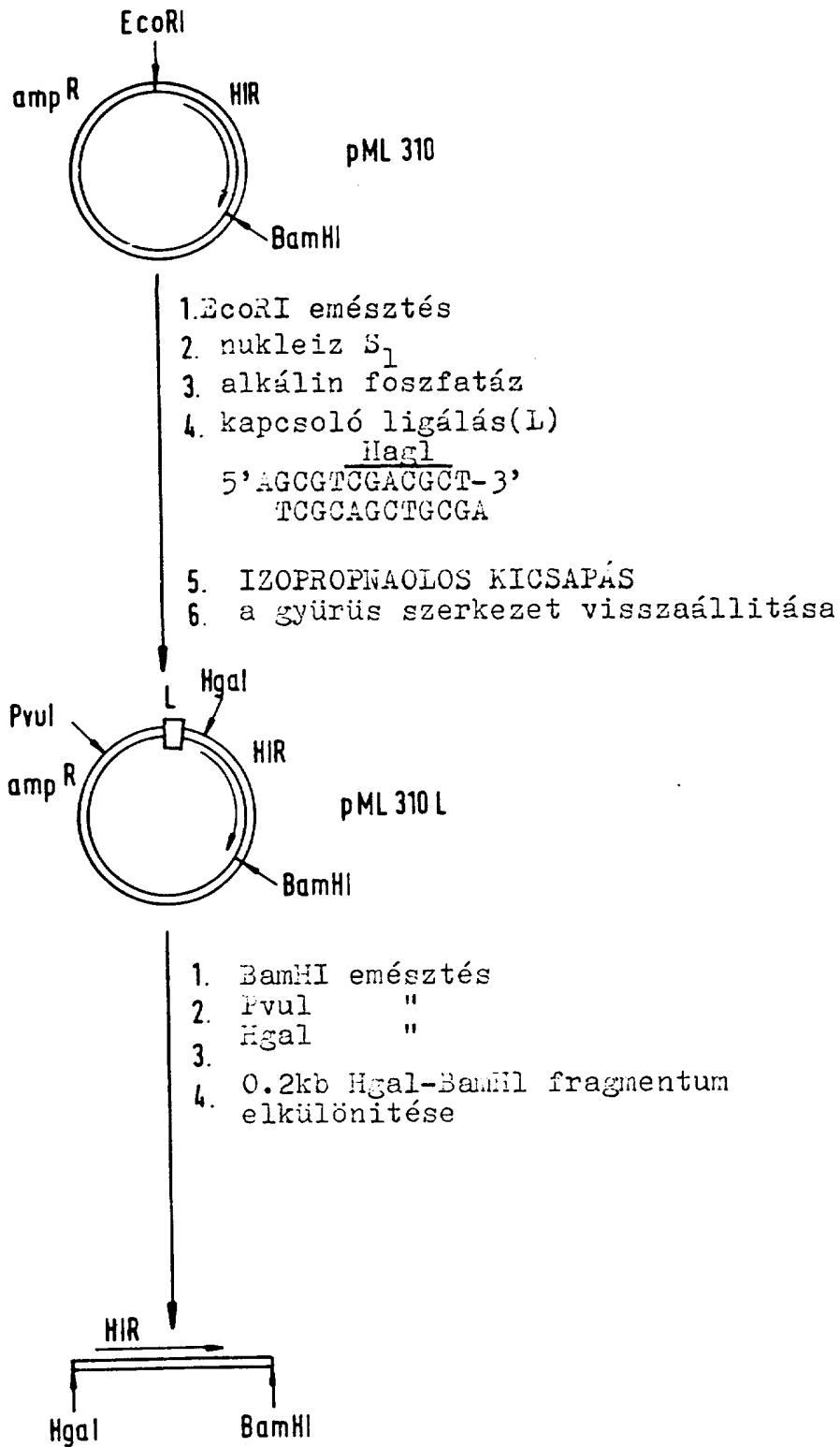
5. ÁBRA



