(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 943739 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 943739

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification (IPC^6)
C12N 15/52
C12N 9/00
C12N 1/19
C12N 1/21
C12N 15/81
C12N 15/82
C12P 7/06
C12P 19/12
A01H 1/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **15.02.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **12.08.1994**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **14.10.1994**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **15.02.1993 PCT/FI1993/000049**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

14.02.1992 US 836021 P 28.02.1992 US 841997 P

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • BTG International Ltd, 10 Fleet Place, Limeburner Lane, LONDON EC4M 7SB, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Londesborough, John, Helsinki, SUOMI - FINLAND, (FI)
2 • Vuorio, Outi, Helsinki, SUOMI - FINLAND, (FI)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Seppo Laine Oy, PL 339, 00181 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Organismien transformointi trehaloosisyntaasin rakenteellisten geenien yhdistelmillä niiden trehaloosipitoisuuden lisäämiseksi

Ökning av trehaloshalterna hos organismer genom transformation av dem med kobinationer av de strukturella generna för trehalossyntas

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

6928 DSM 7425 DSM

Organismien trehaloosipitoisuuden lisääminen, siten että ne transformoidaan trehaloosisyntaasin rakennegeenien yhdistelmillä

Tämä keksintö koskee hiivojen, kuten esimerkiksi leipomo- ja polttimohiivojen trehaloosia syntetisoivan tien muokkaamiseksi geenitekniikka sekä tämän tien siirtämistä muihin organismeihin geenitekniikan avulla. Esillä oleva keksintö koskee erityisesti trehaloosisyntaasia, uusia geenejä, jotka koodittavat mainittua entsyymiä, sekä uusia vektoreita, jotka sisältävät näitä uusia geenejä, sekä isäntäsoluja ja organismeja, jotka on transformoitu uusilla vektoreilla. Keksintö koskee myös trehaloosin ja etanolin valmistusta sekä organismien, erityisesti hiivojen ja viljelykasvien stressinsiedon parantamista.

On hyvin tunnettua, että dehydratoinnin aikana sokerit ja muut polyhydriset yhdisteet stabiloivat eristettyjä proteiineja sekä fosfolipidimembraaneja, luultavasti siten että ne syrjäyttävät vesimolekyylejä, joita vetysidokset yhdistävät näihin makromolekyyleihin [Crowe et al.:n selonteko (1987) julkaisussa Biochemical Journal 242, 1-10]. Trehaloosi (α-glukopyranosyyli-α-D-glukopyranosidi) on kahden glukoosimolekyylin dimeeri, jossa molekyylejä yhdistävät niiden pelkistävät ryhmät. Koska dimeerillä ei ole pelkistäviä ryhmiä, se ei osallistu Maillard-reaktioihin, jotka aiheuttavat sen, että monet sokerit tuhoavat proteiineja, ja trehaloosi on yksi tehokkaimmista proteiinien ja biologisten membraanien suojaaineista in vitro.

Trehaloosi esiintyy luonnossa suurina pitoisuuksina hiivoissa ja muissa sienissä, joissakin bakteereissa, hyönteisissä ja muutamissa eläimissä, jotka kasvavat rantavyöhykkeessä, kuten esimerkiksi merikatkakravuissa. On huomattava, että kaikki nämä eläimet ovat usein alttiina osmoottiselle ja dehydratointistressille. Trehaloosin kerääntyminen korkeampiin kas-

veihin on harvinaista, mutta sen suuria pitoisuuksia esiintyy niin sanotuissa elvyttämiskasveissa, kuten esimerkiksi sanikkaisella, Selaginella lepidophyllalla, jotka voivat selvitä hengissä pitkäaikaisesta kuivuudesta. [Quillet, M. ja Soulet, M. (1964), Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Paris 259, ss. 635 - 637; G. Avigadin selostus (1982) julkaisussa Encyclopedia of Plant Research (uudet sarjat) 13A, sivuilla 217 - 347].

Solunsisäisen veden saanin väheneminen soluilla ja membraaneilla on yleinen piirre, joka ei ole ominanen ainoastaan dehyratoinnille ja osmoottiselle stressille, vaan myös jäätymiselle, jossa jäänmuodostuminen vetää mukanaan vettä solujen sisältä, sekä lämpöstressille, joka heikentää vetysidoksia veden ja biologisten makromolekyylien välillä. Viimevuosina useat julkaisut ovat osoittaneet läheisen yhteyden hiivasolujen, erityisesti Saccharomyces cerevisiaen, trehaloosipitoisuuden ja niiden vastustuskyvyn välillä dehydratointia, osmoottista, jäätymis- ja lämpöstressiä kohtaan. Tämä työ on johtanut siihen ajatukseen [Wiemkem, A. on esittänyt yhteenvedon (1990) julkaisussa Antonie van Leeuwenhoek 58, 209 - 217], että kun hiivassa päävarasto tai varahiilihydraatti on glykogeeni, trehaloosin tärkein fysiologinen tehtävä sitä vastoin on suojata edellä mainittuja ja muita stressejä vastaan, mukaan luettuina nälkiintyminen vieläpä kuparimyrkytys, etanoli ja vetyperoksi, jotka kaikki stimuloivat trehaloosin kerääntymistä Attfield, P.V. (1987), Federation of European Biochemical Societies Letters 225, 259 - 263].

Näin ollen kun Saccharomyces cerevisiae kasvaa glukoosilla, glykogeeni alkaa kerääntyä noin yhden sukupolven verran aiemmin, ennen kuin glukoosi on käytetty loppuun, ja glukogeeniä aletaan käyttää jatkuvasti, niin pian kuin koko ulkoinen hiilensyöttö on loppunut. Sitä vastoin trehaloosi (osittain glykogeenin kustannuksella) vain alkaa kerääntyä, sen jälkeen kun kaikki glukoosi on kulutettu, ja trehaloosin

taso pidetään yllä, kunnes lähes kaikki glykogeeni on käytetty loppuun [Lillie, S.A. & Pringle, J.R. (1980), Journal of Bacteriology 143, 1384 - 1394]. Trehaloosin lopulta tapahtuvan kulutuksen jälkeen elävien solujen lukumäärä laskee nopeasti.

Kun S. cerevisiaen trehaloositasoja on manipuloitu, siten että kasvuolosuhteita on vaihdeltu tai on annettu lämpösokkeja, on havaittu suuria positiivisia korrelaatioita solujen trehaloosipitoisuuden ja niiden kuivumisenkestävyyden [Gadd, G. et al. (1987), Federation of European Microbiological Societes Microbiological Letters 48, 249 - 254] sekä jäätymisenkestävyyden [Gelinas, P. et al. Applied and Enviromental Microbiology 55, 2453 - 2459] välillä. Epätavallisen korkeita trehaloosipitoisuuksia tavattiin myös sellaisilla S. cerevisiaen ja muiden hiivojen kannoilla, jotka on valittu osmoottisen stressin [D'Amore, T. et al. (1991) Journal of Industrial Microbiology 52, 191-196] tai sellaisen hyvän fermentaatiotehon perusteella, joka ilmenee jäädytetyssä taikinassa [Oda, Y. (1986) Applied and Enviromental Microbiology 52, 941 - 943], havaittiin epätavallisen korkeita trehaloosipitoisuuksia. Tämän lisäksi S. cerevisiaellä syklisen AMP:n signaalisekvenssijärjestelmässä mutaatio, joka aiheuttaa konstitutiivisiä, suuria trehaloosipitoisuuksia, aiheuttaa myös konstitutiivistä lämmönsietoa, kun taas tässä järjestelmässä jokin muu mutaatio, joka estää trehaloosipitoisuuden tavallisen nousun lämpösokin aikana, estää myös lämmösietokyvyn saavuttamisen [Hottinger, T. et al., (1989) Federation of European Biochemical Societies Letters 255, 431-434]. Täten on olemassa paljon todisteita, jotka kohdistuvat trehaloosipitoisuuden ja stressinsiedon väliseen yhteyteen hiivalla. Samanlaisia havaintoja on tehty useilla muilla sienillä [esim. Neves, M.J. Jorge, J.A., Francois, J.M. & Terenzi, H.F. (1991) federation of European Biochemical Societies Letters 283, 19-22]. Syysuhdetta ei kuitenkaan vielä ole havainnollistettu. Tämän lisäksi lähes kaikki olosuhteet, jotka aiheuttavat hiivan trehaloosipitoisuuden nou-

sun, aiheuttavat myös niin sanottujen lämpösokkiproteiinien tasojen nousua. Hottigerin ja hänen kollegoidensa julkaisu vuodelta 1989, jota edellä siteerataan, esittää vaatimukset sille, että kanavaniini ei aiheuta lisääntymistä trehaloositasoissa eikä lämmönsietokyvyssä, kun taas raportoidaan, että tämä yhdiste indusoi lämpösokkiproteiineja.

Olipa trehaloosipitoisuuden ja stressinsiedon välillä syysuhdetta tai ei, leivinhiivateollisuudessa on tullut yleiseksi käytännöksi maksimoida hiivan trehaloosipitoisuus. Tämän päämäärän saavuttamiseksi on kehitetty erilaisia kypsymisprosesseja, ja niillä on ratkaiseva merkitys aktiivisen, kuivatun hiivan valmistuksessa. Näiden prosessien yksityiskohdat ovat usein salaisuuksia, mutta ne ovat yleensä kokeellisia menetelmiä, joissa hiilen ja typen syöttöä, ilmastusta ja lämpötilaa säädellään huolellisesti ja käytetään valittuja hiivakantoja. Ne vaativat aikaa ja energian syöttöä, jonka aikana solujen lukumäärä lisääntyy vähän. Järkevämpi ja paremmin säädelty prosessi olisi taloudellisempi.

E. Cabibin ja L.F. Leloirin julkaisun mukaan [(1957) Journal of Biological Chemistry 231, 259-275] trehaloosi syntetisoidaan hiivassa uridiinidifosfoglukoosista (UDPG:stä) ja glukoosi-6-fosfaatista (G6P:stä) kahden entsyymiaktiivisuuden, nimittäin trehaloosi-6-fosfaattisyntaasin ja trehaloosi-6-fosfaattifosfataasin, peräkkäisellä toiminnalla. Londesborough, J. & Vuorio, O. [(1991) Journal of Microbiology 137, 323-330, nimenomaan liitetty tähän yhteyteen viitteenä] ovat puhdistaneet leipomohiivasta proteolyyttisesti muunnetun proteiinikompleksin, jolla on näitä molempia aktiivisuuksia ja joka näyttää sisältävän lyhyen polypeptidiketjun (57 kDa) ja pitkän polypeptidiketjun kaksi typistettyä muunnosta (86 kDa ja 93 kDa). Koskemattoman pitkän ketjun massaksi määritettiin ainakin 115 kDa. Ei julkaistu, mikä entsyymiaktiivisuus tai mitä aktiivisuuksia liittyi kuhunkin polypeptidiin, eikä todella julkaistu sitä, oliko kumpikin polypeptidi välttämätön jommallekummalle tai molemmille entsyymiaktiivi-

suuksille. Raportoitiin molempien polypeptidien antiseerumeista, mutta ei julkistettu mitään aminohapposekvenssejä.

Aiempi patenttihakemus [EP 451 896; katso vaatimus 1] on esittänyt vaatimuksen tranformoidulle hiivalle, "joka sisältää .... yhden geenin, joka kodittaa .... trehaloosi-6-fosfaattisyntaasia". Kuitenkaan ei annettu mitään informaatiota geenistä eikä proteiinista, jota se koodittaa.

Monet kirjoittajat ovat raportoineet TPS:n aktiivisuuden lisääntymisestä olosuhteissa, jotka johtavat trehaloosin kerääntymiseen S. cerevisiaella ja Schizosaccharomyces pombella, sekä stationaarista faasia lähestyttäessä [Winkler, K., et al. (1991) Federation of European Biochemical Societies Letters 291, 269-272; Francois, J., et al. (1991) Yeast 7, 575-587] että lämpötilan noustua noin 40 °C:seen [De Virgilio, C, et al. (1990) Federation of European Biochemical, Societies Letters 273, 107-110]. Panek ja hänen kollegansa [Panek, A.C., et al. (1987) Current Genetics 11, 459-465] ovat esittäneet vaatimuksen sille, että TPS-aktiivisuus lisääntyy ennalta olemassa olevien entsyymimolekyylien defosforylaation myötä, se on, että aktiivisuuden lisäys on translaation jälkeisen säätelyn tulos. Tätä vaatimusta on vastustettu [Vandercammen, A., et al., (1989) European Journal of Biochemistry 182, 613-620], mutta se esitetään edelleen [Panek, A.D. & Panek, A.C. (1990) Journal of Biotechnology 14, 229-238]. Todiste sen puolesta, että entsyymimäärä lisääntyy trehaloosin kerääntymisen aikana, tai sitä vastaan on ristiriitainen. mRNA:n synteesin inhibiittorit estivät trehaloosin kerääntymisen S. cerevisiaella, joka siirrettiin 30 °C:sta 45 °C:seen [Attfield (1987) samassa julkaisussa], kun taas erittäin samankaltaisissa olosuhteissa Winkler et al. [(1991) samassa paikassa] havaitsivat, että sykloheksimidi (proteiinisynteesin eräs inhibiittori) ei estänyt trehaloosin kerääntymistä, joka kuitenkin tapahtui ilman, että TPS:n aktiivisuus nousi huomattavasti. Alemmalla lämpötila-alueella (muutos 23 °C:sta 36 °C:seen) trehaloosin kerääntymistä seu-

rasi kolminkertainen TPS:n aktiivisuuden lisääntyminen, jota sykloheksimidi esti [Panek, A.C. et al. (1990) Biochemie 72, 77 - 79]. Schizosaccharomyces pombella [De Virgilio, C. , et al. (1991) samassa julkaisussa] lämpötilan vaihdos korkeampaan lämpötilaan aiheutti, että trehaloosi kerääntyi voimakkaasti ja TPS lisääntyi, eikä sykloheksimidi estänyt lisäystä, mikä johti kirjoittavat ehdottamaan, että tällä hiivalla esiintyy translaation jälkeistä aktivaatiota. Esillä olevassa keksinnössä julkistetaan, että S. cerevisiaella TPS- ja TPP-aktiivisuuksien tasavertaista lisääntymistä glukoosin loppuunkäytön aikana seuraa lisääntyminen antigeenimateriaalissa, jonka tunnistaa antiseerumi, joka on valmistettu puhdistetun trehaloosisyntaasin lyhyitä ja pitkiä ketjuja vastaan. Sen tähden menetelmä solujen trehaloosipitoisuuden ja niin ollen niiden stressinsiedon lisäämiseksi olisi, että eristetään, kloonataan ja muunnetaan näiden polypeptidien rakennegeenejä (tässä yhteydessä jäljempänä nimitetty TSS1:ksi, TSL1:ksi ja TSL2:ksi) ja aiheutetaan niiden ilmentyminen hiivassa ja muilla isäntäsoluilla sopivien promoottoreiden säätelyn alla. Jos näiden geenien ilmentymistä voitaisiin kontrolloida, niin voitaisiin säädellä isäntäsolujen trehaloosipitoisuutta.

Kacserin & Burnsin [(1973) Symposium of the Society of Experimental Biology 27, 65-107] tunnettu metaboliaa koskeva teoria esittää, että periaatteessa minkä tahansa välituotteen, kuten esimerkiksi trehaloosin, konsentraatiota voidaan lisätä, siten että lisätään minkä tahansa entsyymin määrää, joka syntetisoi trehaloosia, tai vähennetään minkä tahansa entsyymin määrää, joka pilkkoo sitä, mutta että lisääntyminen ei liene määrältään merkittävää. Esillä olevan keksinnön uutuus on siinä, että identifioidaan ja luonnehditaan tietyt hiivageenit, jotka täytyy muuntaa, jotta lisätään trehaloosisyntaasin määriä, ja että annetaan arvoa synteesitien muuntamisen suomille eduille pikemmin kuin hajottavalle tielle. Näihin etuihin kuuluu, että (i) hyvin säädelty [katso, esimerkiksi, Thevelein, J.M. (1988) Experimental Mycology 12,

1 - 12], hajottava tie jätetään koskemattomaksi, jotta vältetään fysiologiset ongelmat, jotka ovat todennäköisiä hiivalla, joka ei voi aktivoida tätä tietä, (ii) mahdollisuus saada hiiva syntetisoimaan trehaloosia fysiologisissa olosuhteissa, joissa luonnonmukaiset hiivatyypit eivät sitä syntetisoi (niin että hajottavan tien estäminen ei voi lisätä trehaloosin määrää) ja (iii) tärkeä mahdollisuus on näiden geenien avulla viedä trehaloosin synteesikapasitetti organismeihin, kuten esimerkiksi korkeimpiin kasveihin, joilta tämä kyky puuttuu luonnostaan.

Trehaloosin synteesigeenien ilmentyminen hiivassa olosuhteissa, joissa trehalaai on aktiivinen, lisää niin sanotun "hyödyttömän" syklin toimintaa, jossa glukoosia jatkuvasti fosforyloidaan, muutetaan trehaloosiksi ja regeneroidaan trehaloosin hydrolyysin avulla, minkä tuloksena ATP:n kulutus lisääntyy. Tämä ATP täytyy regeneroida, ja käymisolosuhteissa se tapahtuu, siten että sokereita muutetaan etanoliksi. Sen tähden odotetaan, että jos TSS1, TSL1 ja TSL2 viedään hiivaan sellaisten promoottoreiden säätelyn alla, jotka ovat aktiivisia käymisolosuhteissa, solumassan saanto hiilenlähteellä vähenee ja etanolin saanto lisääntyy. Monet yritykset [esim. Schaaf et al. (1989) Yeast 5, 285-290] lisätä käymisnopeuksia hiivassa, siten että lisätään glykolyyttisten entsyymien tasoja, ovat olleet epäonnistuneita. Luultava syy on, että ADP:n saatavuus rajoittaa glykolyysin nopeutta hiivassa. Hyödyttömän syklin ATP:aasin sisäänviemisen odotettiin täten lisäävän glykolyysin nopeutta. Tämän keksinnön toteutettavuutta havainnollistaa löytö [Gancedo, J.-M. & Nava, M.A. (1992) Yeast 8, S574], jossa glukoneogeneesientsyymien, fruktoosibifosfataasin ja fosfoenolipyruvaattikarboksikinaasin, ilmentyminen käymisolosuhteissa (aiheuttaen näin kaksi hyödytöntä sykliä) aiheutti 50 prosentin suuruisen lisääntymisen lepäävän hiivan käymisnopeudessa. Trehaloosin hyödyttömän syklin käytölla on lisäetuna, että solujen täytyy sisältää trehaloosin vakiotaso, mikä lisää soluilla osmoottisen ja lämpötilastressin sietokykyä.

Esillä oleva keksintö sisältää polttimohiivan transformoituja kantoja, joissa minkä tahansa TSS1:n, TSL1:n ja TSL2:n tai niiden kaikkien muunnettujen muotojen läsnäolo antaa tulokseksi etanolin lisätyn saannon hiilihydraattilähteistä.

Yhtä hyvin kuin tätä keksintöä käytetään hiivan ominaisuuksien parantamiseen erityisesti aktiivisella, kuivatulla hiivalla ja sellaisella hiivalla, joka on tarkoitettu jäädytettyjä taikinoita varten, keksinnöllä on muita ilmeisiä sovellutuksia. Ensiksi siten että lisätään trehaloosin suhdetta hiivassa, trehaloosin tuottaminen hiivasta teollisessa mittakaavassa tehdään taloudellisemmaksi. On erityisen edullista saada trehaloosia hiivasta, koska hiiva on perinteinen ja turvallinen elintarvike, trehaloosin vähin mahdollinen puhdistaminen on usein riittävä: hiivatähteitä sisältäviä trehaloosivalmisteita voisi turvallisesti lisätä elintarvikkeisiin, jotka on tarkoitettu ihmisten tai eläinten käyttöön. Trehaloosilla on myös lääketieteellisiä sovellutuksia sekä diagnostisten välinepakkausten, virusten ja muiden proteiinimateraalien vakautteena [WO 87/00196] että kasvaimenvastaisten aineiden lähteenä [Ohtsuro et al. (1991) Immunology 74, 497-503]. Ihmisellä tapahtuvaa sisäistä käyttöä varten olisi paljon turvallisempaa, jos trehaloosi olisi saatu hiivalta kuin geenitekniikalla muunnetusta bakteerista.

Toiseksi, kasvien resistenssiä erilaisia stressejä, erityisesti pakkasta ja kuivuutta, kohtaan tulisi parantaa, siten että edellä mainittuja geenejä siirretään korkeampiin kasveihin, sen jälkeen kun on tehty sopivia modifikaatioita, jotka ovat selviä jokaiselle alan ammattimiehelle (yleensä adeniini-tymiiniemäsparien korvaamisia guaniini-sytosiiniemäspareilla, kuten Perlak et al. ehdottivat [(1991) Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 88, 3324-3328], ja on viety sisään sopivia promoottoreita, jotka voivat olla kudosspesifisiä, jotta trehaloosin synteesi ohjataan pakkasta ja kuivuutta kestäviin kudoksiin). Sellaisten parannusten taloudellinen tärkeys on mahdollisesti suunnaton,

koska kylmänsietokyvyn pienetkin lisäykset johtavat suuriin kasvukauden lisäyksiin, kun taas kuivuudenkestävyys voi pelastaa kokonaisia satoja kuivana aikana. Korkeammilla kasveilla pakkasen- ja kuivuudensietokykyä tavallisesti seuraa sellaisten yhdisteiden, kuten esimerkiksi proliinin, pikemmin kuin trehaloosin, lisääntyminen [Stewart (1989) on selostanut julkaisussa "Plants under Stress", sivuilla 115-130], mutta kuten edellä mainittiin, elpymiskasvit keräävät suuria määriä trehaloosia, eikä näytä olevan mitään syytä, miksi tämä toimintasuunnitelma ei onnistuisi. Sen tähden esillä oleva keksintö sisältää viljakasvien transformointimenetelmän, jolla hiivan trehaloosisyntaasin rakennegeenien (TSS1, TSL1 ja TSL2) yhdistelmämuodot viedään näihin kasveihin, jotta trehaloosipitoisuutta lisätään joissakin niiden kudoksissa emokasvin vastaaviin kudoksiin verrattuina. Sellaiset transformoidut kasvit voivat olla myös taloudellisia ja turvallisia trehaloosilähteitä. Kolmanneksi, elintarvikkeiden säilymisaikaa voidaan lisätä, siten että niihin lisätään trehaloosia [WO 89/00012]. Esillä olevan keksinnön lisänäkökohta on uusi menetelmä trehaloosia runsaasti sisältävien elintarvikkeiden valmistamiseksi kasveista, siten että nämä kasvit saadaan ilmentämään hiivan trehaloosisyntaasin rakennegeenejä kudoksissaan, jotka kelpaavat syötäviksi.

Esillä oleva keksintö saa aikaan kaksi eristettyä geeniä, jotka koodittavat vastaavasti hiivan trehaloosisyntaasin lyhyttä ja pitkää ketjua, sekä kolmannen geenin, joka koodittaa 99 kDa:n polypeptidiä, joka esiintyy joissakin trehaloosisyntaasivalmisteissa ja joilla on trehaloosi-6-fosfataasin aktiivisuutta. Näitä geenejä voidaan käyttää organismin (kuten esimerkiksi hiivan, muiden sienien tai korkeampien eukaryoottien) transformointiin, jolloin transformoitu organismi tuottaa enemmän trehaloosisyntaasia, ja näin ollen organismin trehaloosipitoisuus on suurempi kuin emo-organismilla. Suurempi trehaloosipitoisuus antaa transformoidulle organismille parannetun stressinkestävyyden ja parempia varastointiominai-

suuksia emo-organismiin verrattuna, ja transformoitua organismia voidaan käyttää suurien trehaloosimäärien aikaansaamiseksi. Menetelmä sellaisten viljelykasvien saamiseksi, jotka paremmin sietävät vedenpuutetta, kuumuutta ja kylmyyttä, sisältää täten kasvin transformoinnin, siten että kasvin kudoksiin viedään ainakin yksi uusista geeneistä.

Esillä oleva keksintö saa myös aikaan trehaloosisyntaasin, jolla on trehaloosi-6-fosfaattisyntaasin aktiivisuutta, joka on aktivoitavissa fuktoosi-6-fosfaatilla, ja myös trehaloosi-6-fosfataasiaktiivisuutta.

Lopuksi keksintö saa aikaan trehaloosin valmistusmenetelmiä, joiden mukaan viljellään isäntää tai organismia, joka on transformoitu ainakin yhdellä uusista geeneistä, sekä runsaasti menetelmiä trehaloosia sisältävien elintarvikkeiden valmistusmenetelmiä kasveista, siten että kasvin syötäväksi kelpaaviin kudoksiin viedään ainakin yksi uusista geeneistä ja mainittujen geenien annetaan ilmentää trehaloosisyntaasia mainituissa kasvin kudoksissa.

Lyhyt yhteenveto hakemukseen liittyvistä piirustuksista:

Kuvio 1. Intaktin (eli hajottamattoman) trehaloosisyntaasin SDS-PAGE

Käytettiin 6 - 13-prosenttista geeligradienttia. Kaista 1 sisältää 8,3 µg koskematonta trehaloosisyntaasia, joka on eluoitu UDPG-glukuronaatti-agaroosipylväästä 0,2-molaarisella NaCl:lla (Taulukon 1 #11). Kaistat 2, 3 ja 4 sisältävät vastaavasti 7,7, 12 ja 1,0 µg entsyymiä, joka on eluoitu pylväästä 0,4-molaarisella NaCl:lla, joka sisältää 10 mmoolia UDPG:tä (taulukosta 1 #13, #14 ja #15). Kaista 5 sisältää noin 1 ug kutakin molekyylipainomarkkeria (myosiinia, ß-galaktosidaasia, α-fosforylaasia, BSA:ta, ovalbumiinia, laktaattidehydrogenaasia, trioosifosfaatti-isomeraasia, myoglobiinia ja sytokromi c:tä). Koskemattoman trehaloosisyntaasin

pääpolypeptidit nimetään vasemmalla puolella ja molekyylimassan kalibrointi kDa:na esitetään oikealla.

Kuvio 2. YP - 2-prosenttisella glukoosilla kasvatetun luonnonmukaisen hiivatyypin immuunisaostumien SDS-PAGE

Käytettiin 9-prosenttista geeliä. Kaista 1 sisältää noin 1 µg kutakin molekyylimarkkereita, joita käytettiin kuvassa 1. Kaistat 2, 3 ja 4 sisältävät immuunisaostumia, jotka on saatu 3,8 mg:sta tuoretta hiivaa, joka on korjattu 16,1 tunnin (1,2 prosenttia jäännösglukoosia), 18,1 tunnin (ei jäännösglukoosia) ja 39 tunnin jälkeen. Molekyylimassan kalibrointi esitetään vasemmalla ja trehaloosisyntaasin pääpolypeptidit ja τ-globuliinin raskas ketju esitetään oikealla puolella.

Kuvio 3. TSS1:n promoottori ja terminaattori sekä sen ORF:n perusteella päätelty aminohapposekvenssi

(a) Promoottori- ja terminaattorialueilla ATG-aloituskodonit ja peräkkäiset TGA-pysäytyskodonit on kaksinkertaisesti alleviivattu ja TATA-boksi sekä oletettu, kataboliittinen repressioelementti ovat alleviivatut. (b) Aminohapposekvensseissä (sekvenssin identifiointinumero 2) on alleviivattu ne sekvenssit, jotka esiintyvät trehaloosisyntaasin lyhyestä ketjusta eristetyissä peptideissä.

Kuvio 4. TSL1:n promoottori- ja terminaattorialueet sekä sen ORF:n perusteella päätelty aminohapposekvenssi

(a) Promoottorialueella on kaksinkertaisesti alleviivattu ATG-aloituskodoni sekä kaksi TATA-boksia ja kuusi oletettua lämpösokkielementtiä. Oletettu MIG1-sitoutumiskohta on alleviivattu. Terminaattorialueella TAA-pysäytyskodoni on kaksinkertaisesti alleviivattu ja oletettu transkription terminaatioelementti on alleviivattu. Alemmat pikkukirjaimet osoittavat ARGII-geenin terminaattorialueen pään, jolla on vastakkainen polaarisuus. (b) Aminohapposekvenssissä (sekvenssin

identifiointinumero 82) on alleviivattu ja ne sekvenssit, jotka esiintyvät peptideissä, jotka on eristetty 123 dDa mittaisesta ketjusta (sen fragmenteista), ja ne aminohapposekvenssit, jotka ovat peräisin peptideistä, jotka on vapautettu koskemattomasta trehaloosin syntaasista, siten että entsyymiä on pilkottu trypsiinillä rajoitetusti, on alleviivattu ja lihavoitu.

Kuvio 5. Trehaloosisyntaasin lyhyiden ja pitkien ketjujen aminohapposekvenssien vetailu

Täydellinen lyhyen ketjun sekvenssi (sekvenssin identifiointinumero 2; ylempi sekvenssi) on asetettu päällekkäin 123 kDa pituisen ketjun tähteiden 320 - 814 kanssa (sekvenssin identifiointinumero 4; alempi sekvenssi). Sisään on sijoitettu 32 tyhjää kohtaa, jotta samankaltaisuus tulisi mahdollisimman hyvin esille. Kohtisuorat katkoviivat osoittavat identtisiä tähteitä. Kaksoispisteet ilmaisevat säilyttäviä substituutioita.

Kuvio 6. Tärkeät restriktiokohdat TSS1:ssä ja TSL1:ssä

Paksut viivat ilmaisevat avoimia lukuvaiheistuksia. Mittasauva osoittaa yhtä kb:tä.

Kuvio 7 [^{14}C]-trehaloosin synteesi [U-^{14}C]-glukoosi-6-fosfaatista uutteen avulla, joka on saatu luonnonmukaisesta hiivatyypistä

Reaktioseokset (100 µl) sisälsivät 40-mmoolaarista HEPES/KOH:ta, pH 6,8, 1 mg BSA:ta millilitraa kohti, 10 mmolaarista $MgCl_2$:ta, 10 mmolaarista [U-^{14}C]-G6P:tä (736 iskua minuutissa/nmooli) sekä (a) ei fosfaattia tai (b) 5 mmolaarista K-fosfaattia, pH 6,8 sekä (0) 5 mmolaarista UDPG:tä, (●) 2,5 mmolaarista ADPG:tä tai (O) ei UDPG:tä eikä ADPG:tä. Reaktiot aloitettiin, siten että lisättiin 10 µl (samanarvoinen 94 µg:n kanssa tuoretta hiivaa) stationäärivaiheen X2180

supernatanttia, joka oli saatu sentrifugoimalla nopeudella 28 000 x g. Reaktiot pysäytettiin, siten että reaktioseokset siirrettiin kiehuvaan veteen kahdeksi minuutiksi ja lisättiin 1,0 ml AG1-X8 (formiaatti) -anionihartsilietettä [Londesborough & Vuorio (1991) edellä mainitussa julkaisussa]. Hartsin supernatantin radioaktiivisuus mitattiin.

Kuvio 8. Klg 102- ja X2180-hiivojen Western-analyysi

Hiivojen kasvua kuvataan esimerkissä 7. Tuoreen hiivan määrät kaistaa kohti olivat seuraavat: kaista 1, 200 µg X2180/2; kaistat 2 ja 5, 330 µg 2669/1, kaistat 3 ja 6, 610 µg 2669/2, kaistat 4 ja 7, 810 µg 2670/1+2, kaista 8, 560 µg X2180/1 ja kaista 9, 280 µg X2180/1. Analysoitavat kaistat tutkittiin anti-TPS/P-seerumilla, jota käytettiin laimennuksena 1/30 000. Trehaloosisyntaasin päävyöhykkeet identifioidaan oikealla puolella.

Kuvio 9. Typistetyn trehaloosisyntaasin käsittely 1,9-mmolaarisella NEM:llä

Typistettyä entsyymiä (0,13 TPS-yksikköä/millitra ≈ 43 µg/ml) 2 mg:ssa BSA/ml 50-mmolaarista HEPES:iä, pH 7,0, joka sisälsi 67 mmolaarista NaCl:a, 0,2 mmoolia EDTA:ta, 0,17 mmolaarista ditiotreitolia, 0,17 mmoolia bentsamidiinia sekä 1,7 mmolaarista UDPG:tä, inkuboitiin 24 °C:ssa 1,9-mmolaarisen NEM:n kanssa (avoimet symbolit) tai ilman sitä (suljetut symbolit). Mitattiin TPS- (●,O) ja TPP- (■,□) aktiivisuudet.

Kuvio 10. [^{14}C]-NEM:llä leimatun ja SDS-PAGE:llä erotetun typistetyn trehaloosisyntaasin autoradiogrammi

Kaistat 1, 2, 3 ja 4 leimattiin esimerkissä 8 kuvatulla tavalla vastaavasti 1,5, 10,5, 63 ja 190 minuutin ajan. Lyhyen ketjun (57 kDa), pitkän ketjun fragmenttien (93 ja 86 kDa) sekä BSA-kantajan sijainnit ilmaistaan.

Kuvio 11. Typistetyn trehaloosisyntaasin käsittely etyylillä leimatulla NEM:llä

Typistettyä entsyymiä (7,2 TPS-yksikköä/ml ≈ 0,24 mg/ml), joka oli 1 mg:ssa BSA:ta/ml 25-mmolaarista HEPES:iä, pH 7,0, joka sisälsi 2 mmolaarista $MgCl_2$:a, 1 mmolaarista EDTA:ta sekä 0,2 molaarista NaCl:a, inkuboitiin 23 °C:ssa 32-µmolaarisella etyylillä leimatun NEM:n kanssa (kiinteät symbolit) tai ilman sitä (avoimet symbolit). Mitattiin TPS- (●,○] ja TPP- (■,□) aktiivisuudet sekä 93 (▲), 86 (+) sekä 57 (X) kDa:n suuruisiin polypeptideihin liittyneet [^{14}C]-NEM:n määrät. 0,1 moolia NEM:ää, joka on mennyt mooliin (150 Kg) entsyymiä, vastaa radioaktiivisuuden ylimäärää 75 iskua minuutissa vyöhykkeissä, jotka on leikattu geelistä.

Kuvio 12. NEM-leimauksen stökiömetria

TPP:n jäännösaktiivisuus merkitään NEM:n määrää vastaan, joka on liittynyt pitkän ketjun 93 ja 86 kDa:n suuruisiin fragmentteihin. Käytettiin renkaalla leimattua (●) ja etyylillä leimattua (0) NEM:ää.