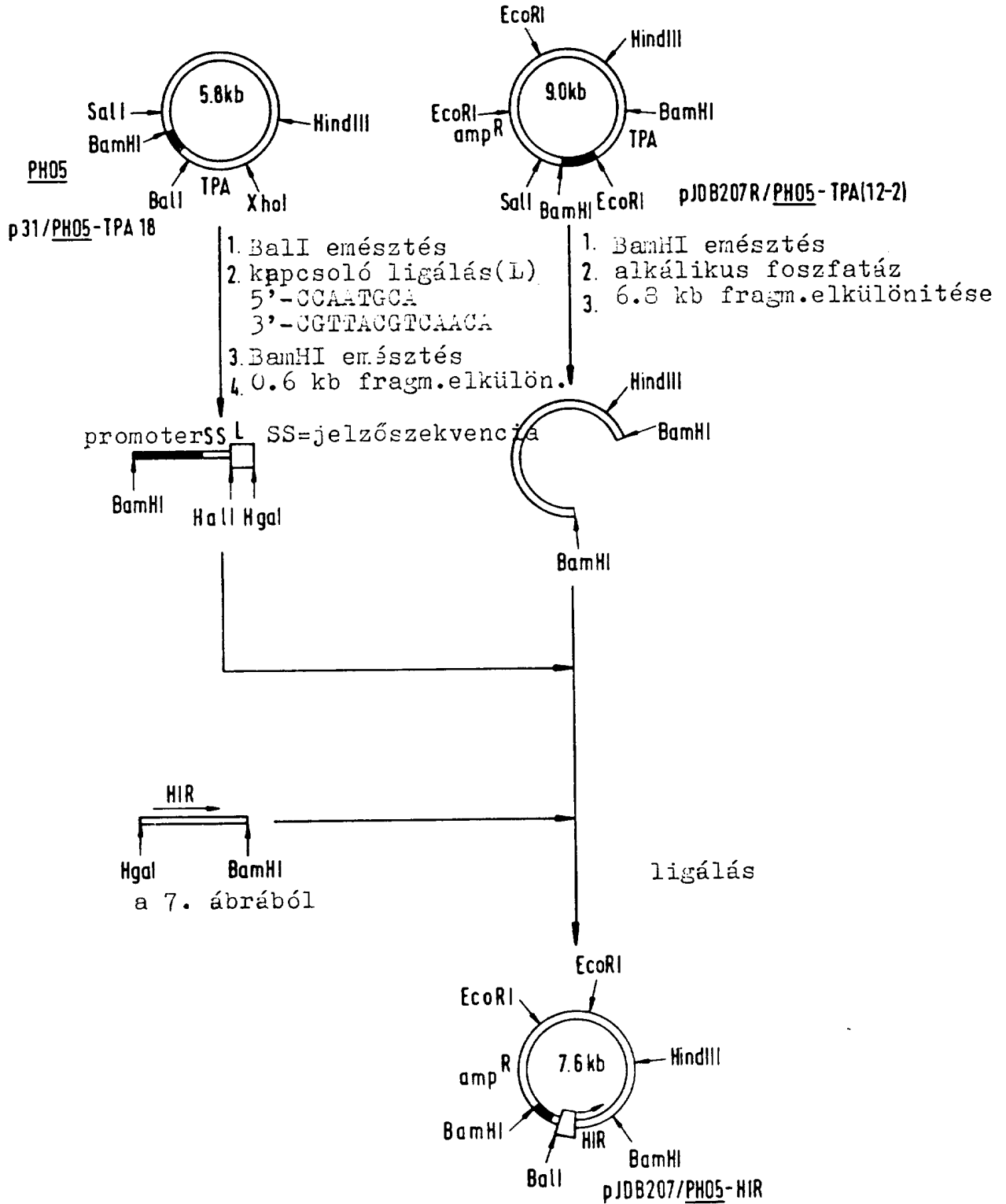
6. ÁBRA



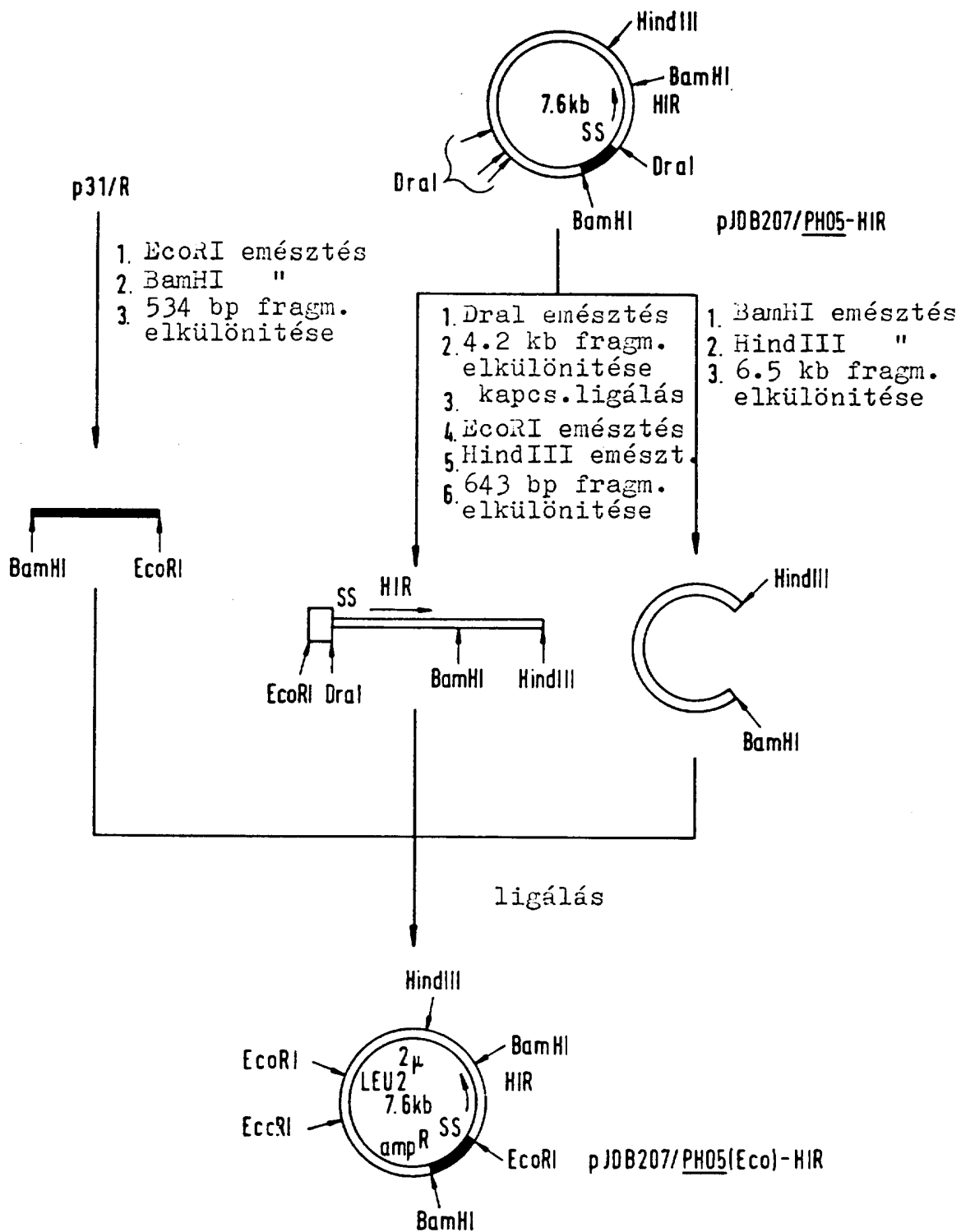
7. ÁBRA



8 . ÁBRA



9 . ÁBRA



10. ÁBRA