Kuvio 13. Sellaisten jakeiden SDS-PAGE-analyysi, jotka on eluoitu selluloosafosfaatista 0,3-prosenttisella Triton-puskurilla

Kaista L sisältää 47 µl intaktia eli hajottamatonta trehaloosisyntaasia, joka pantiin pylvääseen. Kaista M sisältää noin 1 µg kutakin molekyylimarkkeria, jota käytettiin kuviossa 1. Numeroidut kaistat sisältävät 33 µl valikoituja 1,5 ml:n suuruisia jakeita, jotka eluoitiin pylväästä. NaCl-gradientti tuli esille jakeessa 6, ja se saavutti 300-mmolaarisen pitoisuuden jakeessa 27. Askelma 600 mmooliin saakka NaCl:a tuli esiin jakeissa 36 ja 37. Jakeet 40 - 42 eluoitiin 200-mmolaarisella K-fosfaatilla. Trehaloosisyntaasivalmisteen pääjakeet identifioidaan vasemmalla. Yksityiskohdat esitetään esimerkissä 9.

Kuvio 14. Trehaloosisyntaasin aktivointi rajoitetulla tryptisellä pilkonnalla in vitro

Intaktia eli hajottamatonta trehaloosisyntaasia inkuboitiin (suljetut symbolit) trypsiinin kanssa ja ilman sitä (avoimet symbolit) ja sen TPS-aktiivisuus mitattiin 5 mmolaarisen F6P:n läsnäollessa reaktioseoksissa, jotka eivät sisältäneet yhtään fosfaattia (O,●) tai sisälsivät (■) 5 mmoolia K-fosfaattia, pH 6,8). Yksityiskohdat esitetään esimerkissä 10.

Kuvio 15. Hajottamattoman trehaloosisyntaasin rajoitettu tryptinen pilkonta

Kaista 1 sisältää hajottamatonta trehaloosisyntaasia, jota käytettiin kuviossa 15, ja kaista 2 sisältää saman määrän entsyymiä, jota on käsitelty 48 minuutin ajan trypsiinillä. Kaista 3 sisältää molekyylimassastandardeja. Trehaloosisyntaasin tärkeimmät polypeptidit identifioidaan vasemmalla.

Kuvio 16. Fruktoosi-6-fosfaatin vaikutus hajottamattoman trehaloosisyntaasin TPS-aktiivisuuteen erilaisilla fosfaattikonsentraatioilla

Luonnonmukaisen trehaloosisyntaasin TPS-aktiivisuus mitattiin, siten että F6P-pitoisuus oli 0 - 10-mmolaarinen. Muut olosuhteet olivat samanlaiset kuin standardi TPS-määrityksessä, siten että mitään ei muutettu (●), lisättiin 1,3-mmolaarista K-fosfaattia, pH 6,8, (0) tai lisättiin 4 mmolaarista K-fosfaattia, pH 6,8, sekä 0,1 molaarista KCl:a ja $MgCl_2$:n konsentraatio pienennettiin 2,5 mmolaariseksi (■). Aktiivisuudet esitetään prosentteina standardimäärityksessä saadusta aktiivisuudesta (se on, 5-mmolaarisessa F6P:ssä eikä yhtään fosfaattia).

Kuvio 17. Hajottamattoman ja typistetyn trehaloosisyntaasin aktivointi fosfaatilla

TPP-aktiivisuudet mitattiin 0,5-mmolaarisessa [^{14}C]-trehaloosifosfaatin pitoisuudessa, määritysseoksissa, jotka sisälsivät 50 mmolaarista Hepes:iä, pH 6,8, 1 mg häränseerumin albumiinia/ml ja joissa oli ilmaistut K-fosfaattikonsentraatiot, pH 6,8, ja aktiivisuudet esitetään prosentteina standardi TPS-aktiivisuudesta. Alkunopeudet esitetään hajottamattomalle (■) ja typistetylle (●) entsyymille. Esitetään myös kiihtyvän reaktion toisen viiden minuutin aikana typistetylla entsyymillä saadut nopeudet (O).

Kuvio 18. Hajottamattoman trehaloosisyntaasin TPP-aktiivisuuden riippuvuus fosfaatista

Käänteisarvo nopeuden lisäykselle (V_Δ), joka on aikaansaatu fosfaatin lisäyksellä, sijoitetaan [fosfaatti]$^{-2}$:a (0) tai [fosfaatti]$^{-1}$:a (●) vastaan. V_Δ esitetään prosentteina standardi TPS-aktiivisuudesta.

Kuvio 19. TSS1:llä ja TSL1:llä transformoidun E. colin Western-analyysi

Geeleihin pantiin kokonaishomogenaattien (HOM) näytteet, jotka olivat samanarvoiset 300 ± 12 µg:n kanssa tuoreita soluja, tai 28 000 x g:llä saatuja supernatantteja (SUP), jotka olivat samanarvoisia kuin 340 ± 25 µg tuoreita soluja. Kaistojen yläpuolelle merkityt kirjaimet ilmaisevat solutyyppejä: K, kontrollisoluja (HB101); L, ALKP3568 (HB101, transformoitu TSL1:llä); S, ALKO3566 (HB101, transformoitu TSS1:llä). Geeli 1 tutkittiin anti-57K-seerumilla (1/20 000) ja geeli 2 anti-93K-seerumilla (1/20 00). Osoitetaan 57 kDa:n mittaisen lyhyen ketjun ja 123 kDa:n mittaisen pitkän ketjun fragmentit, joiden pituus on 60, 36 ja 35 kDa:ta. Molekyylimassastandardit merkitään kDa:ina.

Kuvio 20 Plasmidit, jotka sisältävät TSS1:n ja TSL1:n

Kuviossa esitetään pBluescript, joka sisältää (a) TSS1:n oman promoottorinsa kanssa, (b) TSS1:n ilman promoottoriaan ja (c) TSL1:n promoottorinsa kanssa.

Kuvio 21. S. cerevisiaen kahden tss1-hajoamistuotteen Southern-analyysi

Kontrollihiivasta saatua DNA:a, jota oli pilkottu ClaI:llä (S150-2B); kaistat 2, 5 ja 9), sekä kahta tss1-hajottamistuotetta, ALKO 3569:ä (kaistat 3,6 ja10) sekä ALKO 3570:a (kaistat 4, 7 ja 11) tutkittiin TSS1:n (kaistat 2 - 4), Leu2:n (kaistat 5 - 7) sekä TSL1:n (kaistat 9 - 11) kanssa. Kaistat 1 ja 8 sisältävät DNA-standardeja.

Keksintöä tarkastellaan lähemmin seuraavan yksityiskohtaisen kuvauksen avulla.

Seuraavassa kuvauksessa trehaloosi-6-fosfaattisyntaasi (TPS) ja trehaloosi-6-fosfaattifosfataasi (TPP) tarkoittavat katalyyttisiä aktiivisuuksia, ne eivät tarkoita proteiineja, ellei muuten erityisesti mainita, kun taas trehaloosisyntaasi tarkoittaa proteiinia, joka muuttaa uridiini-difosfoglukoosin (UDPG:n) ja glukoosi-6-fosfaatin (G6P:n) trehaloosiksi ja jolla on myös osittaisreaktioina TPS- ja TPP-aktiivisuuksia. TSS1,

TSL1 ja TSL2 ovat rakennegeenejä, jotka koodittavat vastaavasti trehaloosisyntaasin lyhyttä (57 kDa) ja noin 130 ja 99 kDa:n mittaisia ketjuja. Tiedetään hyvin, että geeneissä esiintyy mutaatioita, ja ne voivat aiheuttaa muutoksia koodittavan polypeptidin aminohapposekvensissä. Muutoksia voidaan aikaansaada myös geenitekniikan menetelmillä. Tässä yhteydessä käytettynä termi TSS1 (tai TSL1 tai TSL2) sisältää kaikki DNA-sekvenssit, jotka ovat homologisia sekvensseille,

jotka tässä yhteydessä julkaistaan TSS1:lle (tai TSL1:lle tai TSL2:lle), sekä koodittavat polypeptidit, joilla on toiminnallisia tai rakenteellisia ominaisuuksia 57 kDa:n (tai vastaavasti noin 130 kDa:n tai 99 kDa:n) suuruisen polypeptidin kanssa. Mukaan luetaan myös sekvenssit, jotka on johdettu näistä geeneistä keinotekoisesti mutta jotka vielä koodittavat polypeptideitä, joilla on haluttuja funktionaalisia tai rakenteellisia ominaisuuksia.

Esillä olevat keksijät raportoivat aiemmin sellaisen osittain pilkotun proteiinivalmisteen eristämisestä, joka sisälsi lyhyen (57 kDa) polypeptidiketjun sekä pitkän polypeptidiketjun kaksi fragmenttia (86 ja 93 kDa) ja jolla oli TPS:n ja TPP:n katalyyttisiä aktiivisuuksia [Londesborough, J: & Vuorio, O. (1991) Journal of General Microbiology 137, 323-330]. Tuona ajankohtana ei tunnettu sen täysimittaisen, koskemattoman, pitkän ketjun kokoa, josta sekä 86 että 93 kDa:n suuruisten fragmenttien uskottiin olevan peräisin, eikä sitä, oliko kummallakaan polypeptidillä kumpaakaan katalyyttistä aktiivisuutta.

Keksijät ovat nyt eristäneet hajottamattoman trehaloosisyntaasin, joka sisältää pääpolypeptideinään 57 kDa:n mittaisen, lyhyen ketjun ja kaksi pitkää ketjua, jotka ovat noin 130 kDa ja 99 kDa mittaisia. Läsnä on myös erittäin pieniä määriä muita polypeptidejä, jotka näyttävät siltä, että ne ovat noin 130 ja 99 kDa mittaisten ketjujen hajoamistuotteita. On kloonattu ja sekvensoitu kaksi geeniä, nimittäin TSS1 ja TSL1, jotka koodittavat vastaavasti lyhyttä sekä noin 130 kDa mittaista ketjua. Koska nyt tämän pitkän ketjun koko tiedetään geeninsä perusteelle ja se on 123 kDa, tässä yhteydessä jäljempänä sitä nimitetään 123 kDa mittaiseksi ketjuksi. TSS1 koodittaa polypeptidiä, jonka teoreettinen molekyylipaino on 56,2 kDa; tätä lyhyttä ketjua ja 99 kDa pituista ketjua kuitenkin nimitetään vielä niiden näennäisten molekyylipainojen perusteella, jotka on saatu SDS-PAGE-analyysillä, tällaisen analyysin virhe on ainakin $\pm$ 10 kDa:ta 130 kDa:lle.

TSS1:n ja polypeptidin, jota se koodittaa, sekvenssit julkistetaan vastaavasti sekvenssien identifiointinumeroina 1 ja 2. TSL1:n ja polypeptidin, jota se koodittaa, sekvenssit julkistetaanvastaavasti sekvenssien identifiointinumeroina 83 ja 82 (näiden sekvenssien aiemmat versiot, joista 5'- ja N-terminaaliset alueet puuttuvat, esitetään sekvenssien identifiointinumeroina 3 ja 4). Julkistetaan geneettinen todiste, joka esittää, että toiminnallinen TSS1-geeni liittyy sekä TPS:n että TPP:n katalyyttisten aktiivisuuksien ilmentymiseen S. cerevisiaella: (1) molemmat aktiivisuudet puuttuvat mutanttikannalta (Klg 102), jolta puuttuu sopivasti toiminnallinen TSS1-geeni ja joka ei ilmennä lyhyttä ketjua sellaisessa muodossa, joka on tunnistettavissa Western-bloteissa, vaikka se ilmentää immunologisesti tunnistettavaa pitkää ketjua; (2) TSS1:n hajottaminen poistaa TPS- ja TPP-aktiivisuudet, poistaa lyhyen ketjun signaalin Western-bloteista ja estää trehaloosin kerääntymisen, ja nämä puutteet kumotaan samanaikaisesti TSS1:llä suoritetulla tranformaatiolla, joka lisää myös solujen vastustuskykyä jäätymisstressille; ja (3) Escherichia colin transformointi TSS1:llä lisää suuresti transformanttien TPS-aktiivisuutta (mutta se ei havaittavasti lisää niiden TPP-aktiivisuutta).

Esillä olevassa keksinnössä julkaistaan biokemiallinen todiste siitä, että typistetyn trehaloosisyntaasin TPP-katalyyttinen aktiivisuus edellyttää toiminnallista pitkää ketjua: noin yhden ^{14}C-N-etyylimaleimidimoolin sisällyttäminen 93 kDa mittaiseen pitkän ketjun fragmenttiin typistetyn trehaloosisyntaasin moolia kohti poistaa täydellisesti TPP-aktiivisuuden, mutta se aiheuttaa vain vähäisen TPS-aktiivisuuden häviön. Tämän lisäksi keksijät ovat pystyneet eristämään polypeptidin, jonka pituus on 99 kDa, sekä osoittamaan, että sillä on jäljelle jäänyt TPP-aktiivisuus mutta ei TPS-aktiivisuutta. Intaktin trehaloosisyntaasi on osittain hajotettu 99 kDa:n rikastamaan muotoon, jolla on suhteellisen suuri TPP/TPS-suhde, sekä 123 kDa rikastamaan muotoon, jolla on pienempi TPP/TPS-suhde. Kuitenkin 123 kDa mittaisen, pitkän ketjun

typistämisellä on dramaattisia ja tärkeitä vaikutuksia trehaloosisyntaasin TPS-aktiivisuuteen: N-terminaalisten 330 tai lähes 330 aminohapon poisto vähentää katalyyttisen TPS-aktiivisuuden herkkyyttä inhibitiolle, jonka fosfaatti aiheuttaa, ja se lähes poistaa entsyymin aktivoinnin fruktoosi-6-fosfaatilla. Lisäksi E. colin transformaatio TSL1:llä aiheuttaa transformanttien TPS-aktiivisuuden lisääntymisen (mutta ei mitään havaittua lisääntymistä niiden TPP-aktiivisuudessa).

Sekä lyhyet että pitkät ketjut myötävaikuttavat trehaloosisyntaasin katalyyttiseen sekä TPS- että TPP-aktiivisuuteen. Tilanne on sen tähden sellainen, että trehalosisyntaasia varten on olemassa ainakin kaksi erilaista rakennegeeniä, joista kumpaakaan ei voida täydellisesti kuvata joko trehaloosi-6-fosfaattisyntaasiproteiinin tai trehaloosi-6-fosfaattifosfataasiproteiinin rakennegeeninä.

Esillä olevan keksijät julkistavat, että TSL1 koodittaa niiden peptidien aminohapposekvenssejä, jotka on eristetty sekä 86 että 93 kDa mittaisen ketjun fragmenteista, joita esiintyy Londesborough'n & Vuorion [(1991) edellä mainitussa julkaisussa] kuvaamassa, typistetyssä entsyymissä. On kuitenkin yllättävää, että TSL1 ei koodita yhtään niistä peptideistä, jotka on eristetty intaktin entsyymin 99 kDa mittaisesta polypeptidistä. Sen tähden niihin rakennegeeneihin, jotka koodittavat trehaloosisyntaasin polypeptidejä, sisältyy kolmas jäsen, joka on TSL2. TSL2:n koodittama polypeptidi, joka on 99 kDa mittainen, ei näkynyt typistetyn entsyymin SDS-PAGE-analyysissä. Kuitenkaan TSL1 ei koodittanut yhtä niistä kuudesta polypeptidistä, jotka oli eristetty 93 kDa mittaisesta fragmentista, ja tällä polypeptidillä oli aminohapposekvenssi, joka esiintyi myös peptidissä, joka eristettiin 99 kDa mittaisesta polypeptidistä. Vähäisiä määriä 99 kDa-polypeptidin hajoamistuotetta on läsnä typistetyssä entsyymissä, ja se kulkeutuu 99 kDa mittaisen fragmentin mukana SDS-PAGE:ssa.

Esillä olevat keksijät eivät ole vielä sekvensoineet tätä kolmatta rakennegeeniä, joka on TSL2, mutta julkistavat informaation, joka antaa mainittua geeniä varten alan ammattimiehen käyttöön selvät eristämis- ja kloonausmenetelmät. Sellainen klooni (pALK7756), joka sisältää ainakin tämän geenin osan, on tallennettu (vastaanottonumero, DSM 7425; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 1 B, D-3300 Brauschweig).

Keksijät julkistavat sen, että geenit TSS1 ja TSL1 sisältävät sellaisia laajoja yhtäläisyyksiä, että koko lyhyen ketjun aminohapposekvenssi on 37-prosenttisesti yhtäläinen pitkän ketjun tähteiden 495 - 814 kanssa.

Esillä olevan keksinnön uusi piirre sen tähden on, että hiivan tai jonkin muun isäntäorganismin trehaloosisynteesikapasiteetin lisäämiseksi voi olla välttämätöntä lisätä sekä TSS1- että TSL1- ja TSL2-geenien ilmentymistä tai muuntaa näitä geenejä jollain muulla tavalla, ei sen vuoksi että TPS- tai TPP-aktiivisuus on "nopeutta rajoittava", vaan koska useampi kuin yksi geeni vaikuttaa kuhunkin aktiivisuuteen.

Edellä yhteenvetona esitetyt tulokset osoittavat sen, että molemmat, sekä TSS1 että TSL1, vaikuttavat TPS-aktiivisuuteen ja molemmat, sekä TSS1 että TSL2, vaikuttavat TPP-aktiivisuuteen. Nämä tulokset osoittavat kuitenkin myös sen, että TSL2-geenin tuote (99 kDa suuruinen polypeptidi), joka on eristetty kromatografian avulla, itse on trehaloosi-6-fosfataasi, kun taas TSS1-geenin tuote, joka ilmentyy E. colissa on trehaloosi-6-fosfaattisyntaasi, vaikka näiden erillisten polypeptidien katalyyttinen teho voi olla vähäisempi, kuin jos ne ovat oikein koottuina trehaloosisyntaasikompleksissa.

Yllättävä havainto oli, että TSS1-geeni on identtinen geenin kanssa, jota vuoroin nimitetään joko FDP1:ksi tai CIF1:ksi. Tällä geenillä on pleiotropisia vaikutuksia sokereiden hyväksikäyttöön S. cerevisiaella. Erityisesti haploidinen hiiva,

jolla on tämän geenin tiettyjä alleeleja (niin sanotut fdp1- ja cif1-mutantit), ei pysty kasvamaan mannoosilla, tai mannosilla tai sakkaroosilla, tai mannoosilla, sakkaroosilla, tai fruktoosilla, tai mannoosilla, sakkaroosilla, fruktoosilla tai glukoosilla, sen mukaan, miten vakava puutos on [Van de Poll & Schamhart, (1977) Molecular and General Genetics 154, 61-66; Bañuelos, M. & Fraenkel, D.G. (1982) Molecular and Cellular Biology 2, 921-929]. Sellaiset mutantit kasvavat normaalisti galaktoosilla. Sen tähden valittaessa kantoja, joista TSS1-geeni on poistettu tai joissa se on muunnettu, joskus on olennaista ja aina on viisasta kasvattaa transformantteja galaktoosilla, koska monissa tapauksissa haluttu transformantti ei pysty kasvamaan millään muulla yleisellä sokerilla, rutiinimaisesti käytetty glukoosi mukaan luettuna. Tämä on odottamaton metodinen näkökohta, joka ei olisi selvä edes alan ammattimiehelle: tarvitaan spesifistä tietoa TSS1-geenin sekvenssistä ja sijainnista kromosomissa, minkä esillä olevat keksijät nyt julkaisevat.

Sen jälkeen kun keksijät USPA 841 997:ssä ovat julkaisseet TSS1:n yhtäläisyyden FDP1:n ja CIF1:n kanssa, Bell, W., et al. (1992) ovat varmistaneet yhtäläisyyden julkaisussa European Journal of Biochemistry 209, 951-959)].

Keksijöiden aiempi työ [Londesborough & Vuorio (1991) samassa paikassa] osoitti, että sellainen katalyyttinen TPS-aktiivisuus, jonka nyt tiedetään kuuluvan trehaloosisyntaasiin, vaatii niin sanotun TPS-aktivaattoriproteiinin, joka on 58 kDa suuruisten alayksiköiden muodostama dimeeri. Keksijät ovat identifioineet tämän proteiinin sen sisältämien peptidien aminohapposekvenssien sekä sen katalyyttisen aktiivisuuden perusteella ja julkistavat, että se on hiivan fosfoglukoisomeraasi. Keksijät julkistavat, että fruktoosi-6-fosfaatti (F6P), joka voitaisiin valmistaa fosfoglukoisomeraasilla glukoosi-6-fosfaatista (G6P) määritysseoksissa, joita käyte-

tään TPS-aktiivisuuden mittaamiseen, on intaktin trehaloosisyntaasin TPS-aktiivisuuden voimakas aktivaattori. Myös kun määritysseos sisältää G6P:n ja F6P:n tasapainoseoksen, TPS-aktivaattorilla ei ole mitään lisävaikutusta, niin että sen fosfoglukoisomeraasiaktiivisuus on täydellinen selitys aktiivisuudelle, jonka se aikaansaa. Tämän lisäksi typistetyn trehaloosisyntaasin TPS-aktiivisuus ei vaadi F6P:a, eikä se inhiboidu niin voimakkaasti fosfaatilla kuin luonnonmukainen entsyymi. Trehaloosisynteesitie voidaan täten periaatteessa siirtää mihin tahansa organismiin, siten että tämä organismi transformoidaan hiivan trehaloosisyntaasin rakennegeeneillä: ei ole välttämätöntä viedä samanaikaisesti sisään TPS-aktivaattoria, koska F6P on läsnä kaikissa soluissa. Sitä paitsi jos F6P:n määrät ovat organismissa riittämättömät tai fosforin konsentraatiot ovat liian suuret, organismi voidaan transformoida TSL1:n typistetyllä muunnoksella, joka koodittaa typistettyä pitkää ketjua, joka antaa epäherkkyyden fosfaattia ja F6P:a kohtaan. Esillä olevan keksinnön tämä näkökohta on erityisen merkittävä, koska se sallii, että trehaloosin synteesitie viedään organismeihin joissa sytosolin fosfaatti- ja F6P-konsentraatiot estäisivät hiivan trehaloosisyntaasin tehokkaan toiminnan, ja keksintö voi myös sallia, että trehaloosisyntaasi toimii tehokkaasti hiivan kasvuvaiheissa, joissa sytosolin fosfaatti inhiboisi luonnonmukaisen trehaloosisyntaasin. Esillä olevat keksijät julkistavat, että koskematon trehaloosisyntaasi voidaan vapauttaa fosfaatti-inhibitiosta, siten että syntaasia käsitellään trypisiinillä in vitro.

Esillä olevasta keksinnöstä saadun tiedon perusteella on mahdollista tuottaa trehaloosia yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla, siten että isäntäsolu transformoidaan sopivasti muunnetuilla TSS1-, TSL1- ja TSL2-geeneillä. Transformointimenetelmät ja sopivat ilmentymisvektorit ovat tekniikan tason mukaan hyvin tunnettuja.

Tekniikan tason mukaisia ilmentymisvektoreita tunnetaan sekä eukaryootti- että prokaryoottijärjestelmille, ja esillä oleva keksintö tarkastelee molempien järjestelmien käyttöä. Hiivan transformaation suhteen tarkastellaan ainakin kahta promoottoriluokkaa. Sellainen hiiva, joka kerää enemmän trehaloosia mutta tavallisena ajankohtana (se on, käymiskykyisten hiilenlähteiden kulutuksen jälkeen), voidaan valmistaa, siten että insertoidaan geenien ylimääräisiä kopioita niiden omien promoottoreiden tai voimakkaampien promoottoreiden alla, jotka säätelevät samalla tavalla. Tällaisella hiivalla voi olla parannetut varastointiominaisuudet sekä stressinsietokyky, ja se voi olla taloudellisempi trehaloosilähde. Sellainen hiiva, joka voi syntetisoida trehaloosia käymisen aikana, voidaan valmistaa, siten että geenien omat promoottorit korvataan promoottoreilla (kuten esimerkiksi ADH1:llä), jotka ovat aktiivisia käymisen aikana. Kuten edellä selitettiin, tällainen hiiva voi lisätä käymisen aikana fermentointinopeuksia, etanolisaantoja ja kestävyyttä osmoottista ja lämpötilastressiä kohtaan.

Esillä olevassa tarkastellaan myös DNA-sekvenssin muunnoksia, jotka saisivat aikaan "edullisia" kodoneita tiettyjä ilmentymisjärjestelmiä varten (esimerkiksi bakteereita ja korkeampia kasveja varten). TSS1-, TSL1- ja TSL2-DNA-sekvenssit voidaan muuntaa tietyillä deleetioilla tai insertioilla, edellyttäen että muunnetuista sekvensseistä translaatiossa muodostuneet polypeptidit ovat entsymaattisesti toiminnallisia. Toiminnallisten polypeptidien ilmentyminen TSS1:stä, TSL1:stä ja TSL2:sta voidaan varmistaa, siten että määritetään TPS- ja (tai) TPP-aktiivisuus ilmentymisjärjestelmässä menetelmin, joita kuvataan Londesboroughin ja Vuorion julkaisussa [(1991) samassa paikassa]. Aiemmin on jo mainittu ensimmäisten 330 tai noin 330 aminohapon deleetio 123 kDa:n mittaisesta ketjusta, jotta aikaansaadaan entsyymi, joka on aktiivinen suuremmissa fosfaatti- ja vähäisemmissä F6P-konsentraatioissa.

Esillä olevan keksinnön mukaiset geenit voidaan siirtää kasveihin ja ilmentää niissä, siten että käytetään Ti-plasmidijärjestelmää, joka tekniikan tason mukaan on hyvin tunnettu. Kloonatun T-DNA:n sisäiset transformoivat geenit voidaan poistaa yhdistelmä-DNA-tekniikoin ja korvata esillä olevan keksinnön mukaisilla geeneillä ja ilmentää kasvikudoksissa. Yleisesti sanottuna vieraan geenin (esimerkiksi TSL1:n) koodittava sekvenssi korvaa opiinisyntaasigeenin koodittavan alueen. Tällä tavalla opiinisyntaasingeenin luonnonmukainen promoottori sekä polyadenylaatiosignaalit sallivat vieraan geenin korkeatasoisen ilmentymisen. Mitä tahansa tekniikan tason mukaista, tunnettua menetelmää voidaan käyttää korkeampien kasvien transformointiin esillä olevan keksinnön geenein.

Seuraavat esimerkit valaisevat esillä olevaa keksintöä, eikä tulisi tulkita, että ne millään tavoin rajoittaisivat esillä olevaa keksintöä.

ESIMERKIT

Yleiset menetelmät ja materiaalit.

Materiaalit. Fruktoosi-6-fosfaatti (F6P) ja adenosiini-5'-difosfoglukonaasi (ADPG) olivat Sigma Chemicalsilta. Glukoosi-6-fosfaatti (G6P), fenyylimetyylisulfonyylifluoridi (PMSF), uridiini-5'-difosfoglukoosi (UDPG) ja muut kaupalliset reagenssit saatiin lähteistä, jotka mainitaan Londesboroughin & Vuorion julkaisussa [(1991) samassa paikassa]. Antiseerumit, anti-TPS/P, anti-57K ja anti-93K valmistettiin kaneissa, siten että antigeeninä käytettiin vastaavasti typistettyä trehaloosisyntaasia, lyhyttä ketjua ja trehaloosisyntaasin pitkän ketjun fragmenttia, jonka pituus oli 93 kDa:ta, kuten Londeboroughin & Vuorion julkaisussa [(1991) samassa paikassa] kuvataan.

Entsyymin eristämiseen ja puhdistukseen käytetyt puskurit. Solu-uutteiden valmistuksen ja entsyymin puhdistamisen aikana peruspuskureina käytettiin kahta standardi seosta, jotka olivat HBMED (25-mmolaarinen Hepes/KOH pH 7,0/1-mmolaarinen bentsamidiini/1-mmolaarinen $MgCl_2$/0,1-mmolaarinen EDTA/0,1 mmolaarinen ditiotreitoli) ja HB2M1ED (HBMED, jossa oli 2-mmolaarinen $MgCl_2$:n ja 1-mmolaarinen EDTA:n lopullinen konsentraatio). Siellä, missä erikseen mainitaan, Hepesin ja bentsamidiinin konsentraatiota lisättiin vastaavasti 50-mmolaariseksi ja 5-mmolaariseksi.

Hiivat. Kaupallinen leivinhiiva oli Alkon Rajamäen tehtailta. S. cerevisiaen standardi laboratoriokannat, joita käytettiin, olivat X2180 (ATCC 26109) sekä S288C (ATCC 26108). Mutanttikantoja kuvataan esimerkeissä ja taulukossa 1 luetellaan tärkeät mikroorganismikannat ja plasmidit. Laboratoriohiivat kasvatettiin 1-prosenttisella hiivauutteella - 2-prosenttisella peptonilla (YP), joka sisälsi mainitun hiilenlähteen, ravistelupulloissa, 30 °C:ssa ja ravistelunopeudella 200 kierrosta minuutissa. Solut koottiin, siten että niitä sentrifugoitiin 5 minuutin ajan nopeudella 3000 g, ne lietettiin uudelleen veteen ja niitä sentrifugoitiin uudelleen 5 minuutin ajan nopeudella 3000 g. Saostumat lietettiin noin 20 tilavuuteen HBD2M1ED:tä ja niitä sentrifugoitiin taaratuissa putkissa 10 minuutin ajan nopeudella 15 000 g. Putket ja saostumat punnittiin, jotta saatiin selville tuoreen hiivan massan määrä. Trehaloosimäärityksiä varten saostuma osia käsiteltiin, kuten Lillie, S.H. & Pringle, J.R. kuvaavat [(1980) Journal Bacteriology 143, 1384 - 1394]. Pestyt solut rikottiin, siten että ne lietettiin 0 °C:ssa 1 - 4 tilavuuteen HB2M1ED:tä, lisättiin tuoretta PMSF - pepstatiinin kantaliuosta (1 mg pepstatiini A:ta/ml, 0,1 molaarista PMSF:ää metanolissa), niin että lopullisiksi konsentraatioiksi saatiin 10 μg pepstatiinia/ml ja 1 mmolaarinen konsentraatio PMSF:n suhteen, ja seosta ravisteltiin lasipallojen kanssa kolme yhden minuutin mittaista jaksoa Braun Mk II -homogenointilaitteessa tai (määriä, jotka olivat pienempiä kuin 0,3 g

tuoretta hiivaa) vortexilla Eppendorf-putkessa. Lasipallot poistettiin ja homogenaatin tilavuus mitattiin. SDS-PAGEa varten näytteet valmistettiin heti, siten että ne laimennettiin Laemmlin näytepuskurilla [Laemmli, U.K. (1970) Nature, Lontoo, 227, 680-685]. Sitten homogenaatit sentrifugoitiin edellä esitetyllä tavalla (tavallisesti 5 minuuttia nopeudella 5000 g tai 20 minuuttia nopeudella 29 000 g). Homogenaateista ja supernatanteista määritettiin entsyymi ja supernatanteista määritettiin proteiini A280- ja A260-mittauksista.

Taulukko 1. Tärkeiden kantojen ja plasmidien luettelo Saccharomyces cerevisiae

Nimi	Kuvaus	Lähde
X2180 (ATCC 26109)	Standardi laboratoriohiiva (diploidinen)	-
S288C (ATCC 26108)	Standardi laboratoriohiiva (haploidinen)	-
Klg 102	cif1-102, leu1, ura1, trp5, MATα	1
MV6807	fdp1, leu2, ura3, his3, lys2, ade8, trp1, MATα	2
S150-2B	leu2, his3, trp1, ura3, Mata	-
ALKO3569	tss1::LEU2 (S150-2B:stä)	Tämä työ
ALKO3570	tss1::LEU2 (S150-2B:stä)	Tämä työ
WDC-3A	cif1::HIS3, his3, ura3, ade2, MATα	3

Escherichia coli

HB101 (ALKO 683)

Nimi	Kuvaus	Lähde
ALKO3566	HB101, joka sisältää pALK752:n	Tämä työ
ALKO3568	HB101, joka sisältää pALK754:n	Tämä työ

Plasmidit

Nimi	Kuvaus	Lähde
pALK751 (DSM 6928)	pBluescript, joka sisältää 8,2 kb:n mittaisen insertin, jossa on TSL1	Tämä työ
pALK752	pBluescript, joka sisältää 2,5 kb:n mittaisen insertin, jossa on TSS1	Tämä työ
pALK753	pBluescript, joka sisältää 3,3 kg:n mittaisen insertin, jossa on TSL1:n ORF	Tämä työ
pALK754	pBluescript, joka sisältää 4,4 kb:n mittaisen insertin, jossa on TSL1	Tämä työ
pALK756 (DSM 7425)	pBluescript, joka sisältää 3,5 kb:n mittaisen insertin, jossa on ainakin TSL2:n osa	Tämä työ
pALK757	pBluescript, joka sisältää insertin, jossa on ainakin TSL1:n ORF	Tämä työ
pMB14	YEp352, jossa on CIF1	3

Lähteet: 1. Tohtori D. Fraenkel, Harvard Medical School, USA.
2. Tohtori J. Thevelein, Lab voor Plantenbioch., Heverlee, Belgia.
3. Tohtori C. Gancedo, CSIC, Madrid, Espanja.

Entsyymimääritykset. Standardi TPP- ja TPS-määritykset ja muut kineettiset määritykset suoritettiin, kuten Londesborough & Vuorio kuvaavat [(1991) samassa paikassa], paitsi että standardi TPS-määritysseos sisälsi 5 mmoolia F6P:a, ellei muuten mainita. Silloin kun oli sopivaa, TPS-määritykset korjattiin, siten että mitattiin UDP:n tuotto UDPG:stä G6P:n ja F6P:n poissaollessa.

DNA-manipulaatiot. Isäntäbakteereina käytettiin Stratagenen (La Jolla, Kalifornia) Escherichia colin kantaa XL-1 Blue {recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F' proAB, lacIq ADM15, Tn10 (tetR)]}. Tarvittaessa XL-1 Blue -solut tehtiin kelvollisiksi Mandelin & Higan menetelmällä (1970) Journal of Molecular Biology 53, 159 - 162]. Kloonausvektori oli Stragenen Lambda Zap II, jota ennalta oli käsitelty EcoRI:llä ja jossa kloonauskohta on ß-galaktosidaasin suhteen lähellä geenin N-päätä, mikä täten tekee mahdolliseksi valita yhdistelmäkloonit värin perusteella. Käytettiin myös sekvensointivektoreita M13mp18 ja M13mp19, jotka ovat Pharmacia LKB Biotechnologyltä.

Suurimolekyylimassainen DNA, joka on peräsin haploidiselta kannalta S288C, valmistettiin Johnston, J. R.:n kuvaamalla tavalla [(1988), julkaisussa Yeast, A Practical Approach, IRL Press, Oxford] ja se pilkottiin osittain joko HaeIII- tai EcoRI-restriktioentsyymillä. Suuressa mittakaavassa suoritettavaa HaeIII-käsittelyä varten esimerkiksi 330 µl:n suuruista reaktioseosta, joka sisälsi 30 µg DNA:ta ja 4,8 U entsyymiä, inkuboitiin 37 °C:ssa 60 minuutin ajan. Reaktio pysäytettiin 10 µl:lla 0,5-molaarista EDTA:ta ja reaktioseos siirrettiin jäihin. Tällaiset entsyymikäsittelymenetelmät sekä agaroosigeelielektroforeesianalyysit ovat tekniikan tason mukaisia ja

hyvin tunnettuja, ja esimerkiksi Sambrook et al. kuvaavat niitä kirjassa Molecular Cloning, A Laboratory Manual [Cold Spring Harbor Laboratory Press, toinen painos, (1989)].

Plasmidi-DNA eristettiin standardimenetelmin, jotka Sambrook et al. ovat julkaisseet pienessä mittakaavassa suoritettavalle puhdistukselle [(1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, toinen painos, Cold Spring Harbor Laboratory Press, tässä yhteydessä nimenomaan sisällytetty viitteenä]. Plasmidi-DNA puhdistettiin suuressa mittakaavassa Diagenin Qiagen tip-100-pylväissä niiden valmistajan ohjeiden mukaan.

DNA-sekvenssit määritettiin joko manuaalisesti dideoksiketjun lopettamismenetelmällä [Sanger et al. 1977) Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 74, 5463-5467], sekvensoimalla suoraan pBluescript-plasmideista tai automaattisesti Applied Biosystems Model 373A:n automaattisella sekvensointilaitteella, siten että sekvensoitiin suoraan näistä plasmideista tai M13-alaklooneista.

Southern- ja Western-hybridisaatiot ja muut standardimanipulaatiot suoritettiin hyvin tunnetuin menetelmin [katso esimerkiksi Sambrook et al. (1989) samassa paikassa].

Esimerkki 1. Intaktin trehaloosisyntaasin puhdistus

Intakti trehaloosisyntaasi puhdistettiin kaupallisesta leivinhiivasta. "Proteolyyttisesti aktivoidun TPS/P":n puhdistusmenetelmää, jota Londesborough & Vuorio kuvasivat [(1991) samassa paikassa], muunnettiin seuraavalla tavalla:

1. Kaikki puskurit sisälsivät 2 mmolaarista $MgCl_2$:a ja 1 mmolaarista EDTA:ta. Tämä lisäsi saantoja aiemmissa vaiheissa ja luultavasti auttoi vähentämään proteolyysiä myöhemmissa vaiheissa.

2. Ensimmäisessä ammoniumsulfaattifraktioinnissa lisättiin EDTA:n konsentraatio 2,5 mmooliin saakka, ennen kuin ammoniumsulfaatti lisättiin.

3. Kaikki puskurit säädettiin PMSF:n konsentraatioon 0,4 - 1 mM ja pepstatiinin konsentraatioon 4 - 10 µg/ml, siten että välittömästi ennen käyttöä lisättiin juuri valmistettua varastoliuosta, joka sisälsi pepstatiini A:ta 1 mg/ml ja 0,1 molaarista PMSF:a metanolissa (nimitetty PMSF-pepstatiinivarastoliuokseksi). Kun puskureita käytettiin usean tunnin ajan, kuten esimerkiksi kromatografiassa, PMSF-pepstatiinivarastoliuosta lisättiin ajoittain, mutta niin ettei metanolin määrä puskurissa ylittänyt 1,5 prosenttia, tai otettiin käyttöön tuore puskurierä, koska PMSF:n puoliintumisaika vesiliuoksessa on lyhyt. Ennen entsyymin panoa kaikki pylväät tasapainotettiin ainakin yhdellä pakatun kolonnin tilavuudella puskuria, joka sisälsi PMSF:a ja pepstatiini A:ta.

4. Koe salli, että entsyymiä sisältävät jakeet (kaikkiaan 17,8 ml taulukon 2 mukaisessa valmisteessa), jotka saatiin hepariini-Sepharosesta, identifioitiin niin pian kuin ne eluoituivat. Jakeisiin lisättiin välittömästi PMSF-pepstatiinivarastoliuosta (150 µl) ja 0,1-molaarista EDTA:ta (200 µl). Sitten lisättiin hitaasti (yli 20 minuutin kuluessa) 7,2 g jauhemaista ammoniumsulfaattia. 30 minuutin mittaisen tasapainotuksen jälkeen seosta sentrifugoitiin 15 minuutin ajan nopeudella 28 000 g. Saostumia tiivistettiin sentrifugoimalla niitä 5 minuutin ajan 28 000 g:ssä ja ulos puserrettu puskuri poistettiin Pasteur-pipetillä. Sakat liuotettiin 2,0 ml:aan HB2M1ED:tä, joka sisälsi 0,8 mmoolia PMSF:a ja pepstatiini A:ta 8 µg/ml, niitä sentrifugoitiin 5 minuutin ajan nopeudella 28 000 g ja ne pantiin Sepharose 6B -pylvääseen, joka juuri oli tasapainotettu HB2M1ED:llä, joka sisälsi 50 mmoolia NaCl:a, 0,4 mmolaarista PMSF:a ja pepstatiini A:ta 4 µg/ml. Aikaväli hepariini-Sepharosesta tapahtuvan eluoinnin ja Sepharose 6B -pylvääseen panon välillä oli 5 tuntia. Londesboroughin & Vuorion [(1991) samassa paikassa] menetelmässä

hepariini-Sepharose-eluaatteja varastoitiin noin 3 °C:ssa, lisäämättä niihin PMSF:a tai pepstatiini A:ta, viiden päivän ajan ennen toista ammoniumsulfaattifraktiointia ja Sepharose 6B -pylvääseen panoa.

5. Sepharose 6B -pylväästä saadut jakeet (3,7 ml) sekoitettiin välittömästi 20 µl:n kanssa PMSF-pepstatiinivarastoliuosta ja sitten ne määritettiin. Koe teki mahdolliseksi myös yhdistää oikeat jakeet aktiivisuuden ja A280-mittausten perusteella ilman SDS-PAGE-analyysiä, ja ne pantiin välittömästi UDP-glukuronaatti-agaroosipylvääseen, joka oli tasapainotettu HB2M1ED:llä, joka sisälsi 50 mmolaarista NaCl:a, 0,4 mmolaarista PMSF:a sekä pepstatiini A:ta 4 µg/ml. Entsyymi eluoitiin, kuten Londesborough & Vuorio ovat kuvanneet [(1-991) samassa paikassa], ja kuhunkin 1,7 ml suuruiseen jakeeseen lisättiin 10 µl PMSF-pepstatiinivarastoliuosta. Kukin jae jaettiin kolmeen osaan. Kaksi osaa säilytettiin -70 °C:ssa ja yksi 0 °C:ssa.

Taulukko 2 esittää yhteenvedon puhdistuksesta, ja kuva 1 esittää SDS-PAGE-analyysiä jakeille, jotka eluoituivat UDP-glukuronaatti-agaroosista. Mitään luonnostaan lankeavia eroja ei ilmennyt entsyymin välillä, joka eluoitui 0,2-molaarisella NaCl:lla, ja sen entsyymin välillä, joka eluoitui 10-mmolaarisella UDPG:llä, joka oli 0,4-molaarinen NaCl:n suhteen. Päävyöhykkeiden molekyylimassat olivat 57, 99 ja 123 kDa. Useita heikompia vyöhykkeitä oli 123 kDa:n ja noin 90 kDa:n suuruisten vyöhykkeiden välissä. Nämä 123 kDa ja 99 kDa suuruiset ja useimmat, joskaan ei kaikkia, tämän alueen heikommista vyöhykkeistä tunnistettiin Western-analyysissä anti-TPS/P- ja anti-93K-seerumeilla. Tämä tuntuu osoittavan, että heikommat vyöhykkeet ovat osittain pilkkoutuneita pitkiä ketjuja. Heikot vyöhykkeet 68 kDa:n kohdalla reagoivat myös anti-93K-seerumin kanssa, mutta ne voitiin poistaa kromatografialla, joka suoritettiin DEAE-selluloosalla (katso esimerkki 9). Kun vasta-aineet anti-93K-seerumista, joka sitoutui 99 kDa suuruiseen vyöhykkeeseen, eluoitiin nitrosellu-

loosatäplästä [kuten Pringle, J.R. (1991) kuvaavat kirjassa Methods in Enzymology 194, 565-590] ja niillä tutkittiin toinen täplä, ne sitoutuivat myös 123 kDa suuruiseen vyöhykkeeseen, mikä osoitti, että trehaloosisyntaasin kahdella pitkällä ketjulla on yhteisiä epitooppeja.

Intakti entsyymi sitoutuu heikommin UDP-glukuronaattiagaroosiin kuin typistetty entsyymi, jonka Londesborough & Vuorio puhdistivat [(1991) samassa paikassa], ja entsyymin osa, joka 0,2-molaarisella NaCl:lla jäi sitoutuneeksi, vaihteli valmisteesta valmisteeseen. Kun taulukon 2 jae #9 ajettiin uudelleen samassa pylväässä, 0,2-molaarisella NaCl:lla saatiin takaisin 76 prosenttia TPS-aktiivisuudesta (ja 25 prosenttia 0,4-molaarisella NaCl:lla - 10-mmollaarisella UDPG:llä), joten pylvään ylikuormitus ei ole syy siihen, että tämä entsyymi eluoitui 0,2-molaarisella NaCl:lla. Kuitenkin kun sellainen entsyymi, joka eluoitui 0,2-molaarisella NaCl:lla, typistettiin trypsiinillä, kuten esimerkissä 10 kuvataan, se sidottiin sitten pylvääseen 0,2-molaarisessa NaCl-konsentraatiossa ja saatiin takaisin ainostaan 0,4-molaarisella NaCl:lla - 10-mmolaarisella UDPG:llä. Sen lisäksi että tämä typistäminen muuttaa entsyymin kineettisiä ominaisuuksia (katso esimerkit 10 &12), se lisää myös entsyymin affiniteettia UDP-glukuronaatti-agaroosipylvääseen. Luultavasti tekijöissä on hienoja eroja, kuten esimerkiksi hankitun proteolyysin määrässä ja aggregaatiotilassa niiden entsyymien välillä, joista toinen eluoitui 0,2-molaarisella NaCl:lla ja toinen jäi sidotuksi. Taulukossa 2 yhteenvetona esitetyllä valmisteella standardi TPP- ja standardi TPS-aktiivisuuksien suhde kasvoi 22 prosentista, joka oli jakeella #9, 39 prosenttiin, joka havaittiin jakeella #14, mikä osoittaa sen, että on olemassa eroja, vaikkakaan niitä ei voitu selvästi havaita SDS-PAGE:lla.

Nämä havainnot tuovat esille, että erittäin puhtaalla trehaloosisyntaasilla, joka sisältää 57 kDa mittaisen lyhyen ketjun, 123 kDa mittaisen pitkän ketjun sekä 99 kDa mittaisen

polypeptidin, jonka anti-93K-seerumin tunnistaa, on sekä TPS-aktiivisuutta, joka aktivoituu TPS-aktivaattoriproteiinilla (tai F6P:llä), että TPP-aktiivisuutta. 1-millimolaarisen G6P:n hydrolyysinopeus joko fosfaatti- tai HEPES-puskurissa oli pienempi kuin yksi prosentti siitä aktiivisuudesta, joka oli 0,5-mmolaarisella trehaloosi-6-fosfaatilla, joten TPP-aktiivisuus on erittäin spesifistä. Odottamaton havainto on, että tämä erittäin hyvin puhdistettu valmiste sisältää 99 kDa mittaisen polypeptidin, joka ei ole läsnä puhdistetussa, typistetyssä trehaloosisyntaasissa. Myöhemmin julkistetaan, että tämä polypeptidi ei ole pitkän ketjun (123 kDa) hajoamistuote, kun taas typistetyn entsyymin 86 ja 93 kDa mittaiset polypeptidit sisältävät aminohapposekvenssejä, jotka tunnistavat ne pitkän (123 kDA) ketjun fragmenteiksi. Tällä uudella valmisteella on joitakin odottamattomia katalyyttisiä ominaisuuksia, joita kuvataan yksityiskohtaisemmin esimerkissä 11.

Taulukko 2. Intaktin trehaloosisyntaasin puhdistus

Valmiste on peräisin 60 g:sta puristettua leivinhiivaa. TPS-aktiivisuudet "ilman aktivaattoria" mitattiin, kuten Londesborough & Vuorio kuvasivat [(1991) samassa paikassa], ilman F6P:a. Määritykset "aktivaattorin kanssa" suoritettiin samalla tavalla, mutta siten että läsnä oli kyllästävä määrä TPS-aktivaattoria (samanlaisia arvoja saatiin, kun joitakin jakeita myöhemmin määritettiin 5-mmolaarisen F6P:n läsnäollessa TPS-aktivaattorin sijaan, ja ne esitettään suluissa). ND = ei määritetty.

Taulukko 2

Jae	Tilavuus	Ilman aktivaatt.			Aktivaattorin kanssa		
	(ml)	U/ml	U/mg	Koko-nais-U	U/ml	U/mg	Koko-nais-U
1. $(NH_4)_2SO_4$-saostuma	13,4	58	1,0	810	ND	ND	ND[b]
G-25-eluaatti	22,2	30	1,1	668	ND	ND	ND
Hepariini-Sepharose-eluaatti	18,2	ND	ND	ND	≈21	≈11	≈380
Sepharose 6B -eluaatti	26	1,4	5,1	36	4,7	17	121
UDP-glukuronaatti-agaroosi-eluaatit: 0,2-molaarisessa NaCl:ssa							
# 9	1,7	4,6	3,1	-	11,5 (12)	12	
# 10	1,7	ND	ND	ND	12,2	21	
# 11	1,7	ND	ND	ND	6,3	23	58
# 12	1,7	ND	ND	ND	3,9 (3,3)	22	

Taulukko 2 (jatkoa)

Jae	Tilavuus	Ilman aktivaattoria			Aktivaattorin kanssa		
	ml	U/ml	U/mg	Koko-nais-U	U/ml	U/mg	Koko-nais-U
0,4-molaarisessa NaCl:ssä - 10-molaarisessa UDPG:ssä							
#13	1,7	2,1	-	-	5,9(6,2)	25 - 30[a]	
#14	1,7	3,7	-	-	9,3	25 - 30[a]	27
#15	1,7	ND	-	-	0,8	-	

[a] Perustuu proteiinipitoisuuksiin, jotka on määritetty Coomassie bluella värjätyistä SDS-PAGE-geeleistä.

[b] Muista valmisteista saadut tulokset osoittavat, että aktiivisuus TPS-aktivaattoriylimäärän (tai 5-mmolaarisen F6P:n) kanssa ei ole tässä vaiheessa enempää kuin 10 prosenttia suurempi kuin aktiivisuus ilman aktivaattoria.

Esimerkki 2. Trehaloosisyntaasin pitkän ja lyhyen ketjun lisääntynyt ilmentyminen S. cerevisiaella glukoosin käytön jälkeen

Kolme 500 ml:n suuruista erää YP:tä - 2-prosenttista glukoosia, joka oli yhden litran vetoisessa ravistelupullossa, siirrostettiin yhdellä millitralla X2180:n suspensiota, jonka A600 oli 1,0, ja sitä ravisteltiin nopeudella 200 kierrosta minuutissa 30 °C:ssa. Solut koottiin ajankohtina, jotka esitetään taulukossa 3, sitten ne rikottiin ja analysoitiin, kuten kuvataan yleisessä materiaaleja ja menetelmiä koskevassa osassa. 28 000 g:llä saatuja supernatantteja säilytettiin viikon ajan -18 °C:ssa, ne sulatettiin ja niitä sentrifugoitiin uudelleen 20 minuutin ajan nopeudella 28 000 g. 150 µl:n suuruiset erät (kukin oli samanarvoinen 53 mg:n kanssa tuoretta hiivaa) sekoitettiin 30 µl:n kanssa anti-TPS/P-seerumia, tasapainotettiin 30 minuutin ajan 0 °C:ssa ja sentrifugoitiin uudelleen 10 minuutin ajan nopeudella 10 000 g. Saostumat pestiin 250 µl:lla HBMED:a ja sitten ne liuotettiin Laemmlin näytepuskuriin ja niille suoritettiin SDS-PAGE (kuva 2). Sellaiset vyöhykkeet, jotka olivat 57, 99 ja 123 kDa:n kohdalla, olivat voimakkaita näytteessä (C), joka saatiin hiivan stationaarikasvuvaiheesta ja näytteessä (B), joka kerättiin välittömästi sen jälkeen, kun glukoosi hävisi viljelyalustasta, mutta ne puuttuivat näytteestä (A), joka oli peräisin 1,2-prosenttisen glukoosin läsnäollessa kasvavasta hiivasta, tai olivat erittäin heikkoja mainitussa näytteessä.

Taulukko 3. TPS- ja TPP-aktiivisuuksien esiintyminen X2180-hiivalla, joka on kasvatettu YP:llä, joka sisälsi 2-prosenttia glukoosia

Entsyymit määritettiin supernatanteista, jotka saatiin sentrifugointinopeudella 28 000 g.

	A	B	C
Ikä (h)	16	18,1	39,0
Jäännösglukoosi (g/100 ml viljelyalustaa)	1,2	≤0,001	≤0,001
Tuore hiivamassa (mg/ml viljelyalustaa)	7,6	14,8	29,5
Trehaloosi (mg/g kuivaa hiivaa)	0,73	3,1	94
TPS (U/g tuoretta hiivaa)	1,2	7,4	10,5
TPP (U/g tuoretta hiivaa)	0,29	2,2	3,0
TPP/TPS (%)	24	30	29

Kontrollikokeet (ei esitetty) ilmaisivat, että ennen immunisointia otettu seerumi ei saostanut vyöhykkeitä 57, 99 ja 123 kDa ja että 50 µl seerumia 30 µl:n sijasta ei saostanut näytteestä C isompia määriä näistä kolmesta vyöhykkeestä.

Nämä tulokset osoittavat, että TPS- ja TPP-aktiivisuuksien tasavertaisen, 7-kertaisen lisäyksen jälkeen, joka tapahtuu lyhyemmässä ajassa kuin kahden tunnin kuluessa siitä, kun

glukosi häviää viljelyalustasta, suurenevat hiivan niiden kolmen polypeptidin määrät, joiden massat ovat 57, 99 ja 123 kDa ja jotka saostuvat immunologisesti anti-TPS/P-seerumilla. Nämä polypeptidit ovat ne, jotka esiintyvät koskemattomassa trehaloosisyntaasissa, esimerkissä 1. Täten entsyymiproteiinin määrän lisääntyminen on eräs päämekanismi sille, miten hiivan kapasiteetti syntetisoida trehaloosia suurenee.

Esimerkki 3 Trehaloosisyntaasin erilaisista polypeptideistä eristettyjen peptidien N-terminaalisen aminohapposekvenssin määrittäminen

Typistetyn trehaloosisyntaasin 57, 86 ja 93 kDa suuruiset polypeptidit erotettiin SDS-PAGE:lla, pilkottiin nitroselluloosabloteilla ja fraktioitiin HPLC:llä, kuten Londesborough & Vuorio kuvaavat [(1991) samassa paikassa]. Nämä polypeptidit ja polypeptidit, joiden molekyylimassat olivat 57, 99 ja 123 kDa:ta, jotka immuunisaostettiin hiivauutteista, kuten esimerkissä 2 kuvataan, erotettiin SDS-PAGE:lla ja pilkottiin geelissä lysyyliendopeptidaasi C:llä, kuten Kawasaki, H. Emori, Y. ja Suzuki, K. (painossa) kuvaavat. Saadut peptidit erotettiin HPLC:llä, siten että käytettiin DEAE-esipylvästä ennen käänteisfaasipylvästä, oleellisesti siten kuin Kawasaki et al. kuvaavat [(1990) Analytical Biochemistry 186, 264-268]. 99 kDa:n suuruinen polypeptidi, joka eristettiin fosfoselluloosakromatografian avulla, siten että Tritonia ei ollut läsnä (katso esimerkki 9), pilkottiin lysyyliendopeptidaasi C:llä ja peptidit erotettiin HPLC:llä. Kaikissa tapauksissa peptidit sekvensoitiin kaasu-nestepulssisekvensointilaitteella, kuten Kalkkinen, N. & Tilgman, C. kuvaavat [(1988) Journal of Protein Chemistry 7, 242-243], vapautuneet PTH-aminohapot analysoitiin sekvensointilaitteeseen kytketyllä, ohutkolonnisella käänteisfaasinestekromatografialla, jolla on suuri erotuskyky. Sekvenssit esitetään taulukossa 4.

Taulukko 4. Trehaloosisyntaasin polypeptideistä (polypeptidien fragmenteista) eristettyjen peptidien N-terminaaliset aminohapposekvenssit

Kun kaksi sekvenssiä saatiin samasta HPLC-piikistä, ne esitetään a- ja b-sekvensseinä, siellä missä mahdollista, geeneistä ennustettujen sekvenssien mukaan. Tunnustelevat identifioinnit aminohapposekvensointilaitteesta esitetään yksikirjaimisin koodein, joita seuraa kaksi kysymysmerkkiä. Identifioimattomat tähteet esitetään Xaa:lla. (Myös tunnustelevasti identifioidut tähteet merkitään sekvenssiluettelossa Xaa:lla). Sekvenssin alapuolella esitetään kunkin aminohapposekvenssin sijainti kuvioiden 3b ja 4b lyhyissä (S) ja pitkissä (123 kDa) (L) ketjuissa.

Lyhytketjuiset (57) peptidit

Tryptiset peptidit sellaisten 57 kDa mittaisten polypeptidien bloteista, jotka on saatu typistetystä trehaloosisyntaasista.

848 Tyr-Ile-Ser-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 5) (S 463-66)

850 Asp-Val-Glu-Glu-Tyr-Gln-Tyr-Leu-Arg
(Sekvenssin identifiointinumero 6) (S 333-41)

859 His-Phe-Leu-Ser-Ser-Val-Gln-Arg
(Sekvenssin identifiointinumero 7) (S 223-30)

862a Val-Leu-Asn-Val-Asn-Thr-Leu-Pro-Asn-Gly-Val-Glu-Tyr-Gln
(Sekvenssin identifiointinumero 8) (S 231-44)

862b Ser-Val-Val-Asn-Glu-Leu-Val-Gly-Arg
(Sekvenssin identifiointinumero 9) (S 342-50)

863 Leu-Tyr-Lys
(S 460-2)

864	Glu-Thr-Phe-Lys (Sekvenssin identifiointinumero 10)	(S 280-3)
866	Leu-Asp-Tyr-Ile-Lys (Sekvenssin identifiointinumero 11)	(S 294-8)
870	Ile-Leu-Pro-Val-Arg (Sekvenssin identifiointinumero 12)	(S 196-200)

Immuunisaostetun, 57 kDa suuruisen peptidin muodostaman vyöhykkeen pilkkoutumistuotteista, jotka on saatu lysyylipeptidaasi C:llä

966a	Glu-Val-Asn-Xaa-Glu-Lys (Sekvenssin identifiointinumero 13)	(S 454-9)
966b	Phe-Tyr-Asp-Xaa-L?? (Sekvenssin identifiointinumero 14)	(ei löydetty)
980	Leu-Xaa-Ala-Met-Glu-Val-Phe-Leu-Asn-Glu-Xaa-Pro-Glu (Sekvenssin identifiointinumero 15)	(S 304-16)
981	Tyr-Thr-Ser-Ala-Phe-Trp-Gly-Glu-Asn-Phe-Val-Xaa-Glu-Leu (Sekvenssin identifiointinumero 16)	(S 467-80)
987	Phe-Gly-Xaa-Pro-Gly-Leu-Glu-Ile-Pro (Sekvenssin identifiointinumero 17)	(S 63-71)

Pitkäketjuiset (123 kDa) peptidit

Tryptiset peptidit, jotka on saatu 86 and 93 kDa mittaisten fragmenttien bloteista.

889 D??-Gly-Ser-Val-Met-Gln
(Sekvenssin identifiointinumero 18) (L 587-592)

890/891 Leu-Pro-Gly-Ser-Tyr-Tyr-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 19) (L 917-23)

892a Ala-Ile-Val-Val-Asn-Pro-Met-Asp-Ser-Val-Ala
(Sekvenssin identifiointinumero 20) (katso peptidi 1299)

892b Met-Ile-Ser-Ile-Leu
(Sekvenssin identifiointinumero 21) (L 842-7)

Yhdistettyjen 86 ja 93 kDa:n mittaisten fragmenttien pilkkoutumistuotteesta, jotka on saatu lysyyliendopeptidaasilla.

1171 Arg-Arg-Pro-Gln-Trp-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 22) (L 770-5)

86 kDa:n suuruisen fragmentin pilkkoutumistuotteesta, joka on saatu lysyyliendopeptidaasilla.

1479 Thr-Leu-Met-Glu-Asp-Tyr-Gln-Ser-Ser-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 52) (L 816-26)

1483a Ala-Phe-Glu-Asp-His-Ser-Trp-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 78) (L 445-52)

1483b Ala-Gly-His-Ala-Ile-Val-Tyr-Gly-Asp-Ala-Thr-Ser-Thr-Tyr-Ala-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 79) (L 1064-79)

1481 Glu-Arg-Leu-Pro-Gly-Ser-Tyr-Tyr-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 80) (L 914-23)

93 kDa:n suuruisen fragmentin pilkkoutumistuotteesta, joka on saatu lysyyliendopeptidaasilla.

1480 Thr-Leu-Met-Glu-Asp-Tyr-Gln
(Sekvenssin identifiointinumero 81) (L 816-23)

1484a Ala-Phe-Glu-Asp-His-Ser-Trp-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 78) (L 445-52)

1484b Ala-Gly-His-Ala-Ile-Val-Tyr-Gly-Asp-Ala-Thr-Ser-Thr-Tyr-Ala-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 79) (L 1064-79)

1485 Glu-Arg-Leu-Pro-Gly-Ser-Tyr-Tyr-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 80) (L 914-23)

Immuunisaostetun 124 kDa:n mittaisen vyöhykkeen pilkkoutumistuotteista, jotka on saatu lysyyliendopeptidaasilla

1047 Ser-D??-Pro-Gln-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 23) (ei löydetty)

1048 Phe-Tyr-Arg-Asn-Leu-Asn-Gln-Arg-Phe-Ala-Asp-Ala-Ile-Val-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 24) (L 453-67)

1054a Asp-Gly-Ser-Val-Met-Gln-W??-Xaa-Gln-Leu-I??
(Sekvenssin identifiointinumero 25) (L 587-97)

1054b Asn-Ala-Ile-Asn-Thr-Ala-Val-Leu-Glu-Asn-Ile-Ile-Pro-H??-Xaa-H??-Val-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 26) (L 360-77)

1061 Leu-Val-Asn-Asp-Glu-Ala-Ser-Glu-Gly-Gln-Val-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 27) (L 1052-63)

1063 V??-Gln-Asp-Ile-Leu-Leu-Asn-Asn-Thr-Phe-N??
(Sekvenssin identifiointinumero 28) (ei löydetty)

1375 Phe-Leu-Val-Glu-Asn-Pro-Glu-Tyr-Val-Glu-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 50) (L 629-39)

1376 R??-Ile-Thr-Pro-His-Leu-Thr-Ala-Xaa-Ala-Ala
(Sekvenssin identifiointinumero 51) (L 245-55)

1377 Thr-Leu-Met-Glu-Asp-Tyr-Gln-Ser-Ser-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 52) (L 816-26)

1378-I Ile-Leu-Glu-Gly-Leu-Thr-Gly-Ala-Asp-Phe-Val-Gly-Phe-Gln-Thr
(Sekvenssin identifiointinumero 53) (L 521-35)

1378-II Gln-Ile-Leu-Xaa-Pro-Thr-Leu-Xaa-Tyr-Gln-Ile-Pro-Asp-Asn
(Sekvenssin identifiointinumero 54) (L 427-40)

1380 Phe-Gly-Gly-Tyr-Ser-Asn-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 55) (L 319-25)

1381 Phe-Xaa-Thr-Glu-Asn-Ala-Glu-Asp-Gln-Asp-Xaa-Val-Ala-Xaa-Val-Ile-Gly-G??-Ala-Ile-Xaa-Xaa-Ile
(Sekvenssin identifiointinumero 56) (L 931-53)

1382 Xaa-Val-Gly-Thr-Val-Gly-Ile-Pro-Thr-Asp-Glu-Ile-Pro-Glu-Asn-Ile-Leu-Ala
(Sekvenssin identifiointinumero 57) (L 378-95)

99 kDa:n mittainen polypeptidi

Immuunisaostetun, 99 kDa suuruisen polypeptidin muodostaman vyöhykkeen pilkkoutumistuotteista, jotka on saatu lysyylien-dopeptidaasilla

959 Asp-Thr-Thr-Gln-Thr-Ala-Pro-Val-T??-Asn-Asn-Val-Xaa-Pro
(Sekvenssin identifiointinumero 29)

961 Asn-Gln-Leu-Asp-Ala-A??-Asn-Tyr-Ala-Glu-Val
(Sekvenssin identifiointinumero 30)

1002a Asn-Leu-Ser-Arg-Trp-Arg-Asn-Tyr-Ala-Glu
(Sekvenssin identifiointinumero 31)

1002b Trp-Gln-Gly-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 32)

1043 Ile-Gln-Leu-Gly-Glu-Ser-Asn-Asp-Asp-D??-L??
(Sekvenssin identifiointinumero 33)

1055 Glu-Val-Pro-Thr-Ile-Gln-Asp-Xaa-Thr-Asn-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 34)

1287 Xaa-Tyr-Xaa-Tyr-Val-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 35)

1297a Asn-Gln-Leu-Gly-Asn-Tyr
(Sekvenssin identifiointinumero 36)

1297b Val-Ala-Leu-Thr
(Sekvenssin identifiointinumero 37)

1299 Asp-Ala-Ile-Val-Val-Asn-Pro-Xaa-Asp-Ser-Val-Ala
(Sekvenssin identifiointinumero 38)

1306 Ser-Leu-Leu-Asp-Ala-Gly-Ala-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 44)

1307a Glu-Lys-Pro-Gln-Asp-Leu-Asp-Asp-Asp-Pro-Leu-Tyr-Leu-Thr
(Sekvenssin identifiointinumero 45)

1307b D??-Gln-Xaa-His-Gln-Asp-Xaa-Xaa-Asn-Leu-Thr
(Sekvenssin identifiointinumero 46)

1308 Phe-Asn-Asp-Glu-Ser-Ile-Ile-Ile-Gly-Tyr-Phe-P??-Xaa-Ala-Pro
(Sekvenssin identifiointinumero 47)

1309 Ser-Arg-Leu-Phe-Leu-Phe-Asp-Tyr-Asp-Gly-Thr-Leu-Thr-Pro
(Sekvenssin identifiointinumero 48)

Fosfoselluloosalla puhdistettu 99 kDa:n suuruinen proteiini, joka on saatu lysyyliendopeptidaasin avulla

1451 Gln-Leu-Gly-Asn-Tyr-Gly-Phe-Tyr-Pro-Val-Tyr
(Sekvenssin identifiointinumero 49)

Lukuun ottamatta peptidiä 966b, kaikki aminohapposekvenssit, jotka määritettiin lyhyen ketjun näytteistä, paikannettiin proteiinisekvenssissä, joka pääteltiin TSS1-geenistä (katso kuva 3b). Paitsi peptidejä 892a, 1047 ja 1063, kaikki aminohapposekvenssit, jotka määritettiin pitkän ketjun fragmenteistä, joiden koko oli 86 ja 93 kDa, sekä koskemattomasta, 123 kDa:n mittaisesta pitkästä ketjusta itsestään, on paikanettu proteiinisekvenssissä, joka pääteltiin TSL1:stä. HPLC-profiilit, jotka saatiin 86 kDa:n suuruisen fragmentin pilkkotumistuotteista, olivat oleellisesti samanlaisia kuin ne tulokset, jotka saatiin 93 kDa:n suuruisen fragmentin pilkkoutumistuotteista, kun pilkkomiseen käytettiin joko trypsiiniä tai lysyyliendopeptidaasi C:tä (ei esitetty).

Pilkkoutumistuotteet antoivat samat sekvenssit tai kaksoissekvenssit (peptidiparit 890 & 891; 1479 & 1480; 1483a, b & 1484a, b; 1481 & 1485), jotka vastasivat HPLC-huippuja, jotka saatiin myös 86 ja 93 kDa:n mittaisten polypeptidien pilkkoutumistuotteista. Nämä tulokset osoittavat, että sekä 86 että 93 kDa:n mittaiset polypeptidit ovat peräisin 123 kDa pituisesta ketjusta, jota TSL1 koodittaa. Erityisesti ei ole niin, että jokin näistä fragmenteista olisi peräisin 99 kDa mittaisesta polypeptidistä, vaikka on luultavaa, että vähäinen määrä tällaisen polypeptidin hajoamistuotteita on kontaminaationa (katso myöhempää tekstiä).

TSL1 ei koodita mitään 16 aminohapposekvenssistä, jotka saatiin 99 kDa mittaisesta polypeptidistä. Ne ensimmäiset viisi tähdettä, jotka saatiin peptidistä 1451, joka on peräisin fosfoselluloosalla puhdistetusta 99 kDa mittaisesta polypeptidistä, ovat identtisiä immuunisaostetusta 99 kDa mittaisesta polypeptidistä saadun peptidin 1297a viiden viimeisen tähteen kanssa. Tämä varmistaa sen, että 99 kDa mittainen polypeptidi, joka on hiivauutteista immuunisaostettu anti-TPS/P-seerumilla, on sama kuin 99 kDa mittainen polypeptidi puhdistetussa, koskemattomassa entsyymissä. Nämä tulokset julkistavat, että TSL1 (tai TSS1) ei koodita 99 kDa mittaista polypeptidiä, vaan sitä koodittaa toinen geeni, jota keksijät nimittävät TSL2:ksi.

Intaktin pitkän ketjun (123 kDa) pilkkoutumistuotteissa esiintyvien peptidien 1047 ja 1067 alkuperää ei tunneta. Typistetyn entsyymin pitkän ketjun fragmenteista saatu ainoa peptidi, jota TSL1 ei koodita, on peptidi 892a, joka on peräisin 93 kDa mittaisesta fragmentista. Tämä on identtinen 11 viimeisen täheen kanssa, jotka esiintyvät peptidissä 1299, joka on saatu 99 kDa mittaisesta polypeptidistä. Tämä antaa aiheen olettaa, että 93 kDa mittaista polypeptidiä vastaavaa vyöhykettä kontaminoi vähäinen määrä materiaalia, joka on peräisin 99 kDa mittaisesta polypeptidistä, vaikka tämä polypeptidi itse ei näy typistetyn entsyymin SDS-PAGE-analyysis-

sä. 86 ja 93 kDa suuruisista fragmenteista saatujen pilkkoutumistuotteiden yhtäläiset HPLC-tulokset ja se seikka, että näissä fragmenteissa identifioitiin ainoastaan yksi peptidi, joka on peräisin 99 kDa mittaisesta polypeptidistä, osoittavat, että kontaminaatio on erittäin vähäistä. Tämä julkistaa sen, että toiminnallinen, typistetty trehaloosisyntaasi, jolla on sekä TPS- että TPP-aktiivisuuksia, tarvitsee vain polypeptideitä, joita TSS1 ja TSL1 koodittavat.

Esimerkki 4 TSS1:n kloonaus ja sekvensointi

(a) Hiivan genomisen DNA-kirjaston valmistus ja seulonta

Genominen kirjasto konstruoitiin bakterifaagin lambda-vektorissa Lambda Zap II:ssa, siten että käytettiin S. cerevisiaen kannan S288C kromosomaalisen DNA:n osittaista pilkkoutumistuotetta, joka saatiin HaeIII:lla Stratagenen ohjeen mukaan, joka on esitetty Zap-cDNA-synteesin reagenssipakkausta varten. Kytkentäreaktiossa saatu DNA pakattiin Giga II Gold -pakkausuutteeseen (Stratagene) valmistajan ohjeiden mukaan (1990). Rekombinanttien tiitteri määritettiin Luria-liemilevyillä, jotka sisälsivät X-ß-galaktosidia (5-bromi-4-kloori-3-indoyyli-ß-D-galaktopyranosidia) kromogeenisena substraattina ß-galaktosidaasia varten ja IPTG:tä (isopropyyli-ß-D-tiogalaktopyranosidia) induktorina. Noin 50 000 rekombinanttia lisättiin suurilla (150 mm) NZY-levyillä Stratagenen ohjeiden mukaan. Saadun kirjaston tiitteri oli 5 x 10^9 pfu/ml kaikkiaan 150 ml:ssa.

Useita positiivisia klooneja löydettiin, siten että seulottiin anti-TPS/P-seerumilla. Kolmen puhdistuskerran jälkeen kaikki kloonit olivat positiivisia. Ne seulottiin jälleen, tällä kertaa anti-57K-seerumilla.

DNA:n lisämanipulaatioita varten Lambda-Zap-vektorin plasmidiosa leikattiin pois, kuten kuvataan ohjeessa, joka on laadittu "Predigested Lambda ZapII/EcoR1 Cloning Kit":iä (1989) varten.

(b) TSS1:n sekvensointi

Lambda ZapII -kirjastosta valittiin voimakkaasti positiivinen klooni ja se sekvensoitiin manuaalisesti. Saatu sekvenssi sisälsi avoimen lukuvaiheistuksen, joka kooditti 56 kDa mittaista proteiinia, mutta siitä aminohapposekvenssistä, jota tämä ORF kooditti, ei löytynyt yhtään niistä lyhyistä peptidisekvensseistä, joita julkistetaan esimerkissä 3.

Sen tähden valittiin toinen klooni sellaisesta kloonien ryhmästä, joka antoi erilaisia restriktiokarttoja verrattuna siihen ryhmään, joka sisälsi ensimmäisen kloonin. Tämä toinen klooni reagoi myös heikommin anti-57K-seerumiin, mikä on syynä siihen, ettei sitä valittu ensisijassa. Klooni sekvensoitiin, siten että käytettiin exonukleaasi III/Mung-pavun nukleaasi -järjestelmää, jotta saatiin yksisuuntaisia deleetioita. Nämä deleetiot valmistettiin Stratagenen ohjeen mukaan, joka on laadittu pBluescript Exo/Mung DNA -sekvensointijärjestelmää varten. Plasmidi pilkottiin ensin restriktioentsyymillä SacI, joka jättää jäljelle 3'-ulokkeen, sitten BamHI:llä, joka jättää jäljelle 5'-ulokkeen. Mung Bean -nukleaasin muodostaman, mahdollisen syvennyksen täyttämiseksi lisättiin nick-translaatiopuskuria, 1 μl dNTP:tä (kaikkien neljän dNTP:n seos, jossa kutakin oli 2 mmoolia) sekä 1 μl (2 U) Klenow-fragmenttia. Reaktion annettiin tapahtua 30 minuutin ajan huoneenlämpötilassa ja sitten se pysäytettiin 1 μl:lla 0,5-molaarista EDTA:ta [Sambrook et al. (1989) samassa paikassa]. Deleetioajankohtia vastaavat näytteet ajettiin 0,8-prosenttisella, alhaisessa lämpötilassa sulavalla agaroorigeelillä. Vyöhykkeet leikattiin irti, sulatettiin ja kytkettiin Stratagenen ohjeiden mukaan. Kunkin kytkentäseoksen eriä (5 μl) käytettiin XL-1 Blue -solujen transformointiin.

Kloonin osoitettiin koodittavan lyhytketjuisen peptidin sekvenssejä, jotka julkaistaan esimerkissä 3, lukuunottamatta huonosti määriteltyä pentapeptidiä 966b. On huomattava, että anti-57K-seerumi yksinään oli riittämätön työkalu tämän gee-

nin kloonaamiseen: aminohapposekvenssiä koskevat tiedot, jotka esitetään esimerkissä 3, olivat myös valttämättömiä. Sekvenssien vertailu Microgenic Data Bankin kanssa osoittivat, että kloonin geenisekvenssi oli saatavissa tuntemattomana lukuvaiheistuksena hiivan (S. cerevisiaen) vakuoliperäisen, H^+-ATPaasia vastaavan geenin translaation jälkeiseltä alueelta. Pankin sisältämissä tiedoissa on sekvenssivirheitä, ja täten ne on tulkittu virheellisesti kahdeksi lyhyeksi, tunnistamattomaksi ORF:ksi yhden pitkän ORF:n sijaan. TSS1-geenin täydellinen sekvenssi, jossa on 800 emäsparin mittainen promoottori- sekä 200 emäsparin mittainen terminaattorialue, julkistetaan identifiointinumerona 1 ja sellainen aminohapposekvenssi, joka on päätelty ORF:stään (aloittamalla nukleotidin 796 kohdalta), julkistetaan sekvenssin identifiointinumerona 2. Sekvenssin identifiointinumero 1 sisältää nyt seuraavat pienehköt korjaukset, jotka siihen on tehty helmikuun 14. päivän jälkeen 1992: alkuperäisistä nukleotideistä 60 ja 61 (CA) tulee AC, alkuperäisistä nukleotideistä 646 - 653 (CGCGTGGT) tulee GCCGGG ja alkuperäinen nukleotidi 711 (C) poistetaan. Kuvio 3A esittää promoottori- ja terminaattorialueita, ja kuvio 3b esittää pääteltyä aminohapposekvenssiä.

Esimerkki 5. TSL1:n ja TSL2:n kloonuas ja sekvensointi

(a) Genomisten DNA-kirjastojen valmistus ja seulonta

TSL1-geeni löydettiin ensin samasta kirjastosta, jota kuvataan esimerkissä 4. Seulottiin ensin anti-TPS/P-seerumin avulla ja sitten anti-93K-seerumilla. Myöhemmin konstruoitiin toinen kirjasto S. cerevisiaen kannan S288C kromosomaalisen DNA:n osittaisista pilkkomistuotteista, jotka saatiin EcoR1:llä, ja tällöin käytettiin menetelmiä, joita kuvataan esimerkissä 4. Anti-93K:n suhteen positiiviset kloonit luokiteltiin restriktiokartoituksen avulla ryhmiin, joista kaikki eivät voi esittää TSL1:htä.

(b) TSL1:n sekvensointi

Sellaiset kloonit, jotka olivat HaeIII-kirjastosta anti-93K:n suhteen positiivisten kloonien ryhmästä, sekvensoitiin osittain manuaalisesti ja sitten automaattisesti pBluescriptin eksonukleaasideleetiosarjoista, kuten esimerkissä 4 kuvataan.

HaeIII-kloonit eivät sisältäneet kokonaan tätä pitkää geeniä, ja mistään kloonista ei löydetty N-päätettä. Sen tähden konstruoitiin uusi EcoR1-kirjasto, ensin anti-93-seerumin avulla ja sitten nukleotidikoettimien kanssa, jotka olivat peräisin TSL1:n sekvensoiduista osista.

Saatiin useita anti-93K:n suhteen positiivisia klooneja, jotka hybridisoituivat myös nukleotidikoettimien kanssa. Nämä sisälsivät plasmidin, jossa oli 8,2 kb suuruinen insertti. Tästä plasmidista leikattiin 2 kb suuruinen fragmentti, siten että käytettiin restriktioentsyymejä StuI ja ScaI, fragmentti kytkettiin uudelleen pBluescriptin SmaI-kohtaan ja sekvensoitiin, siten että käytettiin eksonukleaasideleetioita. Deleetiot aikaansaatiin entsyymien SacI ja SpeI avulla. Sekvensoitiin automaattisella sekvensointilaitteella. TSL1:n sekvenssi täydennettiin tällä tavalla.

Täydellinen sekvenssi sisältyy 8,2 kb suuruiseen EcoRI-kloonien inserttiin, ja se on tallennettu helmikuun 18. päivänä 1992, plasmidi pALK751:nä kokoelmaan Deutsche Sammlung von Microorganismen (DSM), Gesellschaft für Biotechnologische Forschung GmbH, Grisebachstr. 8, 3400 Göttingen, Saksa, ja sille on anettu tulonumero DSM 6928.

Sekvenssi esitetään sekvenssin identifiointinumerona 83. Nukleotidit 2282 - 5575 sisältävät ORF:n, joka koodittaa aminohapposekvenssiä, jonka identifiointinumero on 82. Promoottori- ja terminaattorialueet sekä aminohapposekvenssi esitetään myös kuvassa 4. Aminohapposekvenssi sisältää ne aminohapposekvenssit, jotka saatiin trehaloosisyntaasin pitkästä (123

kDa) ketjusta (sen fragmenteista), joka julkistetaan ja jota käsitellään esimerkissä 3.

(c) TSL2:n eristäminen ja sekvensointi

Sellainen informaatio, joka on julkistettu 99 kDa:n suuruisesta polypeptidistä (erityisesti esimerkeissä 1 & 3), antaa alan ammattimiehelle käyttöön TSL2-geenin selviä eristys- ja karakterisointimenetelmiä. Koska anti-93K-seerumi tunnistaa 99 kDa:n mittaisen polypeptidin, yllä kuvatulla tavalla eristetyt anti-93-positiiviset kloonit voivat sisältää klooneja, jotka merkitsevät TSL2:htä. Useita positiivisia klooneja, jotka eivät merkitse TSL1:htä, identifioitiin restriktiokartoituksella. Näistä yksi tallennettiin tammikuun 28. päivänä 1993 plamidina pALK756 (katso taulukko 1) kokoelmaan die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 B, D-3300 Braunschweig, Saksa (tulonumero DSM 7425). Tämä plasmidi sisältää 3,5 kb mittaisen insertin pBluescriptisssä. Restriktioentsyymit NotI, SacI, SpeI tai XhoI eivät pilkkoneet inserttiä. Näiden ja samanlaisten kloonien sekvenssejä voidaan tutkia, jotta identifioidaan ORF, joka koodittaa sellaisten peptidien aminohapposekvenssejä, jotka on eristetty 99 kDa:n mittaisesta polypeptidistä (katso, sekvenssien identifiointinumerot 29 - 38 ja 44 - 49). Toinen hyvin toteutettu menetelmä on käyttää näitä aminohapposekvenssejä sellaisten nukleotidiprimeerien konstruointiin, joita voidaan käyttää TSL2-geenin osien monistamiseen polymeraasiketjureaktiolla. Kun TSL2-geenin osa on eristetty ja sekvensoitu jommalla kummalla menetelmällä, geenin loppuosa voidaan helposti eristää, kuten TSL1:n suhteen kuvataan.

Esimerkki 6. TSS1:n ja TSL1:n luonnehdinta

TSS1:n nukleotidisekvenssi koodittaa 495 aminohappotähteen mittaista polypeptidiä, jonka laskettu molekyylimassa on 56 kDa. Tämä avoin lukuvaiheistus alkaa ATG-kodonilla ja päättyy kahdella TGA-kodonilla. Promoottorialue sisältää TATA-bok-

sin -186:n kohdalla (katso kuva 3) sekä sekvenssin CCCCGC, joka on -270:n kohdalla ja joka voi tuottaa kataboliittirepression [Nehlin & Ronne, (1990) European Molecular Biology Organization Journal 9, 2891-2898]. Tämä voi selittää trehaloosisyntaasin alhaisen ilmentymisen glukoosin läsnäollessa, mikä julkistettiin esimerkissä 2.

TSL1:n avoin lukuvaiheistus koodittaa polypeptidiä, jossa on 1098 aminohappoa, jotka vastaavat 123 kDa suuruista, laskettua molekyylimassaa. Tämä ORF alkaa ATG-kodonilla ja päättyy TAA-kodonilla. Kuusikymmentä emäsparia TAA-kodonista alavirtaan on transkription mahdollinen päättymiselementti TATATA [Russo et al. (1991) European Molecular Biology Organization Journal 10, 563-571].

TSL1:n promoottorisekvenssi sisältää kaksi oletettua TATA-boksia -100:n ja -117:n kohdalla. Promoottori tutkittiin mahdollisten lämpösokkielementtien suhteen ja löydettiin neljä AAGGGG-elementtiä (-166, -180, -232 ja -378). Näistä etäisin ylävirtaan, -378:n kohdalla, oli sekvenssin GGTAAAAGGGGCGAA osa, joka vastaa hyvin lämpösokin aiheuttaman stressin UAS_{-360}-säätelyelementtiä GGTAAGGGGCCAA [Marchler, G. et al. (1992) Yeast 8, S154]. Löydettiin myös kanonisen lämpösokkielementin GAANNTTC kaksi kopiota, yksi -353:ssa ja toinen -425:ssä; täten yksi sijaitsi UAS_{-360}-elementin kummallakin puolella.

Sekvenssi GCCCCTGCATTTT -327:ssä voi olla MIG1-proteiinin sitoutumiskohta (konsensussekvenssi TCCCCRGATTNT). MIG1-proteiini näyttää toimivan glukoosin läsnäollessa transkription repressorina [Nehlin, J.O. & Ronne, H. (1990) European Molecular Biology Organization Journal 9, 2891-2898; Nehlin, J.O. et al. (1991) samassa julkaisussa 10, 3373-3378]. Nämä TSL1:n sekvenssin piirteet esitetään kuviossa 4.

TSL1:n koodittama aminohapposekvenssi sisältää kaksi polyglutamiinijuostetta, neljä Qs-aloituskohtaa aminohapon 42 koh-

dalla ja viisi Qs-aloituskohtaa 164:ssä. Sellaisia runsaasti glutamiinia sisältäviä sekvenssejä on liittynyt heteromeeriseen kahden proteiinin väliseen vuorovaikutukseen [Gancedo, J.-M. (1992) European Journal of Biochemistry 206, 297-313].

Kuvio 5 julkistaa, että koko TSS1-geenillä on aminohappotasolla 37 prosentin yhtäläisyys 502 aminohapon mittaisen pätkän kanssa, joka ovat TSL1:n tuotteen keskikohdalta. Geenit ovat ilmiselvästi erittäin läheisiä.

Mikä on hämmästyttävintä, TSS1-geeni on identtinen CIF1-geenin kanssa, jonka Gancedon ryhmä äskettäin on kloonannut ja sekvensoinut [Gonzales et al. (1992) Yeast 8, 183-192]. Tämä julkistaminen tuo esille sen, että erityistä metodiikkaa tarvitaan sellaisten mutattien käsittelyyn, jotka sisältävät TSS1-geenin muunnettuja muotoja, koska cif1-mutanteilla on vakavia puutteita sokereiden metaboliassa, kuten edellä yksityiskohtaisen kuvauksen yhteydessä esitetään. Se selittää tietenkin myös sen, miksi Klg 102 -mutanteissa ei ole läsnä mitään tunnistettavaa lyhyttä ketjua, jossa cif1-mutaatio on (katso esimerkki 7). Aiemmin on (sanattomasti) oletettu, että cif1- ja fdp1-mutanttien epäonnistuminen ilmentää TPS:n aktiivisuutta on seuraus säätelyefektien pituuskaskadista.

Tässä sekä esimerkissä 7 julkistetut havainnot osoittavat sen, että trehaloosisyntaasin lyhyen ketjun puuttuminen on ensisijainen puute, josta jollain vielä tuntemattomalla tavalla näiden mutanttien muut säätelynpuutteet ovat seurauksina.

S. cerevisiaen kromosomit erotettiin sykekenttäelektroforeesilla, siten että sykeajat olivat 60 sekuntia 15 tunnin ajan ja 90 sekuntia yhdeksän tunnin ajan 200 voltilla, kuten käsikirja suosittelee CHEF-DR II:lle (BioRad Laboratories, Richmond, Kalifornia)]. Geenit paikannettiin, siten että käytettiin digoksigeniinillä leimattuja koettimia, joissa ei ollut radioaktiivisuutta, ja noudatettiin Boehringer Mannheimin

antamia ohjeita. Käytettiin koettimia, jotka olivat seuraavat: TSL1:n DraI-restriktiofragmentti, joka on 2,1 kb suuruinen, ja TSS1:n NarI-SmaI-restriktiofragmentti, joka on 1,9 kb suuruinen (SmaI-kohta on kytkijässä insertin ja vektorin välillä; TSS1:ssä ja TSL1:ssä sijaitsevat tärkeät restriktiokohdat esitetään kuviossa 6). TSS1 paikannettiin yksinomaan kromosomiin 2, joka on siellä, mihin sekä FDP1 [Van de Poll ja Schambert (1977) samassa julkaisussa] että CIF1 [Gonzales et al. samassa julkaisussa] on paikannettu. Tämä julkistus vahvistaa enemmän todisteita sen puolesta, että TSS1 on identtinen CIF1:n ja FDP1:n kanssa. Käyttämällä GalH-geeniä markkerina kromosomille 16 paikannettiin TSL1 yksinomaan kromosomin 13 viereen. Välittömästi TSL1:stä alavirtaan vastakkaisessa suuntauksessa sijaitsee ARGRII-geeni, jonka Messenguy et al. sekvensoivat [(1986) European Journal of Biochemistry 157, 77-81]. Päällekkäin menevän sekvenssin alku esitetään kuviossa 4.

Esimerkki 7. Toiminnallinen TSS1-geeni tarvitaan sekä TPS:n että TPP:n aktiivisuuksien ilmentymiseen

S. cerevisiaen mutantti Klg 102 saatiin Dan Fraenkelilta (Harvard Medical School), ja sillä oli fenotyyppi MATα, ura1, leu1, trp5, cif1-102. Sitä kasvatettiin rutiininomaisesti elatusalustalla, joka sisälsi YP:tä ja kaksi prosenttia galaktoosia tai YP:tä ja 2 prosenttia glukoosia, ja kun varastoitiin pitkiä aikoja, se oli nestemäisen typen alla. Muiden raporttien mukaan [Navon, G., et al. (1979) Biochemistry 18, 4487-4499; Bañuelos, M. & Fraenkel, D.G. (1982) Molecular and Cellular Biology 2, 921-929] tämä mutantti ei kasvaisi alustalla, jossa on YP:tä ja kaksi prosenttia fruktoosia, vaikka palautumat olivat tavallisia.

Kuusi yksittäistä pesäkettä kustakin kahdesta Klg 102:n alakannasta, jotka olivat ALKO 2669 ja ALKO 2670, jotka erosivat palautusmistaajuuden ja pesäkekoon suhteen, siveltiin YP:lle,

joka sisälsi kaksi prosenttia fruktoosia sekä YP:lle, joka sisälsi 2 prosenttia glukoosia, 30 °C:ssa. Kaikki 12 siveltyä viljelmää kasvoivat 45 tunnin kuluttua glukoosilla, vaikka hitaammin kuin kontrollihiiva X2180, mutta mikään niistä ei kasvanut fruktoosilla. Neljän vuorokauden kuluttua viidessä ALKO2669:n sivelyviljelmässä fruktoosilla oli useita suuria, mutta eristettyjä pesäkkeitä, ja yhdellä ALKO 2670:n sivelyviljelmällä oli fruktoosilla useita pieniä pesäkkeitä. Glukoosilevyistä valittiin kustakin alalajista kolme sivelyviljelmää palautumien pienimmän lukumäärän suhteen vastaavalla fruktoosilevyllä, ja niitä käytettiin 100 millitran suuruisten YDP-erien siirrostamiseen, jotka olivat 250 millitran vetoisissa pulloissa, ja niitä kasvatettiin nopeudella 200 kierrosta minuutissa 30 °C:ssa. Kolme rinnakkaista pulloa siirrostettiin X2180:lla. Viljelyalustan A600:aa ja jäännösglukoosia tarkkailtiin ja näytteet siirrostettiin kvantitatiivisesti viljelyalustoille, jotka sisälsivät YP:tä ja 2 prosenttia glukoosia sekä YP:tä ja 2 prosenttia fruktoosia.

ALKO 2669:n viljelmät kasvoivat nopeammin kuin ALKO 2670:n viljelmät, ja molemmat kasvoivat paljon hitaammin kuin X2180 (ei esitetty).

Solut koottiin sopivina ajankohtina, ne rikottiin ja analysoitiin, kuten kuvataan esillä oleva patentin osassa Yleiset materiaalit ja menetelmät. Tulokset esitetään taulukossa 5.

Taulukko 5. Klg 102- ja X2180-kantojen kasvu YPD:llä

Viljeltiin tekstissä kuvatulla tavalla. Glukoosijäännös ja solumassa annetaan vastaavasti g/100 ml ja mg/ml viljelyalustaa. Fosfoglukoisomeraasi (PGI) määritettiin esimerkissä 11 kuvatulla tavalla. PGI, TPS ja TPP annetaan U/g solujen tuorepainoa (TPS määritettiin, siten että läsnä oli 5 mmoolia

F6P:a). Trehaloosi ilmoitetaan mg/g solujen tuorepainoa. Elinkykyisyys Fru/Glu ilmaisee sellaisten solujen lukumäärän, jotka pystyvät kasvamaan fruktoosilla, prosentteina niiden solujen lukumäärästä, jotka pystyvät kasvamaan glukoosilla solujen korjuun ajankohtana. Viljelmistä 2670/1 ja 2670/2 solut koottiin rikkomista ja myöhempää analysointia varten. ND, ei määritetty.

Taulukko 5

Kanta	Ikä	Jäännös-glukoosi	Solumassa	PGI	TPS	TPP	Trehaloosi	Elinkykyisyys Fru/Glu
	(h)	(g %)	(mg/ml)	(U/G)	(U/G)	(U/G)	(mg/g)	(%)
Klg 102 -viljelmät								
2669/1	24	ND	4,3	88	≤ 0,02	ND	ND	2,4
2669/2	48	≤ 0,02	11,6	81	≤ 0,03	0,034	ND	≤ 1,7
2669/3	114	ei mitään	10,3	ND	ND	≤ 0,02	≤ 0,22	≤ 1,8
2670/1	110							1,4
2670/2	110	ei mitään	9,7	89	≤ 0,03	0,081	ND	4,0
2670/4	114	ei mitään	11,2	ND	ND	≤ 0,02	≤ 0,19	≤ 0,3
X2180-viljelmät								
1	24	ND	19,2	93	6,3	1,7	ND	ND
2	110	ei mitään	31,7	126	6,3	2,3	ND	ND
3	114	ei mitään	34,4	ND	ND	2,9	29,3	ND

Nämä tulokset osoittavat, että TPS-aktiivisuus oli ilmaisurajan alapuolella Klg 102:n näytteissä ja vähemmän kuin 0,5 prosenttia arvosta, joka oli X2180:lla, joka on tyypillinen luonnonvarainen S. cerevisiae-tyyppi. Tämä on sopusoinnussa aiemmin selostettujen tulosten kanssa [Paschoalin, V.M.F., et al. (1989) Current Genetics 16, 81-87]. Yllättäen kuitenkin TPP aktiivisuudet olivat erittäin alhaiset, $\leq$ 1 - 5 prosenttia X2180:n arvoista. Vieläpä tämä jäjelle jäänyt kyky hydrolysoida trehaloosi-6-fosfaattia johtuu todennäköisesti epäspesifisestä fosfataasista. Paschoalin et al. [(1989) samassa julkaisussa] väittää, että Klg 102:lta puuttuu spesifisesti UDPG:hen kytketty TPS-aktiivisuus, mutta että luonnonvaraisen hiivatyypin S288C tavoin (joka on X2180:n haploidimuoto) se sisältää ADPG:hen kytkettyä aktiivisuutta. Jos tämä olisi totta ja hyväksytään tavanomainen näkemys, että trehaloosin synteesi hiivassa tapahtuu vapaan trehaloosi-6-fosfaatin välityksellä, Klg 102:n tulisi sisältää merkittävää TPP-aktiivisuutta. Esillä olevat tulokset julkistavat, että näin ei ole asian laita. Tämän lisäksi kun esillä olevan keksinnön yhteydessä tutkittiin, pystyykö luonnonvarainen hiivatyyppi (X2180) syntetisoimaan [^{14}C]-trehaloosia [^{14}C]-G6P:stä UDPG:n tai ADPG:n läsnäollessa, esillä olevat keksijät havaitsivat merkittävää aktiivisuutta vain UDPG:n läsnäollessa. Vandercammen et al. [(1989) samassa paikassa] ovat arvostelleet määritysjärjestelmiä, joita Paschoalin et al. käyttivät, näin ollen esillä olevan keksinnön yhteydessä tutkittiin suoraan kokonaisreaktiota. Hiivauutteita inkuboitiin 40-mmolaarisessa HEPESissä pH 6,8, joka sisälsi 1 mg BSA:a/ml, 10 mmolaarista $MgCl_2$:a sekä 10 mmolaarista [U ^{14}C]-G6P:a (736 iskua minuutissa/nmooli) 5-mmolaarisen UDPG:n tai 2,5-mmolaarisen ADPG:n läsnäollessa tai puuttuessa sekä 5-mmolaarisen K-fosfaatin läsnäollessa tai puuttuessa. Reaktiot pysäytettiin, siten että reaktioseoksia keitettiin kahden minuutin ajan ja niihin lisättiin AG1-X8 (formaatti) -anioninvaihtohartsia, kuten TPP-määritysjärjestelmässä, jota Londesborough & Vuorio

[(1991) samassa paikassa] ovat kuvanneet. Tulokset esitetään kuviossa 7. Ilman UDPG:a tai ADPG:a radioaktiivisuus tuli näkyviin hartsisupernatanteissa, mikä luultavasti johtui fosfataaseista, jotka olivat aktiivisia G6P:tä kohtaan. UDPG lisäsi tätä nopeutta selvästi, kun fosfaatti puuttui ja huomattavasti, kun läsnä oli 5 mmolaarista fosfaattia, joka stimuloi TPP-aktiivisuutta ja inhiboi trehaloosisyntaasin TPS-aktiivisuutta. UDPG:llä ja 5 mmolaarisella fosfaatilla nopeuden lisäys lag-faasin jälkeen vastasi 0,94 µmoolia/minuutti/g tuoretta hiivaa, joka on noin 50 prosenttia tämän hiivan TPP-aktiivisuudesta, kun fosfaatin konsentraatio on 20-mmolaarinen. ADPG ei kuitenkaan merkittävästi lisännyt radioaktiivisuuden ilmestymisnopeutta hartsisupernatantissa, mikä on merkkinä siitä, että mitään ADPG:iin liittyvää aktiivisuutta ei ollut läsnä.

Klg 102- ja X2180-hiivojen homogenaattien Western-blotit esitetään kuviossa 8. D:llä merkitty vyöhykkeiden lähtökohta ei ole selvä: ne saattavat esittää hajonnutta, lyhyttä ketjua. X2180 esittää voimakasta, 57 kDa suuruista vyöhykettä, joka johtuu trehaloosisyntaasin lyhyestä ketjusta, sekä 100 - 130 kDa:n kohdalla useita heikkoja vyöhykkeitä, jotka saattavat johtua pitkän ketjun koskemattomasta muodosta ja typistetyistä muunnoksista. Tämän vastakohtana vaikka Klg 102:n näytteet osoittivat voimakkaampia pitkän ketjun vyöhykkeitä, koska hiivanäytettä pantiin geeliin enemmän, ne eivät osoittaneet jälkeäkään lyhyestä ketjusta. Täten Klg 102 ei sisällä TSS1-geenin tunnistettavaa muotoa (se saattaa sisältää typistetyn muunnoksen, josta puuttuvat epitoopit, joita esillä olevan keksinnön mukaiset vasta-aineet tunnistavat), mutta se sisältää normaaleja määriä TSL1:n tuotetta. Tämän lisäksi TSL1:n tuote näyttää lisäävän Klg 102 -leikkauksina diauksista viivettä (vertaa esimerkiksi kaistoja 3 ja 2 kuviossa 8), mikä viittaa siihen, että trehaloosisyntaasin pitkän ketjun ilmentyminen tässä hiivassa lisääntyy, kun kaikki glukoosi on käytetty. Luonnonvaraisella hiivatyypillä lyhyet ja pitkät

ketjut lisääntyvät samanaikaisesti TPS:n ja TPP:n aktiivisuuksien lisääntymisen kanssa, kun glukoosi on käytetty (esimerkki 2).

Nämä tulokset osoittavat sen, että Klg 102:n kykenemättömyys ilmentää immunologisesti tunnistettavaa trehaloosisyntaasin lyhyttä ketjua korreloi sekä TPS- että TPP-aktiivisuuksien puuttumisen kanssa. Tämä odottamaton ilmiö, joka on vastakkainen Paschoalin et al.:n [(1989) samassa julkaisussa] näkemysten kanssa, ilmaisee sen, että funktionaalinen lyhyt ketju tarvitaan sellaisen trehaloosisyntaasin kokoamiseen, jolla on jompikumpi osittainen aktiivisuus.

Samanlaisia kokeita suoritettiin S. cerevisiaen kannalla MV6807 (saatu Johan Theveleiniltä, Laboratorium voor Moleculaire Celbiologie, Instituut voor Platkunde, Heverlee Belgia), jossa fdp1-mutaatio, joka on alleelinen CIF1:lle sekä TSS1:lle. Tämä kanta kasvoi huonosti glukoosilla (fruktoosia ei tutkittu) ja niin ollen se kasvatettiin galaktoosilla. Stationaarifaasin solut sisälsivät 6 ± 6 prosenttia normaalia TPS:a mutta noin 20 prosenttia normaalia TPP:a. Western-tekniikalla suoritetut analyysit ilmaisivat, että läsnä oli 57 kDa:n suuruinen vyöhyke, jonka anti-57K-seerumi tunnisti, sekä normaalin pitkän ketjun muodostamia vyöhykkeitä, joten mutaation MV6807:ssä täytyy olla aminohapposubstituutio. Tämä substituutio nähtävästi vähentää enemmän TPS:n aktiivisuutta kuin TPP:n aktiivisuutta.

Esimerkki 8. Biokemiallinen todiste sen puolesta, että trehaloosisyntaasin pitkää ketjua tarvitaan TPP:n aktiivisuuteen

Typistetty trehaloosisyntaasi, joka sisältää lyhyen ketjun (57 kDa) sekä 86 ja 93 kDa mittaisten ketjujen fragmentteja, valmistettiin Londesboroughin & Vuorion menetelmän mukaan [(1991) samassa julkaisussa] proteolyyttisesti aktivoitua TPS/P-kompleksia varten. TPS- ja TPP-aktiivisuudet määritet-

tiin, kuten Londesborough & Vuorio kuvaavat [(1991) samassa paikassa]. [N-etyyli-1-^{14}C]-maleimidi (etyylillä leimattu NEM; 40 mCi/mmooli) oli NEC-454 New England Nuclearilta. N-etyyli-[2,3-^{14}C]-maleimidi (NEM, jonka rengas on leimattu; 6 mCi/mmoolia) oli CFA 293 Amersham Internationalilta. Molemmat saatiin liuoksina, jotka olivat n-pentaanissa, ja otaksuttiin, että valmistajan ilmoittamat spesifiset aktiivisuudet olivat oikeat. Leimaamaton N-etyylimaleimidi (NEM) oli E-3876 Sigmalta. Se liuotettiin 25-mmolaarisessa HEPESissä, pH 7,0, välittömästi ennen käyttöä ja standardoitiin mittaamalla sen absorptio 305 nm:ssä olettaen, että E^{mM}:n arvo on 0,62.

Typistetyn trehaloosisyntaasin käsittely 1,9-mmolaarisella NEM:llä 24 °C:ssa noin 0,17-mmolaarisen ditiotreitolin läsnäollessa (joka luultavasti nopeasti kuluttaa noin 0,34 mmoolia NEM:ää) aiheutti nopean ja olennaisesti täydellisen TPP-aktiivisuuden häviön mutta vain vähäisen ($\leq$ 24 prosenttia) pienenemisen TPS:n aktiivisuudessa (kuvio 9). Tämä viittaa siihen, että NEM muuntaa yhtä tai useampaa aminohapposivuketjua (luultavasti kysteiiniä), jonka tulee olla koskematon TPP:n aktiivisuutta mutta ei TPS:n aktiivisuutta varten.

Jotta kvantitatiiviset kokeet olisivat leimatun NEM:n alhaisilla konsentraatioilla mahdollisia, entsyymipreparaattien sisältämä ditiotreitoli poistettiin geelisuodatuksella, joka suoritettiin Pharmacia NAP5-pylväillä, jotka oli tasapainotettu 25-mmolaarisella HEPESillä, pH 7,0, joka sisälsi BSA:a yhden mg/ml, 2 mmolaarista $MgCl_2$:a, 1 mmolaarista EDTA:ta sekä 0,2 molaarista NaCl:a. Tällä geelisuodatuksella TPS-ja TPP-aktiivisuuksien saannot olivat enemmän kuin 85 prosenttia.

Eräässä kokeessa 2,0 μl 2,4-mmolaarista etyylillä leimattua NEM:ää sekoitettiin 150 μl kanssa geelisuodatettua entsyymiä ja sitä inkuboitiin 23 °C:ssa. Eri ajankohtina aina, 190 minuuttiin saakka, otettiin näytteitä (10 μl), jotka sekoitettiin 60 μl kanssa Laemmlin näytepuskuria (tämän puskurin

sisältämän merkaptoetanolin tulisi hajoittaa NEM-jäännös), niitä keitettiin viiden minuutin ajan ja niille suoritettiin SDS-PAGE-analyysi. Läheisesti samoina ajankohtina (ja myös 23 tunnin kohdalla) muita näytteitä (10 µl) sekoitettiin 100 µl kanssa (TPS:lle) tai 700 µl kanssa (TPP:lle) 25-mmolaarista HEPESiä, pH 7,0, joka sisälsi 5 mg BSA/ml, 2 mmolaarista $MgCl_2$:a, 1 mmolaarista EDTA:a, 0,2 molaarista NaCl:a sekä 1 mmolaarista ditiotreitolia (ditiotreitolin tulisi hajoittaa NEM-jäännös) ja ne määritettiin TPS:n ja TPP:n suhteen. TPP-määritykseen käytetty entsyymilaimennus oli riittävä siihen, ettei sellainen radioaktiivisuus, joka oli peräisin NEM:stä (noin 1/3 siitä, mitä jää jäljelle hartsisupernatanttiin), häirinnyt TPP-määrityksiä.

Elektroforeesin jälkeen, ennen kuin laite purettiin, poistettiin täydellisesti ylempi (katodi) puskuri, joka sisälsi suurimman osan lisätystä radioaktiivisuudesta. Sitten geeli kiinnitettiin, värjättiin ja väri poistettiin, kuten Laemmli on kuvannut [(1970) Nature, Lontoo 227, 680-685] ja kuivattiin. Tämän geelin autoradiogrammi (kuvio 10) ilmaisi, että 93 kDa suuruinen vyöhyke (ja myös BSA) leimautui kokeen aikana, kun taas 86 ja 57 kDa suuruiset vyöhykkeet leimautuivat paljon heikommin. Coomassie bluella värjätyt vyöhykkeet sekä viereiset tyhjät alueet (taustoina) leikattiin kuivasta geelistä (myöhemmissä kokeissa ne leikattiin kuivaamattomista geeleistä), murskattiin ja niitä uutettiin yön ajan yhdellä millitralla 5-prosenttista SDS:a tuikepulloissa, joiden tausta oli mitattu etukäteen. Sitten lisättiin 10 ml tuikenestettä, jonka pohjana oli tolueeni-Triton X100 ja putket laskettiin toistetusti, siten että käytettiin laajaenergistä ikkunaa, jotta tukahtumisvaikutukset saatettiin pienimmilleen. 10 tunnin mittaisen jatkuvan laskennan jälkeen saavutettiin vakiotasot. Radioaktiivisuuden ylimäärä laskettiin siten, että vähennettiin tausta arvo, joka saatiin geelin tyhjistä alueista. Tulokset esitetään kuviossa 11. Sellaisissa kontrollikokeissa, joista entsyymi puuttui, osoitettiin, että 93 ja 86 kDa suuruisista vyöhykkeistä löytynyt ylimääräinen

radioaktiivisuus ei ollut peräisin BSA:n epäpuhtauksien mahdollisesta leimautumisesta.

Kuvio 11 osoittaa, että NEM:stä leima menee pääasiallisesti pitkän ketjun 93 kDa mittaiseen fragmenttiin, ja suhteellisen pieniä määriä menee 86 kDa suuruiseen fragmenttiin ja 57 kDa suuruiseen lyhyeen ketjuun. Myös leiman määrä, joka menee pitkän ketjun fragmentteihin (93 + 86 kDa), on karkeasti verrannollinen TPP-aktiivisuuden häviämiseen, mutta se jää tästä häviämisestä lisääntyvästi jälkeen: 10,5 minuutin kohdalla 30 prosenttia alkuperäisestä TPP:stä oli hävinnyt ja 0,20 moolia NEM:a oli mennyt pitkän ketjun fragmentteihin moolia kohti (150 kg) entsyymiä, kun taas 190 minuutin kohdalla 56 prosenttia TPP:stä oli hävinnyt ja 0,32 moolia NEM:a oli mennyt pitkän ketjun fragmentteihin. Koska trehaloosisyntaasi voi olla oktameeri (sen luonnonmukainen molekyylimassa on noin 800 kDa), yhden pitkän ketjun reaktio NEM:n kanssa mahdollisesti voi lopulta johtaa sellaisen aktiivisuuden häviämiseen, joka liittynyt oktameerin muihin pitkiin ketjuihin. Kuvio 12 vertaa tuloksia, jotka on saatu useista kokeista, joissa on käytetty renkaassa ja etyyliryhmässä leimattua NEM:a. Samansuuntaiset kokeet, joissa on käytetty samanlaisia konsentraatioita renkaassaan ja etyyliryhmässään leimattua NEM:a, viittaavat siihen, että noin 25 prosenttia radioaktiivisuudesta, joka on peräisin etyyliryhmässään leimatusta NEM:stä, alunperin kiinnittyi proteiiniin ja hävisi SDS-PAGE-menetelmän aikana (oletetaan, että jonkin verran häviää happamissa olosuhteissa), ja sen mukaisesti on korjattu tulokset, jotka on saatu etyyliryhmissään leimatulla NEM:llä. Tarkkuuden rajoissa (proteiinimassan laskemiseen käytettiin spesifistä aktiivisuutta 30 TPS/mg ja oletettiin, että typistetyllä entsyymillä on 150 kDa:n suuruisen dimeerin molekyylimassa) TPP:n täydellinen häviäminen heijasti sitä, että jonkin verran vähemmän kuin yksi mooli NEM:a menee spesifisesti pitkän ketjun fragmentteihin.

Toinen reagenssi ditiodinitrobentsoaatti (DTNB), joka on erittäin spesifinen kysteiinin suhteen, aiheutti myös TPP-aktiivisuuden spesifistä häviötä: 10 minuutin mittaisen käsittelyn jälkeen, joka suoritettiin 0,9-mmolaarisella DTNB:llä enemmän kuin 95 prosenttia TPP:stä ja vähemmän kuin 28 prosenttia TPS:stä hävisi.

Nämä havainnot julkistavat sen, että TPP-aktiivisuus edellyyttää pitkää ketjua, jolla on sopiva rakenne, koska yhden ainoan aminohapon (todennäköisesti kysteiinin) muuntaminen 93 kDa suuruisessa fragmentissa poistaa TPP-aktiivisuuden mutta ei TPS-aktiivisuutta. Esimerkissä 3 annetut sekvensointitulokset julkistavat sen, että 93 kDa:n vyöhyke sisälsi materiaalia sekä 99 kDa:n että 123 kDa:n mittaisista ketjuista. Esillä olevat tulokset julkistavat täten, että jompikumpi ketju, 99 kDa tai 123 kDa, tai molemmat pitkät ketjut liittyvät TPP-aktiivisuuteen.

Esimerkki 9. Trehaloosisyntaasista eristetty, 99 kDa suuruinen polypeptidi, joka sisältää TPP-aktiivisuutta

Koska trehaloosisyntaasin pitkät ja lyhyet ketjut olivat vaikeat erotella tavallisin kromatografisin menettelytavoin, fraktioinnit yritettiin tehdä ionittoman detergentin läsnäollessa. Fraktioinnin aikana, joka suoritettiin NaCl-gradientilla DEAE-selluloosalla (Whatman DE52) yksiprosenttisessa Triton X100:ssa, pH 8,0:ssa, entsyymi saatiin takaisin noin 90-prosenttisena saantona 140-mmolaarisessa NaCl:n pitoisuudessa. Muutamia vähäpätöisiä polypeptidejä (esimerkiksi heikko 68 kDa suuruinen polypeptidi, joka on näkyvissä kuviossa 1) poistettiin, mutta ei erotettu toisistaan pääpolypeptidejä, joiden koot ovat 57, 99 ja 123 kDa. Kuitenkin 99 ja 123 kDa:n suuruisten peptidien muodostamien vyöhykkeiden suhde muuttui noin 1,5:stä 0,3:een entsyymihuipun poikki, kun taas samanaikaisesti TPP/TPS-suhde väheni tasaisesti 0,54:stä 0,42:hteen (tuloksia ei esitetty). Tämä viittaa siihen, että menetelmä erotti osittain trehaloosisyntaasimolekyylit, jois-

sa 99 kDa suuruinen polypeptidi oli rikastuneena, niistä molekyyleistä, joihin 123 kDa suuruinen polypeptidi oli rikastunut, ja että edellisillä oli suhteellisesti korkeampi TPP-aktiivisuus. Estrapoloimalla voidaan laskea, että (oletetun) entsyymin, joka sisältää vain 57 ja 99 kDa suuruisia ketjuja, TPP/TPS-suhde olisi 0,65 ± 0,10, kun taas mainittu suhde olisi 0,32 ± 0,10 entsyymillä, jossa on ainoastaan 57 ja 123 kDa:n suuruisia ketjuja.

Koska pitkät ketjut näyttävät sisältävän vahvasti fosfaattia sitovan kohdan (katso esimerkkejä 10 ja 12), yritettiin käyttää kromatografiaa fosfoselluloosalla. Alkuperäinen trehaloosisyntaasi (4,2 TPS-yksikköä) siirrettiin PM10-membraanin yli Amicon sellissä 25-mmolaariseen HEPES:iin, pH 7,0, joka sisälsi 2 mmolaarista $MgCl_2$:a, 1 mmolaarista EDTA:a, 1 mmolaarista ditiotreitolia sekä 0,3 prosenttia Triton X100:aa (HMED/0,3 %T) ja pantiin fosfoselluloosapylvääseen (Whatman P11-sellulloosa), jonka koko oli 0,7 x 4,2 cm ja joka oli tasapainotettu samalla puskurilla. Pylväs pestiin neljällä millilitralla HMED/0,3 %T:a ja kehitettiin lineaarisella gradientilla, jossa oli 0 - 0,6 molaarista NaCl:a 60 millilitrassa HMED/0,3 %T, nopeudella 5 ml/h. 0,35-molaarisella NaCl:lla oli eluoitunut ainoastaan hitunen TPS:a (≤ 3 prosenttia ensimmäisessä 9 ml:ssa ja ≤ 9 prosenttia 0,15 - 0,35-molaarisella NaCl:lla). Gradientti keskeytettiin ja pylväs pestiin peräkkäin (a) 8 ml:lla 10-mmolaarista fruktoosi-6-fosfaattia, joka oli seoksessa, jossa oli HMED/0,3 %T/0,35 molaarista NaCl, (b) 6 ml:lla seosta, jossa oli HMED/0,3 %T/0,6 molaarista NaCl:a, sekä (c) 0,2-molaarisella kaliumfosfaatilla, pH 7,0, joka sisälsi 2 mmolaarista $MgCl_2$, yhden mmoolin EDTA:ta, 1 mmoolin ditiotreitolia. Yhtään TPS- tai TPP-aktiivisuutta ei saatu takaisin, paitsi yhdessä ainoassa 1,5 millitran suuruisessa jakeessa, jossa 0,6-molaarinen NaCl alkoi eluoitua. Tämä sisälsi 12 prosenttia TPP:stä, joka pantiin pylvääseen, mutta vain ≤ 0,1 prosenttia TPS:stä, joka pylvääseen syötettiin.

Jakeet tutkittiin SDS-PAGE:lla (kuvio 13), joka osoitti: (1) lähes puhdas lyhyt ketju eluoitui NaCl-gradientin alussa tai juuri ennen gradienttia jakeissa, joista entsyymiaktiivisuus puuttui; (2) hivenen lyhyttä ja pitkää ketjua eluoitui hajanaisesti noin 0,2 - 0,35 -molaarisella NaCl-pitoisuudella jakeissa, jotka sisälsivät kaikkiaan $\leq$ 7 prosenttia pylvääseen pannusta TPS-aktiivisuudesta; (3) ainakin 50 prosenttia ja mahdollisesti kaikki syötetystä 99 kDa suuruisesta polypeptidistä eluoitui 0,6-molaarisella NaCl-pitoisuudella jakeessa, joka sisälsi 12 prosenttia pylvääseen pannusta TPP-aktiivisuudesta, ja (4) suurin osa 123 kDa suuruisesta polypeptidistä jäi pylvääseen sitoutuneeksi.

Intakti trehaloosisyntaasi on fraktioitu myös fosfoselluloosalla, siten että Triton puuttui ja pylvästä eluoitiin yksinkertaisella lineaarisella gradientilla, jossa NaCl:n pitoisuus oli 0 - 0,6 -molaarinen. Puhdas ja lähes puhdas 99 kDa suuruinen polypeptidi eluoitui noin 0,45-molaarisella NaCl:lla, ja se sisälsi spesifistä TPP-aktiivisuutta (^{14}C-G6P ei hydrolysoitunut). Tämä aktiivisuus erosi intaktin trehaloosisyntaasin TPP-aktiivisuudesta siinä, että aktiivisuuksien suhde 25-mmolaarisella fosfaatilla ja 50-mmolaarisella HEPES:illä oli eri kokeissa 1,5 - 3 (vrt., intaktilla trehaloosisyntaasilla tämä suhde on 5 - 6). Sitä paitsi 99 kDa suuruisen, eristetyn polypeptidin varastoinnin aikana, joka suoritettiin 0 °C:ssa TPP-aktiivisuus 25-mmolaarisessa fosfaatissa väheni ja TPP-aktiivisuus 50-mmolaarisessa HEPES:issä lisääntyi, kunnes suhde oli seitsemän viikon kuluttua noin 0,7.

Nämä havaintojen perusteella on ilmeistä, että intaktista trehaloosisyntaasista eristetty 99 kDa suuruinen polypeptidi on spesifinen trehaloosi-6-fosfataasi, mutta sen katalyyttiset ominaisuudet ovat epästabiileja ja eroavat intaktin trehaloosisyntaasin TPP-aktiivisuudesta. Yhdessä esimerkissä 7 esitetyn julkistuksen kanssa, joka ilmaisee sen, että hiiva tarvitsee sopivasti funktionaalisen TSS1-geenin, jotta sillä

on TPP-aktiivisuutta, tulokset viittaavat siihen, että 99 kDa suuruisen polypeptidin sopiva laskostuminen vaatii 57 kDa suuruisen ketjun läsnäolon.

Nämä havainnot julkistavat myös sen, että kun lyhyt ketju erotetaan pitkästä ketjusta kromatografian avulla puskurissa, joka sisältää 0,3 prosenttia Tritonia, jossa intakti trehaloosisyntaasi on stabiili, se menettää nopeasti kaiken TPP- tai TPS-aktiivisuuden, joka sillä oli, kun se oli oikein laskostunut trehaloosisyntaasissa.

Havainnot osoittavat myös, että täysimittaisella pitkällä ketjulla on harvinaisen suuri affiniteetti fosfoselluloosaan nähden, mikä on yhdenmukaista esimerkeissä 10 ja 12 esitetyn viittauksen kanssa, että fosfaattia sitova kohta, jolla on suuri affiniteetti, sijaitsee tämän ketjun terminaalisessa osassa.

Esimerkki 10. Trehaloosisyntaasin 123 kda suuruisen pitkän ketjun typistys trypsiinillä in vitro lisää dramaattisesti entsyymin TPS-aktiivisuutta

N-terminaalisten 325 tai lähes 325 aminohapon poisto intaktin trehaloosisyntaasin 123 kDa suuruisesta pitkästä ketjusta, siten että entsyymiä käsitellään trypsiinillä in vitro, antaa sellaisen entsyymin, jonka katalyyttiset ominaisuudet ovat samankaltaiset kuin typistetyllä entsyymillä, jonka Londesborough & Vuorio [(1991) samassa paikassa] puhdistivat. Eräässä kokeessa intaktia trehaloosisyntaasia (0,28 TPS-yksikköä, ≈9,4 μg) inkuboitiin 0,5 μg kanssa trypsiiniä tai ilman sitä 30 °C:ssa 250 μl:ssa 13-mmolaarista HEPES:iä, jonka pH oli 7,0 ja joka sisälsi 1 mM $MgCl_2$:a, 0,5 mM EDTA:a, 0,5-mM ditiotreitolia, 0,2 M NaCl:a sekä 0,5 mM bentsamidiinia. Sen TPS-aktiivisuus määriteltiin aika ajoin, siten että käytettiin normaaleita määritysseoksia (jotka sisälsivät 5 mM F6P:a), jotka eivät sisältäneet yhtään tai sisälsivät 4 mM kaliumfosfaattia, pH 6,8, ja näytteet valmistettiin SDS-PAGE-

analyysejä varten välittömästi ennen trypsiinin lisäystä tai 28 minuutin kuluttua lisäyksestä.

Ensimmäisten 48 minuutin kuluessa mitattu TPS-aktiivisuus väheni fosfaatin puuttuessa nopeammin, jos trypsiiniä oli läsnä kuin silloin, kun trypsiini puuttui. Kuitenkin ensimmäisten 10 minuutin aikana trypsiini aiheutti nelinkertaisen lisääntymisen aktiivisuudessa, joka mitattiin 4-mmolaarisen fosfaatin läsnäollessa, ja 48 minuuttiin mennessä aktiivisuudet fosfaatin kanssa tai ilman sitä olivat olennaisesti samansuuruiset (kuvio 14). 48 minuuttiin mennessä 123 kDa suuruinen, täysimittainen pitkä ketju oli hävinnyt, ja polypeptidien dupletti 85 kDa kohdalla oli korvannut sen (kuvio 15). Tämän vastakohtana lyhyt ketju (57 kda) oli muuttumaton ja 99 kDa suuruinen vyöhyke oli vain vähän vähentynyt voimakkuudeltaan. TPS-aktiivisuuden muutoksien surauksena noin 50 prosenttia TPP-aktiivisuudesta hävisi.

Seuraavalla tavalla määritettiin, minkä osan 123 kDa suurisesta ketjusta trypsiini poisti. Intaktia trehaloosisyntaasia (180 μg) siirrettiin Centricon 30 -putkea käyttäen 0,5 millitraan 25-mmolaarista HEPES:iä, pH 7,0, joka sisälsi 2 mM $MgCl_2$:a, 1 mM EDTA:a, 1 mM ditiotreitolia sekä 0,2 M NaCl:a, ja sitten sitä käsiteltiin 11 μg:lla trypsiiniä 25 °C:ssa. Standardi TPS-aktiivisuus ei vähentynyt trypsiinikäsittelyn aikana, kun taas TPS-aktiivisuus, joka mitattiin F6P:n puuttuessa sekä siten, että läsnä oli 10 mmoolia fosfaattia, lisääntyi 26 prosentista 73 prosenttiin standardiaktiivisuutta käsittelyn ensimmäisten 30 minuutin kuluessa. Käsittelyn kestettyä 68 minuuttia, kun SDS-PAGE-analyysi osoitti, että 123 ja 99 kDa:n suuruiset vyöhykkeet olivat kokonaan kadonneet ja esille tuli dupletti, jonka näennäinen molekyylimassa oli noin 85 kDa (komponentit erosivat toisistaan noin 1,5 kDa verran), seosta sentrifugoitiin Centricon 30 -putkien läpi, jotta tryptiset peptidit erotettiin ydinentsyymistä. Suodattimelle jäänyttä jaetta keitettiin sitten 0,5-prosenttisessa SDS:ssä ja se sentrifugoitiin uudelleen Centricon 30 -putken

läpi. Yhdistetyt suodokset laimennettiin 0,1-prosenttisella SDS:llä ja niitä inkuboitiin 18 tunnin ajan 25 °C:ssa neljän painoprosentin kanssa endoproteinaasia Glu-C (Boehriger). Sitten peptidit erotettiin HPLC:llä, siten että käytettiin DEAE-esipylvästä, ja ne sekvensoitiin, kuten esimerkissä 3 kuvataan.

Saatiin 20 sekvenssiä (sekvenssien identifiointinumerot 58 - 77 taulukossa 6). Näistä viisitoista esiintyi N-terminaalisissa aminohapoissa, joita on 325 ja joita TSL1 koodittaa. Yksi sekvenssi (peptidi 1407, saatu talteen pienempänä kuin noin puolena muiden saannosta) muodostui aminohapoista 1089 - 1093, se on, TSL1:n koodittaman proteiinin C-päätteen viidestä aminohaposta. Tämä peptidi luultavasti on peräisin endoproteinaasin Glu C aikaansaamana pilkkoutumistuotteen tryptisestä peptidistä, joka alkaa Lys 1079:n jälkeen. Esimerkissä 3 esitettiin, että sekä 86 kDa että 93 kDa suuruiset fragmentit typistetyssä trehaloosisyntaasissa, jonka Londesborough & Vuorio eristivät [(1991) samassa paikassa], sisälsivät peptidin, joka on peräisin alueesta Ala1064 - Lys1079, mikä varmistaa sen, että typistetyt polypeptidit ulottuvat ainakin tähän, lähelle 123 kDa suuruisen, täysmittaisen ketjun C-päätä. N-terminaalinen peptidi kauimpana N-päästä oli peptidi 1443, joka saatiin pilkkomalla Arg335:n jälkeen. Typistetty peptidi ulottuu täten Ser 336:stä Lys 1079:ään tai Arg 1098:aan, ja ennustetaan, että sen molekyylimassa on 87,3 tai 86,2 kDa. Trypsiinillä käsitellyn entsyymin SDS-PAGE-analyysi viittaa siihen, että nämä molemmat typistetyt ketjut muodostuvat ja, koska TPS-aktiivisuus F6P:n läsnäollessa muuttuu trypsiinikäsittelyssä vähän, kahdella typistetyllä ketjulla on luultavasti samankaltaiset aktiivisuudet.

Jäljelle jäävistä neljästä peptidistä, jotka ovat taulukossa 5, kaksi (1419 ja 1437b) on vielä identifioimatta, mutta ne saattavat olla peräisin 99 kDa suuruisesta polypeptidistä, kun taas kaksi (1442 ja 1451) on selvästi peräisin tuosta polypeptidistä. Peptidi 1442 on täten identtinen taulukon 4

peptidin 1307a:n kanssa, ja peptidin 1451 ensimmäiset viisi aminohappoa ovat identtiset peptidin 1297a:n kanssa (taulukko 4).

Nämä tulokset julkistavat sen, että pitkän ketjun N-terminaalisten 325 aminohapon poisto yhdessä C-terminaalisten 19 amihapon poiston kanssa tai ilman sitä antaa tulokseksi trehaloosisyntaasin, joka on suhteellisen epäherkkä inhibitiolle, jonka fosfaatti aiheuttaa, eikä se vaadi F6P:a täyttä aktiivisuutta varten. Pitkän ketjun sekundaarisen rakenteen analyysi Garnier et al.:n mukaan [(1978) Journal of Molecular Biology, 120, 97-120] viittaa siihen, että vaikka C-terminaaliset 700 aminohappoa todennäköisesti ovat alfa-helikseissä tai beeta-levyissä, proteiinin N-terminaalisten 360 aminohapon muodostama osa on sellaista rakennetta vailla. Nämä tulokset yhdessä viittaavat siihen, että N-terminaaliset 330 tai noin 330 aminohappoa sisältävät selvästi erotettavan domainin, joka suo säätelymahdollisuuksia trehaloosisyntaasin TPS-aktiivisuuden sekä sen herkkyyden suhteen, joka sillä on fosfaatin aiheuttamalle inhibitiolle, ja säätelymahdollisuuksia sellaiseen vaatimukseen nähden, jonka mukaan F6P:a tarvitaan täydellisen katalyysiaktiivisuuden ilmentämiseen. TSL1-geenin tuotteen täytyy täten myös kytkeytyä TPS-aktiivisuuteen.

Taulukko 6. Rajoitetulla trypsiinikäsittelyllä suoritetun aktivoinnin aikana intaktista trehaloosisyntaasista vapautuvat peptidit

Kun samasta HPLC-piikistä saatiin kaksi peptidiä, ne esitetään a- ja b-sekvensseinä, jotka merkittiin niiden sekvenssien mukaan, jotka ennustettiin TSL1-geenistä. Tunnustelevat identifioinnit aminohapposekvensointilaitteesta esitetään yksikirjaimisin koodein sekä kahdella kysymyysmerkillä; Identifioimattomat tähteet merkitään Xaa:ksi. (Sekvenssilistoissa esitetään Xaa:lla myös tunnustelevat identifioinnit). Kunkin

aminohapposekvenssin sijainti trehaloosisyntaasin pitkässä (123 kDa) ketjussa esitetään sekvenssin alla kuvassa 4b.

1400 Leu-Leu-Val-His-Ser-Leu-Leu-Asn-Asn-Thr-Ser-Gln-Thr-Ser-Leu-Glu-Gly-Pro-Asn
(Sekvenssin identifiointinumero 58) (181-200)

1401 Ser-Ser-Thr-Thr-Asn-Thr-Ala-Thr-Leu-Xaa-Xaa-Leu-Val-Ser-Ser-Xaa-Ile-Phe-Met-Glu
(Sekvenssin identifiointinumero 59) (84-104)

1406 Ala-G??-Asn-Arg-Pro-Thr-Ser-Ala-Ala-Thr-Ser-Leu-Val-Asn-Arg
(Sekvenssin identifiointinumero 60) (210-24)

1407 Xaa-Phe-Thr-Ile-Ile-S??
(Sekvenssin identifiointinumero 61) (1088-93)

1408 Asn-Leu-Thr-Ala-Asn-Ala-Thr-Thr-Ser-His-Thr-Pro-Thr-Ser-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 62) (105-19)

1409 Phe-G??-G??-Tyr-Ser-Asn-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 63) (319-25)

1416 S??-Pro-S??-Ala-Phe-Asn-R??
(Sekvenssin identifiointinumero 64) (77-83)

1417a Ile-Ala-Ser-Pro-Ile-Gln-T??-Glu
(Sekvenssin identifiointinumero 65) (145-52)

1417b Gln-Arg-Pro-Leu-Leu-Ala-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 66) (257-63)

1418 Phe-Phe-Ser-Pro-Ser-Ser-Asn-Ile-Pro-Thr-Asp-Arg
(Sekvenssin identifiointinumero 67) (133-44)

1419a Ala-Leu-Ser-Asn-Asn-Ile-Ser-Gln-Glu
(Sekvenssin identifiointinumero 68) (47-55)

1419b A??-L??-S??-Tyr-Thr-Pro
(Sekvenssin identifiointinumero 69) (ei löydetty)

1420 Ile-Ala-Ser-Pro-Ile-Gln-Gln-Gln-Gln-Asp-Pro-Thr-Ala-Asn-Leu
(Sekvenssin identifiointinumero 70) (159-74)

1437a Thr-Met-Leu-Lys-Pro-Arg
(Sekvenssin identifiointinumero 71) (120-25)

1437b Ile-Ile-Glu-Asp-Glu-Ala
(Sekvenssin identifiointinumero 72) (ei löydetty)

1438 Ile-Thr-Pro-His-Leu-Thr-Ala-Ser-Ala-Ala-Lys
(Sekvenssin identifiointinumero 73) (246-56)

1439 Ser-Leu-Val-Ala-Pro-Ala-Pro-Glu
(Sekvenssin identifiointinumero 74) (56-63)

1442 Lys-Pro-Gln-Asp-Leu-Asp-Asp-Asp-Pro-Leu-Tyr-Leu
(Sekvenssin identifiointinumero 75) (99 kDa suuruisesta peptidistä)

1443 Lys-Tyr-Ala-Leu-Leu-Arg
(Sekvenssin identifiointinumero 76) (330-35)

1451 Gln-Leu-Gly-Asn-Tyr-G??-Phe-Tyr-Pro-Val-Tyr
(Sekvenssin identifiointinumero 77) (99 kDa suuruisesta peptidistä)

Esimerkki 11. TPS-aktivaattorin identifiointi fosfoglukoisomeraasina

TPS-aktivaattori siirrettiin 0,1-molaariseen Tris-HCl:ään, pH 9,0, PM10-membraanin yläpuolelle Amicon-sellissä. Lysyylien-dopeptidaasi C:llä (0,8 µg, Wako) pilkottiin 300 µl suuruista näytettä 20 tunnin ajan 37 °C:ssa. Peptidit erotettiin HPLC:llä ja ne sekvensoitiin, kuten esimerkissä 3 kuvataan. Kaikki viisi sekvenssiä, jotka saatiin ja julkistetaan taulukossa 7, ovat identtisiä niiden sekvenssien kanssa, jotka löydettiin hiivan fosfoglukoisomeraasista (PGI).

Taulukko 7. Peptidisekvenssit, jotka on saatu TPS-aktivaattorista

PGI-sekvenssit ovat Tekamp-Olson, P., et al.:n julkaisusta (1988) Gene 73, 153-161.

TPS-aktivaattoripeptidi		PGI-tähteet
TA1156	TFTNYDGSK (Sekvenssin identifiointinumero 39)	51 - 59
TA1158	TGNDPSHIAK (Sekvenssin identifiointinumero 40)	241 - 251
TA1159	IYESQGK (Sekvenssin identifiointinumero 41)	24 - 30
TA1160	AEGATGGLVPHK (Sekvenssin identifiointinumero 42)	456 - 467
TA1161	LATELPAXSK (Sekvenssin identifiointinumero 43)	11 - 19

TPS-aktivaattorin sellaisen näytteen, jota oli säilytetty useita kuukausia 0 °C:ssa, PGI-aktiivisuus mitattiin 50-mmolaarisessa HEPES-KOH:ssa, pH 7,0, joka sisälsi 5 mM $MgCl_2$:a, 5 mM F6P:a sekä 0,4 mg/ml NADP:a. Spesifisen aktiivisuuden arvoksi saatiin 190 U/mg.

Nämä havainnot osoittavat, että S. cerevisiaelta saatu TPS-aktivaattori on identtinen PGI:n kanssa. Esimerkki 12 julkistaa sen, että F6P on intaktin, mutta ei typistetyn, trehaloosisyntaasin TPS-aktiivisuuden voimakas aktivaattori. Koska TPS:n määritysseokset sisältävät G6P:a, on selvää, että TPS-aktivaattori voi aktivoida TPS:a, siten että se tuottaa F6P:a G6P-substraatista. Tämä on aktivaation täydellinen selitys. Täten alkukonsentraatioissa, jotka olivat 6,7 mM G6P:a ja 1,9 mM F6P:a (se on, G6P/F6P = 3,5, kokeellinen tasapainosuhde) nopeus oli TPS-aktivaattorista riippumaton ja yhtä suuri kuin 9-mmolaarisessa G6P:n pitoisuudessa TPS-aktivaattorin kanssa. Aiemmissa kokeissa [Londesborough & Vuorio (1991) samassa paikassa] oli käytettävä intaktin trehaloosisyntaasin raakoja valmisteita, koska puhdasta, intaktia trehaloosisyntaasia ei ollut saatavilla. Vaikka TPS-aktivaattorivalmisteiden tehokkuuden raportoitiin vaihtelevan eri entsyymivalmisteiden välillä, tietyissä olosuhteissa saatiin tuloksia, jotka viittaavat siihen, että TPS-aktivaattori saattaa olla stökiömetrisesti vuorovaikutuksessa natiivin trehaloosisyntaasin kanssa [Londesborough & Vuorio (1991) samassa paikassa]. Esillä olevat havainnot osoittavat, että tämä ehdotus oli täysin väärä. Havainnot viittaavat myös siihen, että kirjallisuudessa esitetyt, kinetiikkaa koskevat tulokset ovat sekavia, koska niin sanotun "trehaloosi-6-fosfaattisyntetaasin" muutamat valmisteet ovat luultavasti sisältäneet PGI:a, kun taas toisissa sitä ei mahdollisesti ole ollut. Ensiksi mainituissa valmisteissa aktivaattori F6P on luultavasti tuotettu G6P-substraatista, mutta näin tuotettu määrä on todennäköisesti ollut käytetyn koemenettelyn yksityiskohtien mukainen.

Esimerkki 12. Intaktin ja typistetyn trehaloosisyntaasin erilaiset kineettiset mallit

Typistetty trehaloosisyntaasi valmistettiin, kuten Londesborough & Vuori [(1991) samassa paikassa] kuvaavat, ja se sisälsi 57 kDa mittaisen lyhyen ketjun sekä pitkän ketjun fragmentit, joiden pituudet olivat 86 ja 93 kDa. Intakti trehaloosisyntaasi valmistettiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Kineettiset määritykset tehtiin 30 °C:ssa, kuten kuvataan osassa Yleiset menetelmät ja materiaalit.

(a) Osittainen TPS-aktiivisuus

Taulukko 8. Intaktin ja typistetyn entsyymin TPS-aktiivisuuksien inhibitio fosfaatilla 5-mmolaarisessa F6P:ssa

Esitetään vaikutus, joka kaliumfosfaatin pH 6,8 lisäyksellä oli standardeihin määritysseoksiin. Kullekin entsyymille asetetaan 100 prosentiksi aktiivisuus, joka entsyymillä oli ilman fosfaattia.

Lisätty fosfaatti	Intakti entsyymi	Typistetty entsyymi
Ei mitään	100 %	100 %
1,3 mM	69 %	94 %
4,0 mM	14 %	83 %

Intaktin entsyymin TPS-aktiivisuus oli paljon herkempi fosfaatin aiheuttamalle inhibitiolle kuin typistetyn entsyymin aktiivisuus (taulukko 8). Taulukossa 8 esitetyt tulokset aliarvioivat intaktin ja typistetyn entsyymin fosfaattivasteiden välistä eroa, koska F6P osittain peruuttaa fosfaatin aiheuttaman intaktin entsyymin inhibition (katso alla), mutta sillä ei ole mitään vaikutusta typistettyyn entsyymiin. Taulukko 9 osoittaa sen, mitä vaikuttaa siirtyminen standardimäärityksen suolaolosuhteista (40-mmillimolaarinen HEPES-KOH, pH 6,8, 10- mmolaarinen $MgCl_2$:n suhteen) lähemmäksi hiivan

sytosolin suolaolosuhteita. Silloin kun F6P puuttuu, siirtymä aiheuttaa sen, että intaktin entsyymin inhibitio on 67 prosenttia (standardiaktiivisuuden 43 prosentista 14 prosenttiin), mutta typistetty entsyymi inhiboituu tällöin vain 10 prosenttia (96 prosentista 86 prosenttiin).

Taulukko 9. Fysiologisiin olosuhteisiin tapahtuvan siirtymisen vaikutus intaktin ja typistetyn entsyymin TPS-aktiivisuuteen

"Fysiologisissa olosuhteissa" tapahtuvia mittauksia varten standardimääritysseoksiin lisättiin 1,3 mM kaliumfosfaattia sekä 0,1 molaarista kaliumkloridia ja $MgCl_2$:n määrää vähennettiin kymmenestä mmoolista 2,5 mmooliin.

	Standardiolosuhteet		Fysiologiset olosuhteet	
	(5 mM F6P)	Ei F6P	(5 mM F6P)	Ei F6P
Intakti	100 %	43 %	72 %	14 %
Typistetty	100 %	96 %	90 %	86 %

Nämä tulokset julkistavat typistetyn trehaloosisyntaasin TPS-aktiivisuuden epäherkkyyden fysiologisia fosfaattikonsentraatioita sekä F6P:n sellaisten konsentraatioiden läsnäoloa tai puuttumista kohtaan, jotka ovat hiivan sytosolin normaaliarvoja selvästi suuremmat (0,1 - 1 mM; Lagunas, R. & Gancedo, C. (1983) European Journal of Biochemistry 137, 479-483).

Kuvio 16 valaisee intaktin entsyymin TPS-aktiivisuuden F6P-riippuvuutta erilaisissa fosfaattikonsentraatioissa. Näiden tulosten käänteisarvojen graafinen esitys (ei esitetty) ilmaisee, että 1,3-mmolaarisella ja mahdollisesti 4-mmollaarisella fosfaatin pitoisuudella F6P:n riittävän suuret konsentraatiot täydellisesti voittavat fosfaatin aiheuttaman inhibition. Ilman lisättyä fosfaattia F6P aiheutti 2,5-kertaisen maksimiaktivaation, jonka $K_{½}$ oli 60 μM. 1,3-mmolaarisella

fosfaatin konsentraatiolla maksimiaktivaatio oli ainakin 20-kertainen, ja $K_{½}$ oli 1,4 mM F6P:a. Näiden käänteisarvojen graafisten esitysten kulmakertoimet vaihtelivat lineaarisesti fosfaattikonsentraation neliön kanssa, mikä viittaa siihen, että tapahtumaan kytkeytyy kaksi fosfaattia sitovaa kohtaa. Neljämillimolaarisella fosfaatin pitoisuudella, joka on vielä hiivan sytosolin fosfaattikonsentraatioiden todennäköisellä alueella [Lagunas & Gancedo (1983) samassa paikassa], inhibitio oli niin vakava, että vieläpä 10-mmolaarinen F6P:n läsnäollessa oli mahdollista havaita standardiolosuhteissa ainoastaan 40 prosenttia aktiivisuudesta. Täten olisi otaksuttavissa, että typistetyn trehaloosisyntaasin ilmentyminen hiivassa lisää suuresti entsyymin solunsisäistä spesifistä aktiivisuutta.

Fruktoosi-1-fosfaatti, fruktoosi-1,6-bisfosfaatti, fruktoosi-2,6-bisfosfaatti ja glukoosi-1-fosfaatti tutkittiin puolioptimeissa F6P:n konsentraatioissa (1 mM F6P:a 1,3-mmolaarisessa fosfaatissa). Mitään aktivaatiota ei aiheutunut 5- tai 2,5-mmolaarisilla pitoisuuksilla; sen sijaan esiintyi noin 25 prosentin suuruinen inhibitio, joka luultavasti johtui kilpailusta G6P:n ja F6P:n kanssa.

(b) Osittainen TPP-aktiivisuus

Sellaisilla fosfaattikonsentraatioilla, jotka olivat yhtä suuret tai vähemmän kuin yksi millimooli, typistetyn trehaloosisyntaasin katalysoimat TPP-reaktiot nopeutuivat selvästi ainakin reaktion ensimmäisten kymmenen minuutin aikana. Tämä ei tapahtunut intaktilla entsyymillä. Reaktion alkunopeuksien suhteen intakti entsyymi aktivoitui pienemmillä fosfaattikonsentraatioilla kuin typistetty entsyymi (kuvio 17). Aktivaation käänteisarvojen graafinen esitys ($v_{▲}$ = nopeus fosfaatin kanssa, v_{pi}, miinus nopeus ilman fosfaattia, v_o) typistetylle entsyymille oli lineaarinen, kun $1/v_{▲}$ merkittiin fosfaattipitoisuuden käänteisarvoa 1/[fosfaatti] vastaan, siten että $K_{½}$ oli kolme mM fosfaattia. Intaktille entsyymille nämä graafi-

set esitykset eivät olleet lineaarisia, ja tuloksena olivat lineaariset esitykset, kun käytettiin fosfattikonsentraation neliön käänteisarvoa $1/[\text{fosfaatti}]^2$ (kuvio 18). Tämä viittaa jälleen siihen, että intaktilla entsyymillä on kaksi voimakkaasti fosfaattia sitovaa kohtaa, joista yksi on kadonnut typistetystä entsyymistä. Intaktille ensyymille saatiin puolimaksimaalinen aktivaatio 0,6-mmolaarisella fosfaattipitoisuudella.

Kun fosfaatti puuttui, F6P ei vaikuttanut intaktin enstyymin TPP-aktiivisuuteen. Puolioptimeissa fosfaattikonsentraatioissa viisimillimolaarinen F6P inhiboi kohtuullisesti (20 - 30 prosenttia) sekä intaktin että typistettyjen entsyymien TPP-atiivisuuksia, ja fosfaatin kyllästyskonsentraatioissa havaittiin vähäisemmät inhibitiot (10 - 15 %, tuloksia ei esitetä).

Nämä havainnot julkistavat intaktin trehaloosisyntaasin TPS-aktiivisuuden perinpohjaista herkkyyttä fysiologiselle fosfaatille ja F6P-konsentraatioille, mikä häviää, kun 123 kDa suuruinen pitkä ketju typistetään noin 85 kDa suuruikseksi. Typistys vaikuttaa vähemmän TPP-aktiivisuuksiin, molemmat entsyymit aktivoituvat fysiologisissa fosfaattipitoisuuksissa, ja kummallakaan ei ole voimakasta vastetta F6P:lle. Nämä tulokset viittaavat siihen, että intaktilla entsyymillä on kaksi voimakkaasti fosfaattia sitovaa kohtaa, joista toinen sijaitsee 123 kDa suuruisen pitkän ketjun sellaisella alueella, joka poistetaan typistyksessä. Ne esimerkissä 9 julkistetut havainnot, joiden mukaan 123 kDa suuruista pitkää ketjua ei saatu takaisin fosfoselluloosasta, tukevat tätä johtopäätöstä.

Esimerkki 13. TPS-aktiivisuuden ilmentyminen Escherichia colin soluissa, jotka on transformoitu TSS1:llä ja TSL1:llä

E. colin kanta HB101 (ALKO 683) transformoitiin plasmideilla pALK752 sekä pALK754, jotka käsittivät pBluescriptin, joka

vastaavasti sisälsi TSS1:n ja TSL1:n (katso esimerkki 14 ja kuvat 20a ja 20 c). Valittiin transformantit ALKO3566 sekä ALKO3568, jotka sisälsivät vastaavasti pALK752:n ja pALK754:n, ja niitä ylläpidettiin ja kasvatettiin ampisilliinin pitoisuuden 50 µg/ml läsnäollessa. Sellaiset ravistelupullot, jotka sisälsivät Luria-lientä, jossa ei ollut yhtään ampisilliiniä (ALKO 683) tai jossa mainittua antibioottia oli 15 µg/ml (ALKO3566 ja ALKO3568) siirrostettiin yhdellä millitralla sopivien solujen suspensiota (A600 = 1,5), ja niitä ravisteltiin nopeudella 250 kierrosta minuutissa 30 °C:ssa 15 tunnin ajan. Solut koottiin (5 minuuttia ja 3000 g), pestiin kaksi kertaa vedellä, lietettiin (1,5 g soluja/3,7 ml) HBMED:ssä, joka sisälsi 1 mM PMSF:a sekä 10 µg/ml pepstatiini A:ta, ja ne rikottiin, siten että niiden annettiin kaksi kertaa läpäistä French-puristin (Aminco) paineella 15.000 psi (1,0335 x 10^5 kPa). Homogenaattien näytteitä sentrifugoitiin 20 minuutin ajan 28 000 g:llä. Homogenaatit ja supernatantit määritettiin TPS:n ja TPP:n suhteen yhtä aikaa ja supernatanttien proteiinipitoisuudet määritettiin (taulukko 10).

Taulukko 10. TPS:n ilmentyminen E. colissa, joka on transformoitu TSS1:llä tai TSL1:llä

Isäntää (ALKO 683) sekä transformantteja (ALKO3566, joka sisältää TSS1:n, sekä ALKO3468, joka sisältää TSL1:n) kasvatettiin, ne koottiin ja rikottiin, kuten tekstissä kuvataan. Soluhomogenaateista ja supernatanteista määritettiin heti TPS, siten että standardi TPS ja tausta ilman G6P:a ja F6P:a määritettiin. Soluhomogenaateista ja supernatanteista määritettiin myös TPP. Aktiivisuudet esitetään mU:nä/g tuoreita soluja, jollei muulla tavoin ilmoiteta.

	ALKO 683	ALKO3566	ALKO3568
Solusaanto (g/200 ml)	1.57	1.51	1.56
Homogenaatit			
TPS-standardi	361 ± 75	1065 ± 118	260 ± 23
Tausta-TPS	363 ± 57	227 ± 45	117 ± 77
Netto-TPS	0 ± 20	840 ± 70	140 ± 50
TPP-standardi	1130 ± 70	1110 ± 100	1190 ± 80
Supernatantit			
TPS-standardi	273 ± 73	699 ± 47	233 ± 68
Tausta-TPS	263 ± 21	155 ± 42	135 ± 9
Netto-TPS	10 ± 50	540 ± 10	100 ± 60
Netto-TPS (mU/mg proteiinia)	0.08	4.50	0.87
TPP-standardi	1130 ± 100	910 ± 90	1020 ± 80

Molemmat sekä TPS-standardi- että -taustamääritykset antoivat nopeutuvia reaktioita, ja taulukossa 10 esitetyt tulokset ovat keskiarvo ± vaihteluväli viiden ja kymmenen minuutin mittaisille määrityksille, jotka käsiteltiin erikseen TPS:n nettoaktiivisuuden laskemiseksi. Olennaisesti koko TPS-standardin aktiivisuus, joka mitattiin isäntäsoluissa ja noin puolet aktiivisuudesta ALKO3568:n soluissa johtui taustareaktiosta (ilmeisesti fosfodiesteraasista), jotka tuottivat UDP:a UDPG:sta, silloin kun G6P ja F6P puuttuivat. Näissä olosuhteissa kasvatettujen isäntäsolujen TPS:n nettoaktiivisuus oli lähellä nollaa, kun taas TSS1:llä tai TSL1:llä transformoidut solut sisälsivät aktiivisuutta 840 tai 140 mU/g tuoreita soluja, josta aktiivisuudesta suurin osa (64 ja vastaavasti 71 prosenttia) oli liukoista. Isäntävalmisteeseen verrattuna netto TPS:n spesifiset aktiivisuudet 28 000 g:ssa supernatantteja lisääntyivät noin 50-kertaisesti (ALKO3566) ja 10-kertaisesti (ALKO3568). Isäntäsolujen erittäin

alhaiselle TPS-aktiivisuudelle on todennäköisesti kaksi syytä: E. colin trehaloosi-6-fosfaattisyntaasia indusoi suuri osmoottinen paine, ja vaikka jotkut kannat saavat aktiivisuutta stationaarifaasissa, entsyymiaktiivisuus itse aktivoituu voimakkaasti suuremmilla (0,25-molaarisilla) kationikonsentraatioilla kuin esillä olevan keksinnön mukaisen määrityksen olosuhteissa [Giaever et al. (1988) Journal of Bacteriology 170, 2841-2849].

TPP-aktiivisuuksissa ei havaittu mitään merkittävää muutosta. Isäntäsolut sisälsivät jo TPP:a 1100 mU/g, joka mitattiin 25-mmolaarisessa fosfaatin pitoisuudessa (ja enemmän kuin 5 U/g, joka mitattiin 25-mmolaarisessa HEPES-puskurissa). Jos transformaatio plasmideilla olisi tuottanut TPP-aktiivisuutta, siten että TPP/TPS-suhde olisi sama kuin hiivasta saadulla puhtaalla trehaloosisyntaasilla, silloin lisääntymiset TPP:ssä (noin 250 ja 40 mU/g vastaavasti ALKO3566:n ja ALKO3568:n suhteen) eivät olisi olleet ilmaistavissa ALKO3568:lla ja ALKO3566:lla ne olisivat olleet lähellä kokeellista virhettä.

Western-tekniikalla suoritettu analyysi (kuvio 19) osoitti, että ALKO3566 spesifisesti ilmensi 57 kDa:n suuruista peptidiä vastaavaa vyöhykettä, joka tunnistettiin anti-57K-seerumilla, ja heikommin reagoivia vyöhykkeitä, jotka vastasivat pienempiä molekyylimassoja. ALKO3568 ilmentää spesifisesti vyöhykkeitä, jotka anti-93K-seerumi tunnisti noin 60, 36 ja 35 kDa:n (voimakas) kohdalla, mikä viittaa siihen, että pitkä ketju pilkkoutuu pahoin ALKO3568:ssa tai että TSL1:n transkribointi ja translaatio eivät tapahdu oikein.

Nämä tulokset julkistavat sen, että (1) TPS-aktiivisuus voidaan viedä heterologisiin soluihin joko TSS1:n tai TSL1:n avulla, (2) TSS1-geenin tuotteella on TPS-aktiivisuutta ja

(3) myös yhdellä tai useammalla (pilkotulla) TSL1:n tuotteella on TPS-aktiivisuutta. Tämä viimeksi mainittu havainto on odottamaton, koska TPS-aktiivisuus puuttuu sellaiselta hiivalta, joka sisältää puutteellisen (esimerkki 7) tai katkaistun (esimerkki 14) TSS1-geenin. Mahdollisesti ALKO3568 kerää trehaloosisyntaasin 123 kDa suuruisen pitkän ketjun sattumanvaraisesti pilkkoutuneita, proteolyyttisiä tuotteita, joilla on TPS-aktiivisuutta vieläpä silloin, kun TSS1:n tuotte puuttu.

Transformaatiota TSS1:llä (tai TSL1:llä) yksinään voidaan käyttää, kun trehaloosin synteettinen tie viedään organismiin, kuten esimerkiksi E. coli HB101:hteen, jolla jo on kapasiteettia tuottaa trehaloosia trehaloosi-6-fosfaatista, mahdollisesti epäspesifisen fosfataasin kautta.

Esimerkki 14. Hiivan transformaatio

(1) Täydellisten geenien ja TSL1:n typistettyjen muunnosten kokoaminen

Sellaisia plasmideja, jotka sisälsivät TSS1:n ja TSL1:n täydellisiä ORF:iä sekä TSL1:n typistetyn ORF:n koottiin HaeIII:n ja EcoRI-kirjastojen sopivista immunopositiivisista klooneista, joita käytettiin esimerkeissä 4 ja 5 näiden geenien sekvensointiin:

(a) TSS1-geeni sekä sen promoottori (pALK 752)

Restriktioentsyymeillä DraI ja BstEII (katso restriktiokohdat kuviosta 6) leikattiin HaeIII:n kloonista 7 fragmentti, joka oli516 emäsparin suuruinen. DraI-kohta merkitsee julkistetun TSS1-sekvenssin alun. Tämä fragmentti yhdistettiin HaeIII:n klooniin 20, sen jälkeen kun tämä oli pilkottu BstEII:lla ja ClaI:llä (ClaI-kohta oli polylinkkerissa) ja ClaI-pää oli täydennetty Klenow-fragmentilla. Liitoksen sekvenssi, joka

sijaitsee uudelleen kytketyn plasmidin BstEII-kohdassa (esitetty kuviossa 20a), varmistettiin sekvensoimalla.

(b) TSS1-geeni ilman promoottoriaan (pALK753)

HaeIII:n klooni 21 leikattiin restriktioentsyymillä Tth111I. Tähän kohtaan lisättiin seuraava kytkytfragmentti (sekvenssin identifiointinumero 84, ABI DNA-syntetisaattorilla syntetisoitu):

5'-CGGGAAGACA TAGAACTATG ACTACGGATA ACGCTAAGGC GCAACTGACC -3'
3'-GCCCTTCTGT ATCTTGATAC TGATGCCTAT TGCGATTCCG CGTTGACTGG -5'

Tämä sisältää TSS1:n nukleotidit -13 - +33 (katso kuvio 4), mutta kun se on oikein suunnattu, se saa aikaan SmaI-kohdan nukleotidin -16 kohdalle ATG-lähtökohdasta. Plasmidia (esitetty kuviossa 20b) voidaan käyttää TSS1-geenin ORF:n ja sen noin 200 emäsparin mittaisen terminaattorin vapauttamiseen SmaI:llä lisäkonstruktioita varten (esimerkiksi ekspressiovektoreita varten, jotka sisältävät uuden promoottorin).

(c) TSL1-geeni promoottoreineen (pALK754)

EcoRI:n klooni 10 leikattiin restriktioentsyymeillä MluI ja NdeI ja saatu 4,4 kb suuruinen fragmentti kytkettiin uudelleen pBluescriptin SmaI-kohtaan. Tämä menettelytapa hävitti kaikki nämä kohdat, niin että näitä restriktioentsyymmeitä ei voida käyttää lisämanipulaatioissa. Plasmidi esitetään kuviossa 20c.

(d) TSL1-geeni ilman promoottoriaan (pALK757)

Valmistettiin alukkeita polymeraasiketjureaktiota (PCR) varten TSL1-geenin alkua ja sellaista sekvenssiä vastaan, joka sijaitsee +318:ssa. PCR:a (Techne PHC-2 Heat/Cool Dri-Block^{R}) käytettiin 325 bp suuruisen fragmentin syntetisointiin (55 °C:ssa), jolla fragmentilla on yhdessä päässä Spe I -kohta, ja lähellä toista päätä sillä sijaitsee BsmI-kohta. Tämä

fragmentti pilkottiin BsmI:llä ja se voidaan sitoa pALK754:ään, sen jälkeen kun viimeksi mainittu on leikattu SpeI:llä (kohdassa, pBluescript-polylinkkerissä) sekä BsmI:llä ja SpeI-kohta on täydennetty Klenow-fragmentilla. Lisämanipulaatioita varten geeni voidaan eristää, siten että syntyvä plasmidi leikataan SpaI:llä ja esimerkiksi ClaI:llä.

(e) Typistetty TSL1-geeni

TSL1:n muunnos voidaan valmistaa leikkaamalla pALK754 StuI:llä ja liittämällä tähän kohtaan seuraava linkkeri:
5'-GGGCCCAACA ACACAATGGT TACCCCGAAA TCGAGGGCGG GCAACAGG -3'
3'-CCCGGGTTGT TGTGTTACCA ATGGGGCTTT AGCTCCCGCC CGTTGTCC -5'

Linkkeri luo uudelleen StuI-kohdan sekä uuden ATG-aloituskodonin +627:ssä, lukuvaiheistuksessa koodittavan sekvenssin kanssa. Geenin tämä muunnos koodittaa täten typistettyä 123 kDa suuruista pitkää ketjua, jolta puuttuvat ensimmäiset 209 aminohappoa. Esimerkissä 10 julkistettiin, että ensimmäisten 325 tai noin 325 aminohapon poisto sujuu ilman katalyyttisen aktiivisuuden häviötä, mutta se vapauttaa trehaloosisyntaasin fosfaatin aiheuttamasta, voimakkaasta inhibitiosta sekä siitä, että syntaasi vaatii F6P:a. Niin ollen tämä konstruktio voi koodittaa typistettyä 123 kDa suuruista polypeptidiä, joka johtaa trehaloosisyntaasiin, jolla on lisääntynyt aktiivisuus fysiologisissa fosfaatin ja F6P:n konsentraatioissa. Tähän linkkeriin sisältyyy uusi SmaI-kohta. Uutta ATG:a reunustava sekvenssi muistuttaa alkuperäistä ATG:a reunustavaa sekvenssiä, ja ympäröivät nukleotidit ovat niiden sekvenssien mukaisia, joiden tiedetään useimmin esiintyvän asemissa -7 - +4.

(2) Hajottamismutantit.

TSS1-geeni hajotettiin, jotta varmistuttiin siitä, että se on trehaloosin synteesissä olennainen geeni. Yksivaiheinen gee-

nin hajottamismenetelmä [Rothstein, R.J. (1983) Methods in Enzymology 101, 202-211)], jota käytettiin, oli seuraava: Plasmidi pALK752 leikattiin XcmI:llä. Tylppä SalI-XhoI-fragmentti, joka sisälsi LEU2-geenin plasmidista yEp13 [Broach, J. et al. (1979) Gene 8, 121-133], sidottiin tylppään XcmI-kohtaan. Syntyvä plasmidi leikattiin NsiI:llä ja PvuI:llä ja reaktioseos ajettiin 0,8-prosenttisella agaroosigeelillä, jonka sulamispiste on alhainen. Geelistä leikattiin 4 kb suuruinen vyöhyke ja se puhdistettiin. S. cerevisiaen kanta S150-2B transformoitiin Chen et al.:n menetelmällä [(1992) Current Genetics 21, 83-84], siten että käytettiin 4 kb suuruista fragmenttia, joka sisälsi TSS1-geenin, jonka keskellä oli LEU2-geeni. Leu$^+$-transformantit valikoitiin minimaalisilla levyillä, joilta leusiini puuttui ja jotka sisälsivät glukoosia tai galaktoosia, ja saadut kloonit kasvatettiin vastaavasti YDP:llä tai YP - 2-prosenttisella galaktoosilla.

Odotusten mukaan hajotettujen tuotteiden fenotyyppi muistutti fdp1- ja cif1-fenotyyppejä (katso esimerkki 2). Ainoastaan yksi transformantti (ALKO3569) eristettiin glukoosilla, ja useat galaktoosilla eristetyt transformantit eivät pystyneet kasvamaan glukoosilla. Glukoositransformantti ja tutkittu galaktoositransformantti (ALKO3570) eivät koonneet trehaloosia stationaarisessa vaiheessa ($\leq$ 0,2 prosenttia kuivapainosta), niiltä puuttui TPS-aktiivisuus, ja niillä oli alhainen TPP-aktiivisuus ($\leq$ 10 prosenttia luonnonmukaisesta tyypistä). Sellaisia vyöhykkeitä, jotka vastaisivat 57 kDa suuruista polypeptidiä, ei voitu nähdä Western-bloteissa. Southern-analyysi ilmaisi, että TSS1-geenin katkaisi LEU2-geeni, mutta TSL1-geeni oli intakti.

Toinen mutantti WDC-3A (katso taulukko 1), jossa oli katkaistu TSS1-geeni, saatiin tohtori C. Gancedon laboratoriosta (Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Madris, Espanja) tss1::HIS3-hajottamistuotteina. Tämä mutantti oli helpompi transformoida kuin tss1::LEU2-hajottamistuotteet, ja niin sitä käytettiin sen varmistamiseksi, että TSS1-geeni

plasmidilla voi aikaansaada TPS- ja TPP-aktiivisuuksia, trehaloosin kerääntymistä ja parannetun stressin sietokyvyn. WDC-3A transformointiin plasmidilla pMB4 (katso taulukko 1; plasmidi sisältää intaktin CIF1 ≡ TSS1-geenin ja valikoitavan URA3-markkerin, ja transformantit valikoitiin urasiilin puuttuessa. Western-analyysit (ei esitetty) ilmaisivat, että transformantit olivat hankkineet 57 kDa suuruisen vyöhykkeen, joka puuttui WDC-3A:sta. Kantasolua ja transformanttia kasvatettiin rinnakkain minimaalisessa viljelyalustassa, joka sisälsi kaksi prosenttia galaktoosia eikä (transformantti) yhtään urasiilia tai joka sisälsi urasiilia (kantasolu). Kunkin kannan kaksoisviljelmät koottiin aikaisessa stationaarisessä vaiheessa, 28 h kasvatuksen jälkeen näytteitä otettiin stressinsietotutkimuksia varten ja jäännös käytettiin trehaloosi- ja entsyymimäärityksiin (taulukko 11).

Taulukko 11. WDC-3A:n ja sen pMB14-transformantin analyysi

Kaksoisviljelmistä analysoitiin erikseen trehaloosi ja sitten ne yhdistettiin entsyymimäärityksiä varten. TPS-aktiivisuudet korjattiin UDPGaasiaktiivisuuden suhteen, kun G6P ja F6P puuttuivat.

	WDC-3A (tss1::HIS3)	pMB14 (TSS1) Transformantti
Solumassa (g/100 ml viljelyalustaa)	2,6	2,8
Trehaloosi (% kuivapainoa)	0,84, 0,81	2,9, 3,0
Konaiset homogenaatit		
TPP (U/g tuoretta hiivaa)	0,2	0,84
TPS (U/g tuoretta hiivaa)	0,84 ± 0,37	17,9 ± 3,5
28,000 g supernatantit		
TPP (U/g tuoretta hiivaa)	0,01	0,67
TPS (U/G tuoretta hiivaa)	0,22 ± 0,20	14,6 ± 3,3
TPS (mU/mg proteiiinia)	4,0	223

Nämä tulokset julkistavat sen, että TSS1:n vieminen plasmidiin voi palauttaa sekä TPS- että TPP-aktiivisuudet ja lisätä organismin trehaloosipitoisuutta. TPP/TPS-suhde (5 prosenttia) on paljon alhaisempi kuin tämä suhde puhdistetulla trehaloosisyntaasilla (noin 35 prosenttia), kun taas esimerkissä 1 käytetyllä leivinhiivalla ja esimerkissä 2 käytetyllä X2180:lla, molemmilla TPP/TPS-suhteet ovat niiden homogenaateissa lähellä suhdetta, joka on puhtaalla entsyymillä. Tämä viittaa siihen, että transformaatio pMB14:ssä lisää TPP:a ainoastaan rajaan saakka, jonka isännän geneettinen tausta (todennäköisesti läsnäolevien 99 ja 123 kDa suuruisten peptidien määrät) asettaa, mutta transformaatio aiheuttaa suuremman lisääntymisen TPS:ssä, mikä johtuu aktiivisuudesta, joka liittyy myös 57 kDa suuruisiin ketjuihin, jotka eivät sisälly trehaloosisyntaasikompleksiin.

Transformantit ja isäntäorganisminäytteet jäädytettiin vedessä pitoisuutena, joka oli yksi μg hiivaa/ml, ja niitä pidettiin viiden päivän ajan -20 °C:ssa. Elinkykyisyys tutkittiin sitten maljoilla, jotka sisälsivät YP - 2-prosenttista galaktoosia. Jäädyttämisstressin jälkeen elossa oli 1,0 ± 0,1 prosenttia transformanteista ja ≤ 0,05 prosenttia isäntä-

soluista. Nämä tulokset julkistavat sen, että organismin transformaatio TSS1:llä voi lisätä sen vastustuskykyä jäädyttämisstressiä kohtaan.

(3) Transformaatiostrategiat

S. cerevisiaen laboratoriokantoja, joissa on auksotrofisia markkereita, kuten esimerkiksi his3, leu2, lys2, trp1 ja ura3, voidaan helposti transformoida trehaloosisyntaasigeeneillä, olennaisesti samoilla menetelmillä, joita kuvataan tss1:n hajottamistuotteiden TSS1:llä suoritettavalle transformaatiolle. Voidaan käyttää geenien muunnoksia, joissa luonnonmukaiset promoottorit ja terminaattorit ovat intakteja tai jotka on korvattu (voimakkaammilla tai säädeltävillä) promoottoreilla ja terminaattoreilla, jotka ovat peräisin muista hiivageeneistä. Esimerkiksi PGKI- [pMA91; Mellor et al (1983) Gene 24, 1-14], ADC1- [pAAH5; Ammerer (1983) Methods in Enzymology 101, 192-201] ja MEL1-järjestelmiä [pALK3537, pALK41, jne., Suominen, P.L. (1988) tohtorinväitöskirja, Helsingin yliopisto] on käytetty geenien ilmentymistason lisäämiseksi S. cerevisiaella ja muilla hiivoilla. MEL1-järjestelmällä on etuna, että ilmentymistä voidaan säädellä, siten että sitä repressoidaan glukoosilla ja indusoidaan galaktoosilla. On saatavissa standardi vektoreita [sellaisia episomaalisia sekä kokonaisuudeksi yhdistäviä ja hiivan sentromeeriplasmideja ovat Rose & Broach (1990) selostaneet julkaisussa Methods in Enzymology 185, 234-279, sekä Stearns, T., Ma, H & Botstein, D. (1990); Methods in Enzymology 185, 280-291], jotka sisältävät auksotrofisia markkereita, kuten esimerkiksi HIS3:n, LEU2:n, TRP1:n ja URA3:n, joita voidaan käyttää transformanttien valintaan. Alan ammattimies voi valmistaa näihin periaatteisiin perustuvia vektoreita mutta sellaisia, jotka soveltuvat tiettyyn tehtävään.

Perusstrategiana on jättää hiivalle sen luonnonmukaisten geenien intakti muunnos trehaloosisyntaasia varten ja viedä hiivan sisään geenien ylimääräisiä kopioita joko episomeilla

tai integroida ne hiivan kromosomiin. Nämä geenit voivat olla omien promoottoreidensa kontrollin alla tai voimakkaampien promoottoreiden ja sellaisten promoottoreiden kontrolloimia, joita voidaan säädellä, esimerkiksi siten että lisätään substansseja, kuten galaktoosia, viljelyalustaan tai muutetaan lämpötilaa. Sellaisten promoottoreiden käyttöä on kuvattu [katso esimerkiksi Mylin et al. (1990) Methods in Enzymology 185, 297-308; Sledziewski et al. (1990) Methods in Enzymology 185, 351-366]. Tämä strategia välttää ongelmat, joita voidaan ennakoida, jos geenien kaikki kopiot asetetaan tiukan kontrollin alle (kuten esimerkiksi sokerikatabolian puutteet, joita voidaan odottaa, jos TSS1 ei ilmenny sopivasti; katso esimerkki 7). Sellainen transformoitu hiiva, jossa on geenien lisäkopioita luonnonmukaisine promoottoreineen, voi kerätä riittävästi trehaloosia, jotta stabiliteetti paranee halutulla tavalla. Käymisolosuhteissa ne voivat myös kierrättää riittävästi glukoosiyksiköitä trehaloosin kautta, jotta tuotetaan ATPaasia, joka kiihdyttää käymistä ja lisää etanolin saantoa glukoosilla. Vaihtoehtoisesti yhden tai useamman geenin promoottorit voidaan vaihtaa promoottoreihin, jotka ovat aktiivisempia käymisolosuhteissa. Keksinnön eräässä toisessa näkökohdassa geenien ORF:ien kopioita voidaan insertoida ilmentymisvektoreihin, jotka ovat varustetut voimakkailla promoottoreilla (jotka voivat olla säädeltävissä), jotta aikaansaadaan vielä suurempia lisäyksiä trehaloosissa. Tämä voi olla erityisen käyttökelpoista trehaloosin tuottamiselle.

Hiiva voidaan transformoida kahdella tai kolmella geenillä useilla tavoilla. Ilmeisin menettelytapa on käyttää erilaisia auksotrofisia markkereita ja viedä geenit sisään peräkkäin. Toinen menetelmä on konstruoida YIp, joka sisältää URA3:n ja TSL1:n muunnetun version voimakkaan promoottorin kanssa mutta siten, että se sisältää vielä homologisen alueen tämän promoottorin yläpuolella. Sen jälkeen kun tämä plasmidi on suunnatusti integroitu kromosomaaliseen ura3-kohtaan ja URA+-transformantit on valittu, sellaiset mutantit, joista URA3 on

jälleen poistettu (taajuudella, joka on noin 1 x 10^{-4}), voidaan valita kasvattamalla viljelyalustalla, joka sisältää 5-fluoriorotiinihappoa [katso Stearns et al. (1990) samassa paikassa]. Jotkut valitut solut varmaan sisältäisivät geenin uuden version voimakkaan promoottorin kanssa, ja ne voidaan jälleen transformoida, tällä kertaa vaikkapa muunnetun TSS1-geenin kanssa. Saadut transformantit sisältävät TSL1:n yhden kopion, jota uusi promoottori säätelee, sekä kaksi TSS1:n kopiota, joista toinen on vielä luonnonmukaisen promoottorin säätelyn alla. Kolmanneksi, kaksi tai kaikki kolme geeniä sisältävää YIp:tä voidaan käyttää geenien sisäänvientiin, joka tapahtuu yhdessä ainoassa vaiheessa.

Kirjallisuudessa on kuvattu erilaisia menetelmiä sellaisen teollisen, polyploidisen hiivan transformoimiseksi, jolta auksotrofiset markkerit puuttuvat. Aiempia menetelmiä ovat selostaneet Knowles, J.K.C. & Tubb, R.S. [(1987) E.B.C. symbosium on brewer yeast, Helsinki, 1986. Monograph XII 169-185], ja kuvatut menetelmät sisältävät sellaisten markkerigeenien käytön, jotka antavat resistenssin antibiooteille, metyyliglyoksaalille, kuparille, kanelihapolle ja muille yhdisteille. Nämä markkerit helpottavat transformanttien valintaa. Jotkut itse näistä markkerigeeneistä ovat hiivasta peräisin, ja siksi ne ovat edullisia hyväksyttävyyssyistä. Kun geenien sopivia muunnokset ja yhdistelmät on identifioitu laboratoriohiivaa käyttämällä, ne voidaan siirtää teolliseen hiivaan, siten että käytetään tässä esitettyjä tai kirjallisuudessa kuvattuja muita menetelmiä, kuten esimerkiksi kotransformaatiota, joka suoritetaan pALK2:lla ja pALK7:llä [Suominen, P.I. (1988) samassa paikassa]. Nämä plasmidit sisältävät helposti valikoitavia MEL1-markkerigeenejä 2 μ -pohjaisella plasmidilla, joita markkereita voidaan helposti käyttää hyväksi, mikä täten helpottaa peräkkäisiä transformaatiota, jotka suoritetaan useammalla kuin yhdellä geenillä, jos ei ole käytännöllistä viedä muunnettuja geenejä soluun yhdessä vaiheessa, siten että käytetään tätä kotransformaatiomenettelyä.

Esimerkki 15. Viljelykasvien transformaatio

On kuvattu viljelykasvien, taloudellisesti tärkeät viljelykasvit mukaan luettuina, transformaatiomenetelmiä [Goodman et al. (1987) Science 236, 48-54; Weisinger et al., (1988) Annual Review of Genetics 22, 421-477; Glasser & Fraley (1989) Science 244, 1293-1299; Lindsey, K. (1992) Journal of Biotechnology 26, 1 - 28], ja on saatavissa laboratoriokäsikirjoja, kuten esimerkiksi Plant Molecular Biology Manual [toimittajat Gelvin & Schnilperoort (1988) Kluwer Academic Press], joissa esitetään standardi menettelytapoja. Erityistä hyötyä on sellaisten kudosspesifisten promoottoreiden käytöllä, jotka ovat peräisin proteiinien geeneistä, jotka ilmentyvät erittäin kudosspesifisellä tavalla [katso esimerkiksi, Higgins (1984) Annual Review of Plant Physiology 35, 191 ja seuraavat sivut; Shotwell ja Larkins 81989) julkaisussa The Biochemistry of Plants 15, 297 ja seuraavat sivut]. Tällaisten promoottoreiden käyttö mahdollistaa trehaloosisyntaasin ilmentymisen (a) spesifisesti pakkaselle ja kuivuudelle herkissä kasvien kudoksissa, niin että ne voidaan suojata näiltä ja samanlaisilta stresseiltä, johdattamatta hiilihydraattimetaboliaa toisaalle pääasiallisista varastokudoksista, tai vaihtoehtoisesti (b) ilmentyminen tapahtuu vain syötäväksi kelpaavissa kudoksissa. Tämän toisen vaihtoehdon tarkoituksena on aiheuttaa trehaloosin kerääntymistä tuotteisiin, kuten esimerkiksi tomaattikasvin hedelmiin, jotta näiden tuotteiden varastointiaikaa lisätään. Voidaan parantaa sellaisten ei kasvigeenien ilmentymistä, joilla on suurempi A+T-pitoisuus kuin kasvigeeneissä on tavallista, siten että vaihdetaan kodonit, jotta G+C-pitoisuus nousee ja jotta erityisesti vältetään alueita, joissa on suuri A+T-kokonaispitoisuus [Parlak et al. (1991) samassa paikassa]. Ennalta on nähtävissä, että sellaiset muunnokset ovat hyödyllisiä geeneillä TSS1 ja TSL1, joissa on alueita, jotka sisältävät runsaasti A+T:a. On saatavissa valikointijärjestelmiä, joita voidaan käyttää korkeampien kasvien transformaatioon, mukaan luettuina plasmidit, jotka sisältävät geenin (hpt) hygro-

mysiinifosfotransferaasia varten [Dale & Ow (1991) Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 88, 1055810562]. Näitä ja näiden kaltaisia menetelmiä, jotka ovat alan ammattimiehelle tuttuja, voidaan käyttää siihen, että hiivan trehaloosisyntaasigeenin erilaisia muunnoksia viedään ensin Arabidopsis thalianaan, ja sitten onnistuneimmat muunnokset siirretään taloudellisesti tärkeisiin kasveihin.

Yksi esimerkki siitä, kuinka olisi mahdollista transformoida viljelykasvi (kaksisirkkainen ja joitakin monisirkkaisia), on Ti-plasmidin käyttö. Ti-plasmidin suuri fragmentti, joka sisältää sekä T-DNA- että vir-alueet, kloonataan ensin yleiseen, bakteeriperäiseen plasmidiin pBR322. Kloonataan sitten yksi tai useampia trehaloosisyntaasigeenejä T-DNA:n alueeseen, joka ei ole välttämätön, ja viedään Agrobacterium tumefaciensseen, jossa on intakti Ti-plasmidi. Sitten kasvit infektoidaan näillä bakteereilla ja Ti-plasmidilla sijaitsevan vir-alueen geenin tuotteet mobilisoivat yhdistelmä-T-DNA:n, ja yhdistelmä-T-DNA yhdentyy kasvin genomiin. Kasviin voidaan viedä tällä tavalla yksi tai useampia trehaloosisyntaasigeenejä insertoimalla geenit joko samaan plasmidiin tai erillisiin plasmideihin.

SEKVENSSILISTAUS

(1) YLEISET TIEDOT

(i) HAKIJA:
(A) NIMI: ALKO LTD. (et al.)
(B) KATU: Salmisaarenranta 7
(C) KAUPUNKI: Helsinki
(D) MAA: : Suomi
(E) POSTINUMERO: FIN-00100

(ii) KEKSINNÖN NIMITYS: Eliöiden trehaloosipitoisuuden lisääminen transformoimalla ne trehaloosisyntaasi rakenteellisten geenien yhdistelmillä

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 85

(iv) AIKAISEMPIEN HAKEMUSTEN TIEDOT:
(A) HAKEMUKSEN NUMERO: US / 07/836,021
(B) HAKEMISPÄIVÄ: 14. helmikuuta 1992

(A) HAKEMUKSEN NUMERO: US / 07/841,997
(B) HAKEMISPÄIVÄ: 28. helmikuuta 1992

(2) SEKVENSSIN ID NO:1 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 2481 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleotidi
(C) JUOSTEISUUS: Kaksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Genomi-DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iv) ANTI-SENSE: ei

(vi) ALKUPERÄ:
(A) ORGANISMI: Saccharomyces cerevisiae
(B) KANTA: S288C
(E) HAPLOTYYPPI: Haploidi

(vii) VÄLITÖN LÄHDE:
(A) KIRJASTO: Genomi
(B) KLOONI: 20

(viii) ASEMA PERIMÄSSÄ:
(A) KROMOSOMI: 2R

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:1

```
TTTTTAAACG TATATAGATG TCTACATGTG TGTTTTTGTT TTTTTACGTA   50
CGTATACCCA CCTATATATG CATAATCCGT AATTGAAAAA AAAAAAAGTA  100
AAGATCAAGG AACACATCAC CCTGGGCACA TCAAGCGTGA GGAATGCCGT  150
CCAACTGGTG GAGACGCTTG ATTTGCTCTT TTTGTTCCTG GGTCCAACCC  200
GGTCTCGAAG AACATCAGCA CCACGCCCGC AACGACAAAG AACATTGCAA  250
TACACTTGCA TATGTGAGCA TAGTCGAGCG GTCCGTTCTG TGGTTGATGC  300
TGTTGTTCTT TCTTCTGTTT GTCAGGGGTG ATAGCCATAT CTTCGTGCTC  350
TTGTTGCGAT TGTTCTGTTC CATCTGCACC AGAACAAAGA ACAAAAGAAC  400
AAGGAACAAA GTCCAAGCAC GTCAGCGCTG TTTATAAGGG GATTGACGAG  450
GGATCGGGCC TAGAGTGCCA GCGCGCCAGG GAGAGGGAGC CCCCTGGGCC  500
CTCATCCGCA GGCTGATAGG GGTCACCCCG CTGGGCAGGT CAGGGCAGGG  550
GCTCTCAGGG GGGCGCCATG GACAAACTGC ACTGAGGTTC TAAGACACAT  600
GTATTATTGT GAGTATGTAT ATATAGAGAG AGATTAAGGC GTACAGCCGG  650
GTGGTAGAGA TTGATTAACT TGGTAGTCTT ATCTTGTCAA TTGAGTTTCT  700
GTCAGTTTCT TCTTGAACAA GCACGCAGCT AAGTAAGCAA CAAAGCAGGC  750
TAACAAACTA GGTACTCACA TACAGACTTA TTAAGACATA GAACTATGAC  800
TACGGATAAC GCTAAGGCGC AACTGACCTC GTCTTCAGGG GGTAACATTA  850
TTGTGGTGTC CAACAGGCTT CCCGTGACAA TCACTAAAAA CAGCAGTACG  900
GGACAGTACG AGTACGCAAT GTCGTCCGGA GGGCTGGTCA CGGCGTTGGA  950
AGGGTTGAAG AAGACGTACA CTTTCAAGTG GTTCGGATGG CCTGGGCTAG 1000
AGATTCCTGA CGATGAGAAG GATCAGGTGA GGAAGGACTT GCTGGAAAAG 1050
TTTAATGCCG TACCCATCTT CCTGAGCGAT GAAATCGCAG ACTTACACTA 1100
CAACGGGTTC AGTAATTCTA TTCTATGGCC GTTATTCCAT TACCATCCTG 1150
GTGAGATCAA TTTCGACGAG AATGCGTGGT TCGGATACAA CGAGGCAAAC 1200
CAGACGTTCA CCAACGAGAT TGCTAAGACT ATGAACCATA ACGATTTAAT 1250
CTGGGTGCAT GATTACCATT TGATGTTGGT TCCGGAAATG TTGAGAGTCA 1300
AGATTCACGA GAAGCAACTG CAAAACGTTA AGGTCGGGTG GTTCCTGCAC 1350
ACACCATTCC CTTCGAGTGA AATTTACAGA ATCTTACCTG TCAGACAAGA 1400
GATTTTGAAG GGTGTTTTGA GTTGTGATTT AGTCGGGTTC CACACATACG 1450
ATTATGCAAG ACATTTCTTG TCTTCCGTGC AAAGAGTGCT TAACGTGAAC 1500
ACATTGCCTA ATGGGGTGGA ATACCAGGGC AGATTCGTTA ACGTAGGGGC 1550
CTTCCCTATC GGTATCGACG TGGACAAGTT CACCGATGGG TTGAAAAAGG 1600
AATCCGTACA AAAGAGAATC CAACAATTGA AGGAAACTTT CAAGGGCTGC 1650
AAGATCATAG TTGGTGTCGA CAGGCTGGAT TACATCAAAG GTGTGCCTCA 1700
GAAGTTGCAC GCCATGGAAG TGTTTCTGAA CGAGCATCCA GAATGGAGGG 1750
GCAAGGTTGT TCTGGTACAG GTTGCAGTGC CAAGTCGTGG AGATGTGGAA 1800
GAGTACCAAT ATTTAAGATC TGTGGTCAAT GAGTTGGTCG GTAGAATCAA 1850
CGGTCAGTTC GGTACTGTGG AATTCGTCCC CATCCATTTC ATGCACAAGT 1900
CTATACCATT TGAAGAGCTG ATTTCGTTAT ATGCTGTGAG CGATGTTTGT 1950
TTGGTCTCGT CCACCCGTGA TGGTATGAAC TTGGTTTCCT ACGAATATAT 2000
TGCTTGCCAA GAAGAAAAGA AAGGTTCCTT AATCCTGAGT GAGTTCACAG 2050
GTGCCGCACA ATCCTTGAAT GGTGCTATTA TTGTAAATCC TTGGAACACC 2100
GATGATCTTT CTGATGCCAT CAACGAGGCC TTGACTTTGC CCGATGTAAA 2150
GAAAGAAGTT AACTGGGAAA AACTTTACAA ATACATCTCT AAATACACTT 2200
CTGCCTTCTG GGGTGAAAAT TTCGTCCATG AATTATACAG TACATCATCA 2250
AGCTCAACAA GCTCCTCTGC CACCAAAAAC TGATGAACCC GATGCAAATG 2300
AGACGATCGT CTATTCCTGG TCCGGTTTTC TCTGCCCTCT CTTCTATTCA 2350
CTTTTTTTAT ACTTTATATA AAATTATATA AATGACATAA CTGAAACGCC 2400
ACACGTCCTC TCCTATTCGT TAACGCCTGT CTGTAGCGCT GTTACTGAAG 2450
CTGCGCAAGT AGTTTTTTCA CCGTATAGGC C                     2481
```

(3) SEKVENSSIN ID NO:2 TIEDOT

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET
(A) PITUUS: 495 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGY: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Polypeptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Kyllä

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:2

Met Thr Thr Asp Asn Ala Lys Ala Gln Leu Thr Ser Ser Ser Gly
5 10 15
Gly Asn Ile Ile Val Val Ser Asn Arg Leu Pro Val Thr Ile Thr
20 25 30
Lys Asn Ser Ser Thr Gly Gln Tyr Glu Tyr Ala Met Ser Ser Gly
35 40 45
Gly Leu Val Thr Ala Leu Glu Gly Leu Lys Lys Thr Tyr Thr Phe
50 55 60
Lys Trp Phe Gly Trp Pro Gly Leu Glu Ile Pro Asp Asp Glu Lys
65 70 75
Asp Gln Val Arg Lys Asp Leu Leu Glu Lys Phe Asn Ala Val Pro
80 85 90
Ile Phe Leu Ser Asp Glu Ile Ala Asp Leu His Tyr Asn Gly Phe
95 100 105
Ser Asn Ser Ile Leu Trp Pro Leu Phe His Tyr His Pro Gly Glu
110 115 120
Ile Asn Phe Asp Glu Asn Ala Trp Phe Gly Tyr Asn Glu Ala Asn
125 130 135
Gln Thr Phe Thr Asn Glu Ile Ala Lys Thr Met Asn His Asn Asp
140 145 150
Leu Ile Trp Val His Asp Tyr His Leu Met Leu Val Pro Glu Met
155 160 165
Leu Arg Val Lys Ile His Glu Lys Gln Leu Gln Asn Val Lys Val
170 175 180
Gly Trp Phe Leu His Thr Pro Phe Pro Ser Ser Glu Ile Tyr Arg
185 190 195
Ile Leu Pro Val Arg Gln Glu Ile Leu Lys Gly Val Leu Ser Cys
200 205 210
Asp Leu Val Gly Phe His Thr Tyr Asp Tyr Ala Arg His Phe Leu
215 220 225
Ser Ser Val Gln Arg Val Leu Asn Val Asn Thr Leu Pro Asn Gly
230 235 240
Val Glu Tyr Gln Gly Arg Phe Val Asn Val Gly Ala Phe Pro Ile
245 250 255
Gly Ile Asp Val Asp Lys Phe Thr Asp Gly Leu Lys Lys Glu Ser
260 265 270
Val Gln Lys Arg Ile Gln Gln Leu Lys Glu Thr Phe Lys Gly Cys
275 280 285
Lys Ile Ile Val Gly Val Asp Arg Leu Asp Tyr Ile Lys Gly Val
290 295 300
Pro Gln Lys Leu His Ala Met Glu Val Phe Leu Asn Glu His Pro
305 310 315

Glu Trp Arg Gly Lys Val Val Leu Val Gln Val Ala Val Pro Ser
320 325 330
Arg Gly Asp Val Glu Glu Tyr Gln Tyr Leu Arg Ser Val Val Asn
335 340 345
Glu Leu Val Gly Arg Ile Asn Gly Gln Phe Gly Thr Val Glu Phe
350 355 360
Val Pro Ile His Phe Met His Lys Ser Ile Pro Phe Glu Glu Leu
365 370 375
Ile Ser Leu Tyr Ala Val Ser Asp Val Cys Leu Val Ser Ser Thr
380 385 390
Arg Asp Gly Met Asn Leu Val Ser Tyr Glu Tyr Ile Ala Cys Gln
395 400 405
Glu Glu Lys Lys Gly Ser Leu Ile Leu Ser Glu Phe Thr Gly Ala
410 415 420
Ala Gln Ser Leu Asn Gly Ala Ile Ile Val Asn Pro Trp Asn Thr
425 430 435
Asp Asp Leu Ser Asp Ala Ile Asn Glu Ala Leu Thr Leu Pro Asp
440 445 450
Val Lys Lys Glu Val Asn Trp Glu Lys Leu Tyr Lys Tyr Ile Ser
455 460 465
Lys Tyr Thr Ser Ala Phe Trp Gly Glu Asn Phe Val His Glu Leu
470 475 480
Tyr Ser Thr Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Ala Thr Lys Asn
485 490 495

(4) SEKVENSSIN ID NO:3 TIEDOT

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET
(A) PITUUS: 3000 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleotidi
(C) JUOSTEISUUS: Kaksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Genomi-DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:
(A) ORGANISMI: Saccharomyces cerevisiae
(B) KANTA: S288C
(E) HAPLOTYYPPI: Haploidi

(vii) VÄLITÖN LÄHDE:
(A) KIRJASTO: Genomi
(B) KLOONI: 6

(viii) ASEMA PERIMÄSSÄ
(A) KROMOSOMI: 13

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:3

```
CCTCCTCTGG ATCTTCTGGG TCTTCTGCGC CACCTTCCAT TAAAAGGATT     50
ACGCCCCACT TGACTGCGTC TGCTGCAAAA CAGCGTCCCT TATTGGCTAA    100
ACAGCCTTCT AATCTGAAAT ATTCGGAGTT AGCAGATATT TCGTCGAGTG    150
AGACGTCTTC GCAGCATAAT GAGTCGGACC CGGATGATCT AACTACTGCC    200
CTGACGAGGA TATGTTTCTG ATTAGGAATT GATGACGCGA GAGGACTACA    250
AGGTTCAAAG TTCGGCGCTA TTCATAAATC AACTAAGAAA TATGCGCTGT    300
TAAGGTCATC TCAGGAGCTG TTTAGCCGTC TTCCATGGTC GATCGTTCCC    350
TCTATCAAAG GTAATGGCGC CATGAAGAAC GCCATAAACA CTGCAGTCTT    400
GGAGAATATC ATTCCGCACC GTCATGTTAA GTGGGTCGGT ACCGTCGGAA    450
TCCCAACGGA TGAGATTCCG GAAAATATCC TTGCGAACAT CTCTGACTCT    500
TTAAAAGACA AGTACGACTC CTATCCTGTC CTTACGGACG ACGACACCTT    550
CAAAGCCGCA TACAAAAACT ACTGTAAACA AATCTTGTGG CCTACGCTGC    600
ATTACCAGAT TCCAGACAAT CCGAACTCGA AGGCTTTTGA AGATCACTCT    650
TGGAAGTTCT ATAGAAACTT AAACCAAAGG TTTGCGGACG CGATCGTTAA    700
AATCTATAAG AAAGGTGACA CCATCTGGAT TCATGATTAC CATTTAATGC    750
TGGTTCCGCA GATGGTGAGA GACGTCTTGC CTTTTGCCAA AATAGGATTT    800
ACCTTACATG TCTCGTTCCC CAGTAGTGAA GTGTTTAGGT GTCTGGCTCA    850
GCGTGAGAAG ATCTTAGAAG GCTTGACCGG TGCAGACTTT GTCGGCTTCC    900
AGACGAGGGA GTATGCAAGA CATTTCTTAC AGACGTCTAA CCGTCTGCTA    950
ATGGCGGACG TGGTACATGA TGAAGAGCTA AAGTATAACG GCAGAGTCGT   1000
TTCTGTGAGG TTCACCCCAG TTGGTATCGA CGCCTTTGAT TTGCAATCGC   1050
AATTGAAGGA TGGAAGTGTC ATGCAATGGC GTCAATTGAT TCGTGAAAGA   1100
TGGCAAGGGA AAAAACTAAT TGTGTGTCGT GATCAATTCG ATAGAATTAG   1150
AGGTATTCAC AAGAAATTGT TGGCTTATGA AAAATTCTTG GTCGAAAATC   1200
CGGAATACGT GGAAAAATCG ACTTTAATTC AAATCTGTAT TGGAAGCAGT   1250
AAGGATGTAG AACTGGAGCG CCAGATCATG ATTGTCGTGG ATAGAATCAA   1300
CTCGCTATCC ACCAATATTA GTATTTCTCA ACCTGTGGTG TTTTTGCATC   1350
AAGATCTAGA TTTTTCTCAG TATTTAGCTT TGAGTTCAGA GGCAGATTTG   1400
TTCGTAGTCA GCTCTCTAAG GGAAGGTATG AACTTGACAT GTCACGAATT   1450
TATCGTTTGT TCTGAGGACA AAAATGCTCC CCTACTGTTG TCAGAATTTA   1500
CTGGTAGTGC ATCTTTATTG AATGATGGCG CTATAATAAT TAACCCATGG   1550
GATACCAAGA ACTTCTCACA AGCCATTCTC AAGGGGTTGG AGATGCCATT   1600
CGATAAGAGA AGGCCACAGT GGAAGAAATT GATGAAAGAC ATTATCAACA   1650
ACGACTCTAC AAACTGGATC AAGACTTCTT TACAAGATAT TCATATTTCG   1700
TGGCAATTCA ATCAAGAAGG TTCCAAGATC TTCAAATTGA ATACAAAAAC   1750
ACTGATGGAA GATTACCAGT CATCTAAAAA GCGTATGTTT GTTTTCAACA   1800
TTGCTGAACC ACCTTCATCG AGAATGATTT CCATACTGAA TGACATGACT   1850
TCTAAGGGCA ATATCGTTTA CATCATGAAC TCATTTCCAA AGCCCATTCT   1900
GGAAAATCTT TACAGTCGTG TGCAAAACAT TGGGTTGATT GCCGAGAATG   1950
GTGCATACGT TAGTCTGAAC GGTGTATGGT ACAACATTGT TGATCAAGTC   2000
GATTGGCGTA ACGATGTAGC CAAAATTCTC GAGGACAAAG TGGAGAGATT   2050
ACCTGGCTCG TACTACAAGA TAAATGAGTC CATGATCAAG TTCCACACTG   2100
AAAATGCGGA AGATCAAGAT CGTGTAGCTA GTGTTATCGG TGATGCCATC   2150
ACACATATCA ATACTGTTTT TGACCACAGA GGTATTCATG CCTACGTTTA   2200
CAAAAACGTT GTTTCCGTAC AACAAGTGGG ACTTTCCTTA TCGGCAGCTC   2250
AATTTCTTTT CAGATTCTAT AATTCTGCTT CGGATCCACT GGATACGAGT   2300
TCCGGCCAAA TCACAAATAT TCAGACACCA TCTCAACAAA ATCCTTCAGA   2350
TCAAGAACAA CAACCTCCAG CCTCTCCCAC TGTGTCGATG AACCATATTG   2400
ATTTCGCATG TGTCTCTGGT TCATCGTCTC CTGTGCTTGA ACCATTGTTC   2450
AAATTGGTCA ATGATGAAGC AAGTGAAGGG CAAGTAAAAG CCGGACACGC   2500
CATTGTTTAT GGTGATGCTA CTTCTACTTA TGCCAAAGAA CATGTAAATG   2550
GGTTAAACGA ACTTTTCACG ATCATTTCAA GAATCATTGA AGATTAAATT   2600
TTACCATTTT AAAATTTTAA TGTTCTTGGG TATGAACTTT TATTTTCAAC   2650
TGCTTATTAT ATATCAATTC TATAAATTTT TTTCTTCTCT CTAACGACCA   2700
ATTATAAAAT TCATCCTCTT ATTTATTACA GCATCTTATA CATTATGTAT   2750
ATGGGTAGCT ATTATTCATT TTTGCTTCGT AAGGACTTTT TTTGTCAACT   2800
```

TTTTCATCCT AAGCGGCTAA AAGTGATTGG AGAGGAATGT CCAGGCGACC 2850
AATGATAAAA ACGCTTTCTC TTGGAACAAG AAATAGGAGC AATTGACAGT 2900
TGTCGATGAA CAGCGAAAAT AGTAAGATAA CCTTCAAGCC CAATATTCTA 2950
ATTAAAGGCG TTTATATATT TGTACTTTAT GGTATGTGCA TATGTATTGT 3000

(5) SEKVENSSIN ID NO:4 TIEDOT

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 785 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Polypeptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Kyllä

(v) FRAGMENTTITYYPPI: C-terminaalinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:4

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

Val Arg Phe Thr Pro Val Gly Ile Asp Ala Phe Asp Leu Gln Ser
260 265 270
Gln Leu Lys Asp Gly Ser Val Met Gln Trp Arg Gln Leu Ile Arg
275 280 285
Glu Arg Trp Gln Gly Lys Lys Leu Ile Val Cys Arg Asp Gln Phe
290 295 300
Asp Arg Ile Arg Gly Ile His Lys Lys Leu Leu Ala Tyr Glu Lys
305 310 315
Phe Leu Val Glu Asn Pro Glu Tyr Val Glu Lys Ser Thr Leu Ile
320 325 330
Gln Ile Cys Ile Gly Ser Ser Lys Asp Val Glu Leu Glu Arg Gln
335 340 345
Ile Met Ile Val Val Asp Arg Ile Asn Ser Leu Ser Thr Asn Ile
350 355 360
Ser Ile Ser Gln Pro Val Val Phe Leu His Gln Asp Leu Asp Phe
365 370 375
Ser Gln Tyr Leu Ala Leu Ser Ser Glu Ala Asp Leu Phe Val Val
380 385 390
Ser Ser Leu Arg Glu Gly Met Asn Leu Thr Cys His Glu Phe Ile
395 400 405
Val Cys Ser Glu Asp Lys Asn Ala Pro Leu Leu Leu Ser Glu Phe
410 415 420
Thr Gly Ser Ala Ser Leu Leu Asn Asp Gly Ala Ile Ile Ile Asn
425 430 435
Pro Trp Asp Thr Lys Asn Phe Ser Gln Ala Ile Leu Lys Gly Leu
440 445 450
Glu Met Pro Phe Asp Lys Arg Arg Pro Gln Trp Lys Lys Leu Met
455 460 465
Lys Asp Ile Ile Asn Asn Asp Ser Thr Asn Trp Ile Lys Thr Ser
470 475 480
Leu Gln Asp Ile His Ile Ser Trp Gln Phe Asn Gln Glu Gly Ser
485 490 495
Lys Ile Phe Lys Leu Asn Thr Lys Thr Leu Met Glu Asp Tyr Gln
500 505 510
Ser Ser Lys Lys Arg Met Phe Val Phe Asn Ile Ala Glu Pro Pro
515 520 525
Ser Ser Arg Met Ile Ser Ile Leu Asn Asp Met Thr Ser Lys Gly
530 535 540
Asn Ile Val Tyr Ile Met Asn Ser Phe Pro Lys Pro Ile Leu Glu
545 550 555
Asn Leu Tyr Ser Arg Val Gln Asn Ile Gly Leu Ile Ala Glu Asn
560 565 570
Gly Ala Tyr Val Ser Leu Asn Gly Val Trp Tyr Asn Ile Val Asp
575 580 585
Gln Val Asp Trp Arg Asn Asp Val Ala Lys Ile Leu Glu Asp Lys
590 595 600
Val Glu Arg Leu Pro Gly Ser Tyr Tyr Lys Ile Asn Glu Ser Met
605 610 615
Ile Lys Phe His Thr Glu Asn Ala Glu Asp Gln Asp Arg Val Ala
620 625 630
Ser Val Ile Gly Asp Ala Ile Thr His Ile Asn Thr Val Phe Asp
635 640 645
His Arg Gly Ile His Ala Tyr Val Tyr Lys Asn Val Val Ser Val
650 655 660
Gln Gln Val Gly Leu Ser Leu Ser Ala Ala Gln Phe Leu Phe Arg
665 670 675

```
                    665                 670                 675
Phe Tyr Asn Ser Ala Ser Asp Pro Leu Asp Thr Ser Ser Gly Gln
                    680                 685                 690
Ile Thr Asn Ile Gln Thr Pro Ser Gln Gln Asn Pro Ser Asp Gln
                    695                 700                 705
Glu Gln Gln Pro Pro Ala Ser Pro Thr Val Ser Met Asn His Ile
                    710                 715                 720
Asp Phe Ala Cys Val Ser Gly Ser Ser Ser Pro Val Leu Glu Pro
                    725                 730                 735
Leu Phe Lys Leu Val Asn Asp Glu Ala Ser Glu Gly Gln Val Lys
                    740                 745                 750
Ala Gly His Ala Ile Val Tyr Gly Asp Ala Thr Ser Thr Tyr Ala
                    755                 760                 765
Lys Glu His Val Asn Gly Leu Asn Glu Leu Phe Thr Ile Ile Ser
                    770                 775                 780
Arg Ile Ile Glu Asp
                    785
```

(6) SEKVENSSIN ID NO:5 TIEDOT

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 4 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappa
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:5

Tyr Ile Ser Lys

(7) SEKVENSSIN ID NO:6 TIEDOT

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:6

Asp Val Glu Glu Tyr Gln Tyr Leu Arg
5

(8) SEKVENSSIN ID NO:7 TIEDOT

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 8 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIKUVAUS: SEKVENSSI ID NO:7

His Phe Leu Ser Ser Val Gln Arg
5

(9) SEKVENSSIN ID NO:8 TIEDOT

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 14 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:8

Val Leu Asn Val Asn Thr Leu Pro Asn Gly Val Glu Tyr Gln
5 10

(10) SEKVENSSIN ID NO:9 TIEDOT

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:9

Ser Val Val Asn Glu Leu Val Gly Arg
5

(11) SEKVENSSIN ID NO:10 TIEDOT

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 4
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:10

Glu Thr Phe Lys

(12) SEKVENSSIN ID NO:11 TIEDOT

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 5 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:11

Leu Asp Tyr Ile Lys
5

(13) SEKVENSSIN ID NO:12 TIEDOT

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 5 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:12

Ile Leu Pro Val Arg
5

(14) SEKVENSSIN ID NO:13 TIEDOT

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 6 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:13

Glu Val Asn Xaa Glu Lys
5

(15) SEKVENSSIN ID NO:14

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 5 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:14

Phe Tyr Asp Xaa Xaa
5

(16) SEKVENSSIN ID NO:15 TIEDOT

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 13 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:15

Leu Xaa Ala Met Glu Val Phe Leu Asn Glu Xaa Pro Glu
5 10

(17) SEKVENSSIN ID NO:16

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 14 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:16

Tyr Thr Ser Ala Phe Trp Gly Glu Asn Phe Val Xaa Glu Leu
5 10

(18) SEKVENSSIN ID NO:17

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:17

Phe Gly Xaa Pro Gly Leu Glu Ile Pro
5

(19) SEKVENSSIN ID NO:18

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 6 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:18

Xaa Gly Ser Val Met Gln
5

(20) SEKVENSSIN ID NO:19

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 7 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:19

Leu Pro Gly Ser Tyr Tyr Lys
5

(21) SEKVENSSIN ID NO:20

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 12 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:20

Asp Ala Ile Val Val Asn Pro Met Asp Ser Val Ala
5 10

(22) SEKVENSSIN ID NO:21

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 5 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:21

Met Ile Ser Ile Leu
5

(23) SEKVENSSIN ID NO:22

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 6 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:22

Arg Arg Pro Gln Trp Lys
5

(24) SEKVENSSIN ID NO:23

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 5 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:23

Ser Xaa Pro Gln Lys
5

(25) SEKVENSSIN ID NO:24

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 15 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:24

Phe Tyr Arg Asn Leu Asn Gln Arg Phe Ala Asp Ala Ile Val Lys
5 10 15

(26) SEKVENSSIN ID NO:25

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 11 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:25

Asp Gly Ser Val Met Gln Xaa Xaa Gln Leu Xaa
5 10

(27) SEKVENSSIN ID NO:26

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 18 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:26

Asn Ala Ile Asn Thr Ala Val Leu Glu Asn Ile Ile Pro Xaa Xaa
5 10 15
Xaa Val Lys

(28) SEKVENSSIN ID NO:27

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 12 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:27

Leu Val Asn Asp Glu Ala Ser Glu Gly Gln Val Lys
5 10

(29) SEKVENSSIN ID NO:28

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 11 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:28

Xaa Gln Asp Ile Leu Asn Asn Thr Phe Xaa
5 10

(30) SEKVENSSIN ID NO:29

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 14 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:29

Asp Thr Thr Gln Thr Ala Pro Val Xaa Asn Asn Val Xaa Pro
5 10

(31) SEKVENSSIN ID NO:30

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 11 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:30

Asn Gln Leu Asp Ala Xaa Asn Tyr Ala Glu Val
5 10

(32) SEKVENSSIN ID NO:31

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 10 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Yes

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:31

Asn Leu Ser Arg Trp Arg Asn Tyr Ala Glu
5 10

(33) SEKVENSSIN ID NO:32

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 4 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Yes

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminal

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:32

Trp Gln Gly Lys

(34) SEKVENSSIN ID NO:33

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 11 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:33

Ile Gln Leu Gly Glu Ser Asn Asp Asp Xaa Xaa
5 10

(35) SEKVENSSIN ID NO:34

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 11 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:34

Gln Val Pro Thr Ile Gln Asp Xaa Thr Asn Lys
5 10

(36) SEKVENSSIN ID NO:35

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 6 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:35

Ile Tyr Xaa Tyr Val Lys
5

(37) SEKVENSSIN ID NO:36

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 6 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:36

Asn Gln Leu Gly Asn Tyr
5

(38) SEKVENSSIN ID NO:37

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 4 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:37

Val Ala Leu Thr

(39) SEKVENSSIN ID NO:38

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 12 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:38

Asp Ala Ile Val Val Asn Pro Xaa Asp Ser Val Ala
5 10

(40) SEKVENSSIN ID NO:39

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:39

Thr Phe Thr Asn Tyr Asp Gly Ser Lys
5

(41) SEKVENSSIN ID NO:40

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 10 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:40

Thr Gly Asn Asp Pro Ser His Ile Ala Lys
5 10

(42) SEKVENSSIN ID NO:41

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 7 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:41

Ile Tyr Glu Ser Gln Gly Lys
5

(43) SEKVENSSIN ID NO:42

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 12 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:42

Ala Glu Gly Ala Thr Gly Gly Leu Val Pro His Lys
5 10

(44) SEKVENSSIN ID NO:43

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 10 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:43

Leu Ala Thr Glu Leu Pro Ala Xaa Ser Lys
5 10

(45) SEKVENSSIN ID NO:44

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 8 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:44

Ser Leu Leu Asp Ala Gly Ala Lys
5

(46) SEKVENSSIN ID NO:45

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 14 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:45

Glu Lys Pro Gln Asp Leu Asp Asp Asp Pro Leu Tyr Leu Thr
5 10

(47) SEKVENSSIN ID NO:46

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 11 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:46

Xaa Gln Xaa His Gln Asp Xaa Xaa Asn Leu Thr
5 10

(48) SEKVENSSIN ID NO:47

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 15 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:47

Phe Asn Asp Glu Ser Ile Ile Ile Gly Tyr Phe Xaa Xaa Ala Pro
5 10 15

(49) SEKVENSSIN ID NO:48

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 14 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:48

Ser Arg Leu Phe Leu Phe Asp Tyr Asp Gly Thr Leu Thr Pro
5 10

(50) SEKVENSSIN ID NO:49

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 11 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:49

Gln Leu Gly Asn Tyr Gly Phe Tyr Pro Val Tyr
5 10

(51) SEKVENSSIN ID NO:50

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 11 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:50

Phe Leu Val Glu Asn Pro Glu Tyr Val Glu Lys
5 10

(52) SEKVENSSIN ID NO:51

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 11 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:51

Xaa Ile Thr Pro His Leu Thr Ala Xaa Ala Ala
5 10

(53) SEKVENSSIN ID NO:52

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 10 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:52

Thr Leu Met Glu Asp Tyr Gln Ser Ser Lys
5 10

(54) SEKVENSSIN ID NO:53

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 15 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:53

Ile Leu Glu Gly Leu Thr Gly Ala Asp Phe Val Gly Phe Gln Thr
5 10 15

(55) SEKVENSSIN ID NO:54

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 14 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:54

Gln Ile Leu Xaa Pro Thr Leu Xaa Tyr Gln Ile Pro Asp Asn
5 10

(56) SEKVENSSIN ID NO:55

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 7 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:55

Phe Gly Gly Tyr Ser Asn Lys
5

(57) SEKVENSSIN ID NO:56

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 23 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:56

Phe Xaa Thr Glu Asn Ala Glu Asp Gln Asp Xaa Val Ala Xaa Val
5 10 15
Ile Gly Xaa Ala Ile Xaa Xaa Ile
20

(58) SEKVENSSIN ID NO:57

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 18 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:57

Xaa Val Gly Thr Val Gly Ile Pro Thr Asp Glu Ile Pro Glu Asn
5 10 15
Ile Leu Ala

(59) SEKVENSSIN ID NO:58

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 19 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidis

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:58

Leu Leu Val His Ser Leu Leu Asn Asn Thr Ser Gln Thr Ser Leu
5 10 15
Glu Gly Pro Asn

(60) SEKVENSSIN ID NO:59

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 20 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:59

Ser Ser Thr Thr Asn Thr Ala Thr Leu Xaa Xaa Leu Val Ser Ser
5 10 15
Xaa Ile Phe Met Glu
20

(61) SEKVENSSIN ID NO:60

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 15 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:60

Ala Xaa Asn Arg Pro Thr Ser Ala Ala Thr Ser Leu Val Asn Arg
5 10 15

(62) SEKVENSSIN ID NO:61

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 6 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:61

Xaa Phe Thr Ile Ile Xaa
5

(63) SEKVENSSIN ID NO:62

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 15 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:62

Asn Leu Thr Ala Asn Ala Thr Thr Ser His Thr Pro Thr Ser Lys
5 10 15

(64) SEKVENSSIN ID NO:63

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 7 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:63

Phe Xaa Xaa Tyr Ser Asn Lys
5

(65) SEKVENSSIN ID NO:64

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 7 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:64

Xaa Pro Xaa Ala Phe Asn Xaa
5

(66) SEKVENSSIN ID NO:65

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 8 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:65

Ile Ala Ser Pro Ile Gln Xaa Glu
5

(67) SEKVENSSIN ID NO:66

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 7 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:66

Gln Arg Pro Leu Leu Ala Lys
5

(68) SEKVENSSIN ID NO:67

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 12 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:67

Phe Phe Ser Pro Ser Ser Asn Ile Pro Thr Asp Arg
5 10

(69) SEKVENSSIN ID NO:68

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:68

Ala Leu Ser Asn Asn Ile Ser Gln Glu
5

(70) SEKVENSSIN ID NO:69

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 6 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:69

Xaa Xaa Xaa Tyr Thr Pro
5

(71) SEKVENSSIN ID NO:70

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 16 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:70

Ile Ala Ser Pro Ile Gln Gln Gln Gln Gln Asp Pro Thr Ala Asn
5 10 15
Leu

(72) SEKVENSSIN ID NO:71

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 6 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:71

Thr Met Leu Lys Pro Arg
5

(73) SEKVENSSIN ID NO:72

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 6 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:72

Ile Ile Glu Asp Glu Ala
5

(74) SEKVENSSIN ID NO:73

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 11 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:73

Ile Thr Pro His Leu Thr Ala Ser Ala Ala Lys
5 10

(75) SEKVENSSIN ID NO:74

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 8 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:74

Ser Leu Val Ala Pro Ala Pro Glu
5

(76) SEKVENSSIN ID NO:75

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 12 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:75

Lys Pro Gln Asp Leu Asp Asp Asp Pro Leu Tyr Leu
5 10

(77) SEKVENSSIN ID NO:76

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 6
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:76

Lys Tyr Ala Leu Leu Arg
5

(78) SEKVENSSIN ID NO:77

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 11 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:77

Gln Leu Gly Asn Tyr Xaa Phe Tyr Pro Val Tyr
5 10

(79) SEKVENSSIN ID NO:78

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 8 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:78

Ala Phe Glu Asp His Ser Trp Lys
5

(80) SEKVENSSIN ID NO:79

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 16 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:79

Ala Gly His Ala Ile Val Tyr Gly Asp Ala Thr Ser Thr Tyr Ala
5 10 15
Lys

(81) SEKVENSSIN ID NO:80

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:80

Glu Arg Leu Pro Gly Ser Tyr Tyr Lys
5

(82) SEKVENSSIN ID NO:81

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 7 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:81

Thr Leu Met Glu Asp Tyr Gln
5

(83) SEKVENSSIN ID NO:82

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 1098 aminohappoa
(B) TYYPPI: Aminohappo
(C) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Polypeptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: Kyllä

(v) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:82

Met Ala Leu Ile Val Ala Ser Leu Phe Leu Pro Tyr Gln Pro Gln
5 10 15
Phe Glu Leu Asp Thr Ser Leu Pro Glu Asn Ser Gln Val Asp Ser
20 25 30
Ser Leu Val Asn Ile Gln Ala Met Ala Asn Asp Gln Gln Gln Gln
35 40 45
Arg Ala Leu Ser Asn Asn Ile Ser Gln Glu Ser Leu Val Ala Pro
50 55 60
Ala Pro Glu Gln Gly Val Pro Pro Ala Ile Ser Arg Ser Ala Thr
65 70 75
Arg Ser Pro Ser Ala Phe Asn Arg Ala Ser Ser Thr Thr Asn Thr
80 85 90

Ala Thr Leu Asp Asp Leu Val Ser Ser Asp Ile Phe Met Glu Asn
95 100 105
Leu Thr Ala Asn Ala Thr Thr Ser His Thr Pro Thr Ser Lys Thr
110 115 120
Met Leu Lys Pro Arg Lys Asn Gly Ser Val Glu Arg Phe Phe Ser
125 130 135
Pro Ser Ser Asn Ile Pro Thr Asp Arg Ile Ala Ser Pro Ile Gln
140 145 150
His Glu His Asp Ser Gly Ser Arg Ile Ala Ser Pro Ile Gln Gln
155 160 165
Gln Gln Gln Asp Pro Thr Thr Asn Leu Leu Lys Asn Val Asn Lys
170 175 180
Ser Leu Leu Val His Ser Leu Leu Asn Asn Thr Ser Gln Thr Ser
185 190 195
Leu Glu Gly Pro Asn Asn His Ile Val Thr Pro Lys Ser Arg Ala
200 205 210
Gly Asn Arg Pro Thr Ser Ala Ala Thr Ser Leu Val Asn Arg Thr
215 220 225
Lys Gln Gly Ser Ala Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ser Ala Pro
230 235 240
Pro Ser Ile Lys Arg Ile Thr Pro His Leu Thr Ala Ser Ala Ala
245 250 255
Lys Gln Arg Pro Leu Leu Ala Lys Gln Pro Ser Asn Leu Lys Tyr
260 265 270
Ser Glu Leu Ala Asp Ile Ser Ser Ser Glu Thr Ser Ser Gln His
275 280 285
Asn Glu Ser Asp Pro Asp Asp Leu Thr Thr Ala Pro Asp Glu Glu
290 295 300
Tyr Val Ser Asp Leu Glu Met Asp Asp Ala Lys Gln Asp Tyr Lys
305 310 315
Val Pro Lys Phe Gly Gly Tyr Ser Asn Lys Ser Lys Leu Lys Lys
320 325 330
Tyr Ala Leu Leu Arg Ser Ser Gln Glu Leu Phe Ser Arg Leu Pro
335 340 345
Trp Ser Ile Val Pro Ser Ile Lys Gly Asn Gly Ala Met Lys Asn
350 355 360
Ala Ile Asn Thr Ala Val Leu Glu Asn Ile Ile Pro His Arg His
365 370 375
Val Lys Trp Val Gly Thr Val Gly Ile Pro Thr Asp Glu Ile Pro
380 385 390
Glu Asn Ile Leu Ala Asn Ile Ser Asp Ser Leu Lys Asp Lys Tyr
395 400 405
Asp Ser Tyr Pro Val Leu Thr Asp Asp Asp Thr Phe Lys Ala Ala
410 415 420
Tyr Lys Asn Tyr Cys Lys Gln Ile Leu Trp Pro Thr Leu His Tyr
425 430 435
Gln Ile Pro Asp Asn Pro Asn Ser Lys Ala Phe Glu Asp His Ser
440 445 450
Trp Lys Phe Tyr Arg Asn Leu Asn Gln Arg Phe Ala Asp Ala Ile
455 460 465
Val Lys Ile Tyr Lys Lys Gly Asp Thr Ile Trp Ile His Asp Tyr
470 475 480
His Leu Met Leu Val Pro Gln Met Val Arg Asp Val Leu Pro Phe
485 490 495
Ala Lys Ile Gly Phe Thr Leu His Val Ser Phe Pro Ser Ser Glu
500 505 510

Val Phe Arg Cys Leu Ala Gln Arg Glu Lys Ile Leu Glu Gly Leu
515 520 525
Thr Gly Ala Asp Phe Val Gly Phe Gln Thr Arg Glu Tyr Ala Arg
530 535 540
His Phe Leu Gln Thr Ser Asn Arg Leu Leu Met Ala Asp Val Val
545 550 555
His Asp Glu Glu Leu Lys Tyr Asn Gly Arg Val Val Ser Val Arg
560 565 570
Phe Thr Pro Val Gly Ile Asp Ala Phe Asp Leu Gln Ser Gln Leu
575 580 585
Lys Asp Gly Ser Val Met Gln Trp Arg Gln Leu Ile Arg Glu Arg
590 595 600
Trp Gln Gly Lys Lys Leu Ile Val Cys Arg Asp Gln Phe Asp Arg
605 610 615
Ile Arg Gly Ile His Lys Lys Leu Leu Ala Tyr Glu Lys Phe Leu
620 625 630
Val Glu Asn Pro Glu Tyr Val Glu Lys Ser Thr Leu Ile Gln Ile
635 640 645
Cys Ile Gly Ser Ser Lys Asp Val Glu Leu Glu Arg Gln Ile Met
650 655 660
Ile Val Val Asp Arg Ile Asn Ser Leu Ser Thr Asn Ile Ser Ile
665 670 675
Ser Gln Pro Val Val Phe Leu His Gln Asp Leu Asp Phe Ser Gln
680 685 690
Tyr Leu Ala Leu Ser Ser Glu Ala Asp Leu Phe Val Val Ser Ser
695 700 705
Leu Arg Glu Gly Met Asn Leu Thr Cys His Glu Phe Ile Val Cys
710 715 720
Ser Glu Asp Lys Asn Ala Pro Leu Leu Leu Ser Glu Phe Thr Gly
725 730 735
Ser Ala Ser Leu Leu Asn Asp Gly Ala Ile Ile Ile Asn Pro Trp
740 745 750
Asp Thr Lys Asn Phe Ser Gln Ala Ile Leu Lys Gly Leu Glu Met
755 760 765
Pro Phe Asp Lys Arg Arg Pro Gln Trp Lys Lys Leu Met Lys Asp
770 775 780
Ile Ile Asn Asn Asp Ser Thr Asn Trp Ile Lys Thr Ser Leu Gln
785 790 795
Asp Ile His Ile Ser Trp Gln Phe Asn Gln Glu Gly Ser Lys Ile
800 805 810
Phe Lys Leu Asn Thr Lys Thr Leu Met Glu Asp Tyr Gln Ser Ser
815 820 825
Lys Lys Arg Met Phe Val Phe Asn Ile Ala Glu Pro Pro Ser Ser
830 835 840
Arg Met Ile Ser Ile Leu Asn Asp Met Thr Ser Lys Gly Asn Ile
845 850 855
Val Tyr Ile Met Asn Ser Phe Pro Lys Pro Ile Leu Glu Asn Leu
860 865 870
Tyr Ser Arg Val Gln Asn Ile Gly Leu Ile Ala Glu Asn Gly Ala
875 880 885
Tyr Val Ser Leu Asn Gly Val Trp Tyr Asn Ile Val Asp Gln Val
890 895 900
Asp Trp Arg Asn Asp Val Ala Lys Ile Leu Glu Asp Lys Val Glu
905 910 915
Arg Leu Pro Gly Ser Tyr Tyr Lys Ile Asn Glu Ser Met Ile Lys
920 925 930

```
Phe His Thr Glu Asn Ala Glu Asp Gln Asp Arg Val Ala Ser Val
                935                 940                 945
Ile Gly Asp Ala Ile Thr His Ile Asn Thr Val Phe Asp His Arg
            950                 955                 960
Gly Ile His Ala Tyr Val Tyr Lys Asn Val Val Ser Val Gln Gln
            965                 970                 975
Val Gly Leu Ser Leu Ser Ala Ala Gln Phe Leu Phe Arg Phe Tyr
            980                 985                 990
Asn Ser Ala Ser Asp Pro Leu Asp Thr Ser Ser Gly Gln Ile Thr
        995                 1000                1005
Asn Ile Gln Thr Pro Ser Gln Gln Asn Pro Ser Asp Gln Glu Gln
        1010                1015                1020
Gln Pro Pro Ala Ser Pro Thr Val Ser Met Asn His Ile Asp Phe
        1025                1030                1035
Ala Cys Val Ser Gly Ser Ser Ser Pro Val Leu Glu Pro Leu Phe
        1040                1045                1050
Lys Leu Val Asn Asp Glu Ala Ser Glu Gly Gln Val Lys Ala Gly
        1055                1060                1065
His Ala Ile Val Tyr Gly Asp Ala Thr Ser Thr Tyr Ala Lys Glu
        1070                1075                1080
His Val Asn Gly Leu Asn Glu Leu Phe Thr Ile Ile Ser Arg Ile
        1085                1090                1095
Ile Glu Asp
    1098
```

(84) SEKVENSSIN ID NO:83

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET
- (A) PITUUS: 5981 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleotidi
- (C) JUOSTEISUUS: Kaksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Genomi-DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(vi) ALKUPERÄ:
- (A) ORGANISMI: Saccharomyces cerevisiae
- (B) KANTA: S288C
- (C) HAPLOTYYPPI: Haploidi

(vii) VÄLITÖN LÄHDE:
- (A) KIRJASTO: Genomi
- (B) KLOONIT: 6 ja 10

(viii) ASEMA PERIMÄSSÄ
- (A) KROMOSOMI: 13

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:83

GGCTCACATT CCAAAAAGAA CAGTTCGAAC GATAAAGCTT TTCACCGCTG 50
GTGGTGATAA CAAGGTTAGG ATATGGAAGT TGAACAGAGA TGAAAACGGA 100
CAAAATGGGG GGGTGCGTAA GATTGAAAGC CTTGACTTTC TTGGCTCGTG 150
ACGCATCACG AACAGGCCAT AAATGTAATC CGATTCAACT CGAAGGGTGA 200
CGTACTGGCG TCTGCGGGCG ATGACGGCCA AGTGCTGCTA TGGAAGCAAG 250
AAGAACCAAA TACACAGCAA GAATCTGTGG TCAGACCATT CGGAATGGAT 300
GCGGAGACTA GTGAAGCAGA CGAGAACAAG GAGAAATGGG TTGTGTGGAA 350
ACGGCTGCGT GGTGGTAGCG GTGCTACTGC GGCGGCAGAG ATTTACGATC 400
TAGCGTGGTC ACCTGATAAC AGGAACATAG TGGTGGCATG TATGGACAAT 450
TCGATACGAC TGTTCGATGT TGGAGCTGGG ATGCTGGTAT GCGGCCAGTC 500
GGATCATGGT CACTACGTCC AAGGTCTTGC ATGGGACCCA TTAAATCAGT 550
TTATTCTCTC ACAGTCTGCG GACCGGTCTC TGCATGTATA TGGAGTCATT 600
CTTTCATCTG CAGGAGTTAG TTACAGGGCT TGAAACTTTA GAAGTAAGGT 650
TGCCAAGGCA GAACTGCCTT GTCCAGGTGA TGTCCTGAGG ACAAATTACT 700
TTTTCACAAC GAGACGCTAC CTTCATTCTT TAGGCGATGC AGCATATCGC 750
CTTGTGGTGG TTTGGTCGTA ATTCCCAGTG GTGTGTATAA GGTGGCTGGT 800
GATGAAGTCG CGAACTGCGT ATACGTGTAT ACTAGATCTG GAATACTGAA 850
CAGCGCTGGT GGCGTTAAAA ACCGGCCTGC GATTAGAATC CCATCTTTGA 900
AGAAACCAGC GCTGATGGCG GCTTTCTCGC CCGTATTTTA CGAAACGTGC 950
CAGAAGAGTG TGCTTAAGCT GCCCTATAAG CTAGTATTTG CCATAGCAAC 1000
GACTAACGAA GTACTCGTGT ACGACACGGA TGTATTGGAG CCGTTATGCG 1050
TTGTGGGAAA TATACATTAC TCACCCATAA CTGATTTAGC ATGGTCTGAG 1100
GATGGCTCGA CCCTACTAAT CTCATCAACA GACGGATTCT GTTCGTATGT 1150
ATCGATCGAC ACAGAAACGC AATTCGGTTC AAGGATAGAG CCGCCAGCGA 1200
TGCATGCAGA GCCACTAGAC ACTGACGAGA GCGCGGTAGC GGCTAAGAAC 1250
CAGCGCGAGG CAGGTGGGAT CGTGAACATG CTGCCGGTGA AGAAGATCCC 1300
CTGCAATAGT AGCGATAGTA AAAAGAGGCG CATACATCCT ACGCCAGTCG 1350
ATTTGTGATT TTTAATATAT TTAATGCGGT ACATAAGAAT GCCTAATCTA 1400
GTTTGCCAGC GAAGATATTT TCCATTGTGT GCTCAATGGA CCCTGTGTTC 1450
CTGAGATCTT GCACGACTTT TTCCTGAGGC ACATGTGGCG CCATCGTCAT 1500
CACGATTTCA ACCATGTCAC TATTAACGGC TCTCTTTCGA TCACTACCAT 1550
GTCTGTTTAA CCGAGCAACG CGTTCCTCCG GAGCCGATGG TACTGGCTCC 1600
GGAGAAGGGT CGTTGGTGGC GACCGAGGGC GCCGGTTTGG CATCCTGTAC 1650
GGTCCGCAAG GGTACTTGCT TGGCGCCCCT GTGTTTCACG GTGTAAACAA 1700
ACAAGCACAC CATCGTCAGT ATAAAGCACT ATAGTCGAAC CATCCATTTT 1750
TACTTTTGTG CGCGTGGGTA GCCGTGCCTC GTCTGTGTGT GTGGGAATGT 1800
ATAAATGTGT CCCGAGTTAT TATTCTAAAG CGGGCACCAT TGTAGTAACT 1850
TATTGCGAAA TTTCTGCTCT TCTCGTCTCG CTCAAAAATC GCGTTCAGGG 1900
TAAAAGGGGC GAAACAGAGG GCCAGATAGA AATTTCGAGA AAACGGGTCA 1950
CCCCGCCCCT GCATTTTGAT ATGGCGTATT TGGGATTGCT TGCTCGAAAG 2000
TGTCTAAGTC CGGCTGGCGG GCCTGGCGCC CTCGCCGAAG GGAGATAGGA 2050
AGGGGCGGGG GTCCGGGCAG CGGCTATGGT GTCAGTTACC TAGGGAAGGA 2100
GAAGGGGGTA GAACCAAGGG GCTAGCACAC TCACCCTGGG GCCCCCGTCT 2150
AGCCAAGCTT AAATATAAAT ACTAATGTAA CTATAAATAT AAGGATCTAC 2200
CGTGTCATTG CACATCCACC CACCCGTCGA TTAAAAAACC AAACAAAGCA 2250
AAGAATACAA TAGCAACGCA AGATCAACAC AATGGCTCTC ATCGTGGCAT 2300
CTTTGTTTTT GCCCTACCAA CCACAATTCG AGCTTGACAC CTCTCTCCCT 2350
GAGAACTCGC AGGTGGACTC ATCTCTCGTG AACATCCAGG CTATGGCCAA 2400
TGACCAACAG CAACAACGTG CGCTTTCTAA CAACATCTCA CAGGAATCAT 2450
TGGTCGCGCC AGCACCAGAA CAAGGTGTCC CCCCAGCAAT CTCAAGGAGT 2500
GCCACCAGGT CACCCAGTGC TTTCAACCGC GCCTCGTCTA CGACAAATAC 2550
TGCCACTTTA GATGATCTTG TCTCTTCGGA CATATTCATG GAAAACTTGA 2600
CTGCGAATGC AACTACCTCA CATACGCCAA CAAGCAAGAC TATGCTTAAA 2650
CCCCGGAAAA ATGGTTCCGT GGAACGATTC TTCTCCCCTT CTTCCAATAT 2700
TCCCACGGAT CGCATCGCAT CGCCAATCCA GCATGAGCAT GACTCCGGTT 2750
CGAGAATTGC TTCGCCAATC CAACAGCAAC AGCAGGACCC CACGACCAAC 2800

TTATTAAAGA ACGTCAACAA GTCATTGTTA GTGCACTCAC TGTTGAACAA 2850
CACCTCACAA ACTAGCCTAG AAGGACCCAA CAACCACATT GTTACCCCGA 2900
AATCGAGGGC GGGCAACAGG CCTACTTCGG CGGCTACTTC TTTAGTTAAT 2950
AGGACCAAAC AAGGTTCGGC CTCCTCTGGA TCTTCTGGGT CTTCTGCGCC 3000
ACCTTCCATT AAAAGGATTA CGCCCCACTT GACTGCGTCT GCTGCAAAAC 3050
AGCGTCCCTT ATTGGCTAAA CAGCCTTCTA ATCTGAAATA TTCGGAGTTA 3100
GCAGATATTT CGTCGAGTGA GACGTCTTCG CAGCATAATG AGTCGGACCC 3150
GGATGATCTA ACTACTGCCC CTGACGAGGA ATATGTTTCT GATTTGGAAA 3200
TGGATGACGC GAAGCAGGAC TACAAGGTTC CAAAGTTCGG CGGCTATTCC 3250
AATAAATCTA AACTTAAGAA ATATGCGCTG TTAAGGTCAT CTCAGGAGCT 3300
GTTTAGCCGT CTTCCATGGT CGATCGTTCC CTCTATCAAA GGTAATGGCG 3350
CCATGAAGAA CGCCATAAAC ACTGCAGTCT TGGAGAATAT CATTCCGCAC 3400
CGTCATGTTA AGTGGGTCGG TACCGTCGGA ATCCCAACGG ATGAGATTCC 3450
GGAAAATATC CTTGCGAACA TCTCTGACTC TTTAAAAGAC AAGTACGACT 3500
CCTATCCTGT CCTTACGGAC GACGACACCT TCAAAGCCGC ATACAAAAAC 3550
TACTGTAAAC AAATCTTGTG GCCTACGCTG CATTACCAGA TTCCAGACAA 3600
TCCGAACTCG AAGGCTTTTG AAGATCACTC TTGGAAGTTC TATAGAAACT 3650
TAAACCAAAG GTTTGCGGAC GCGATCGTTA AAATCTATAA GAAAGGTGAC 3700
ACCATCTGGA TTCATGATTA CCATTTAATG CTGGTTCCGC AGATGGTGAG 3750
AGACGTCTTG CCTTTTGCCA AAATAGGATT TACCTTACAT GTCTCGTTCC 3800
CCAGTAGTGA AGTGTTTAGG TGTCTGGCTC AGCGTGAGAA GATCTTAGAA 3850
GGCTTGACCG GTGCAGACTT TGTCGGCTTC CAGACGAGGG AGTATGCAAG 3900
ACATTTCTTA CAGACGTCTA ACCGTCTGCT AATGGCGGAC GTGGTACATG 3950
ATGAAGAGCT AAAGTATAAC GGCAGAGTCG TTTCTGTGAG GTTCACCCCA 4000
GTTGGTATCG ACGCCTTTGA TTTGCAATCG CAATTGAAGG ATGGAAGTGT 4050
CATGCAATGG CGTCAATTGA TTCGTGAAAG ATGGCAAGGG AAAAAACTAA 4100
TTGTGTGTCG TGATCAATTC GATAGAATTA GAGGTATTCA CAAGAAATTG 4150
TTGGCTTATG AAAAATTCTT GGTCGAAAAT CCGGAATACG TGGAAAAATC 4200
GACTTTAATT CAAATCTGTA TTGGAAGCAG TAAGGATGTA GAACTGGAGC 4250
GCCAGATCAT GATTGTCGTG GATAGAATCA ACTCGCTATC CACCAATATT 4300
AGTATTTCTC AACCTGTGGT GTTTTTGCAT CAAGATCTAG ATTTTTCTCA 4350
GTATTTAGCT TTGAGTTCAG AGGCAGATTT GTTCGTAGTC AGCTCTCTAA 4400
GGGAAGGTAT GAACTTGACA TGTCACGAAT TTATCGTTTG TTCTGAGGAC 4450
AAAAATGCTC CCCTACTGTT GTCAGAATTT ACTGGTAGTG CATCTTTATT 4500
GAATGATGGC GCTATAATAA TTAACCCATG GGATACCAAG AACTTCTCAC 4550
AAGCCATTCT CAAGGGGTTG GAGATGCCAT TCGATAAGAG AAGGCCACAG 4600
TGGAAGAAAT TGATGAAAGA CATTATCAAC AACGACTCTA CAAACTGGAT 4650
CAAGACTTCT TTACAAGATA TTCATATTTC GTGGCAATTC AATCAAGAAG 4700
GTTCCAAGAT CTTCAAATTG AATACAAAAA CACTGATGGA AGATTACCAG 4750
TCATCTAAAA AGCGTATGTT TGTTTTCAAC ATTGCTGAAC CACCTTCATC 4800
GAGAATGATT TCCATACTGA ATGACATGAC TTCTAAGGGC AATATCGTTT 4850
ACATCATGAA CTCATTTCCA AAGCCCATTC TGGAAAATCT TTACAGTCGT 4900
GTGCAAAACA TTGGGTTGAT TGCCGAGAAT GGTGCATACG TTAGTCTGAA 4950
CGGTGTATGG TACAACATTG TTGATCAAGT CGATTGGCGT AACGATGTAG 5000
CCAAAATTCT CGAGGACAAA GTGGAGAGAT TACCTGGCTC GTACTACAAG 5050
ATAAATGAGT CCATGATCAA GTTCCACACT GAAAATGCGG AAGATCAAGA 5100
TCGTGTAGCT AGTGTTATCG GTGATGCCAT CACACATATC AATACTGTTT 5150
TTGACCACAG AGGTATTCAT GCCTACGTTT ACAAAAACGT TGTTTCCGTA 5200
CAACAAGTGG GACTTTCCTT ATCGGCAGCT CAATTTCTTT TCAGATTCTA 5250
TAATTCTGCT TCGGATCCAC TGGATACGAG TTCCGGCCAA ATCACAAATA 5300
TTCAGACACC ATCTCAACAA AATCCTTCAG ATCAAGAACA ACAACCTCCA 5350
GCCTCTCCCA CTGTGTCGAT GAACCATATT GATTTCGCAT GTGTCTCTGG 5400
TTCATCGTCT CCTGTGCTTG AACCATTGTT CAAATTGGTC AATGATGAAG 5450
CAAGTGAAGG GCAAGTAAAA GCCGGACACG CCATTGTTTA TGGTGATGCT 5500
ACTTCTACTT ATGCCAAAGA ACATGTAAAT GGGTTAAACG AACTTTTCAC 5550
GATCATTTCA AGAATCATTG AAGATTAAAT TTTACCATTT TAAAATTTTA 5600

ATGTTCTTGG GTATGAACTT TTATTTTCAA CTGCTTATTA TATATCAATT 5650
CTATAAATTT TTTTCTTCTC TCTAACGACC AATTATAAAA TTCATCCTCT 5700
TATTTATTAC AGCATCTTAT ACATTATGTA TATGGGTAGC TATTATTCAT 5750
TTTTGCTTCG TAAGGACTTT TTTTGTCAAC TTTTTCATCC TAAGCGGCTA 5800
AAAGTGATTG GAGAGGAATG TCCAGGCGAC CAATGATAAA AACGCTTTCT 5850
CTTGGAACAA GAAATAGGAG CAATTGACAG TTGTCGATGA ACAGCGAAAA 5900
TAGTAAGATA ACCTTCAAGC CCAATATTCT AATTAAAGGC GTTTATATAT 5950
TTGTACTTTA TGGTATGTGC ATATGTATTG T 5981

(85) SEKVENSSIN ID NO:84

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET
(A) PITUUS:50 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleotidi
(C) JUOSTEISUUS: Kaksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Synteettinen DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:84

CGGGAAGACA TAGAACTATG ACTACGGATA ACGCTAAGGC GCAACTGACC 50

(86) SEKVENSSIN ID NO:85

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET
(A) PITUUS: 48 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleotidi
(C) JUOSTEISUUS: Kaksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: Lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Synteettinen DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(iv) ANTI-SENSE: Ei

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:85

GGGCCCAACA ACACAATGGT TACCCCGAAA TCGAGGGCGG GCAACAGG 48

Patenttivaatimukset:

1. Eristetyt ja puhdistetut DNA-sekvenssit, jotka koodaavat trehaloosisyntaasin polypeptidiketjuja sekä näiden ketjujen funktionaalisesti ekvivalenttisia mutantteja, t u n n e t u t siitä, että sanotut ketjut käsittävät lyhyen ketjun, jonka molekyylipaino on noin 57 kDa ja jolla on trehaloosi-6-fosfaattisyntaasi-aktiivisuutta, pitkän ketjun, jonka molekyylipaino on noin 99 kDa ja jolla on trehaloosi-6-fosfataasi-aktiivisuutta, ja pitkän ketjun, jonka molekyylipaino on noin 123 kDa ja joka sisältää alueen, jolla on trehaloosisyntaasin trehaloosi-6-fosfaattisyntaasi-aktiivisuutta sääteleviä ominaisuuksia.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen eristetty ja puhdistettu DNA-sekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se koodaa lyhyttä ketjua, jonka molekyylipaino on noin 57 kDa ja jolla on sekvenssin SEQ ID NO:2 aminohapposekvenssi, tai tämän funktionaalisesti ekvivalenttisiä mutantteja.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen eristetty ja puhdistettu DNA-sekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se koodaa pitkää ketjua, jonka molekyylipaino on noin 123 kDa ja jolla on sekvenssin SEQ ID NO:4 aminohapposekvenssi, tai tämän funktionaalisesti ekvivalenttisiä mutantteja.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen eristetty ja puhdistetty DNA-sekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se koodaa pitkää ketjua, jonka molekyylipaino on noin 123 kDa ja jolla on sekvenssin SEQ ID NO:82 aminohapposekvenssi, tai tämän funktionaalisesti ekvivalenttisiä mutantteja.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen eristetty ja puhdistettu DNA-sekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se koodaa pitkää ketjua, jonka molekyylipaino on noin 99 kDa ja jolla on sekvenssien SEQ ID NO:t 29 - 38 tai 44 - 49 mukaiset aminohapposekvenssit, tai tämän funktionaalisesti ekvivalenttisiä

mutantteja.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset eristetyt ja puhdistetut DNA-sekvenssit, t u n n e t u t siitä, että ne käsittävät geeneit TSS1, TSL1 tai TSL2 tai näiden funktionaaliset ekvivalenttiset mutantit.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen TSS1-geeni, t u n n e t t u siitä, että se käsittää sekvenssin SEQ ID NO: 1 avoimen lukukehyksen tai tämän funktionaalisesti ekvivalenttiset mutantit.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen TSL1-geeni, t u n n e t t u siitä, että se käsittää sekvenssin SEQ ID NO: 3 avoimen lukukehyksen tai tämän funktionaalisesti ekvivalenttiset mutantit.

9. Patenttivaatimuksen 6 mukainen TSL1-geeni, t u n n e t t u siitä, että se käsittää sekvenssin SEQ ID NO: 83 avoimen lukukehyksen tai tämän funktionaalisesti ekvivalenttiset mutantit.

10. Patenttivaatimuksen 6 mukainen TSL2-geeni, t u n n e t t u siitä, että se käsittää plasmidiin pALK756 (DSM7425) insertoidut DNA-sekvenssit tai näiden funktionaalisesti ekvivalenttiset mutantit.

11. Typistetty TSL1 geeni, joka koodaa trehaloosisyntaasin 123 kDa:n pitkän ketjun typistettyä muotoa, josta puuttuu jopa 600 aminohappoa toisesta päästä, edullisesti N-päästä.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen typistetty TSL1 geeni, t u n n e t t u siitä, että pitkästä ketjusta puuttuu jopa 330 aminohappoa N-terminaalisesta päästä.

13. Vektori, t u n n e t t u siitä, että se sisältää ainakin yhden patenttivaatimuksien 1 - 12 mukaisen DNA-sekvenssin.

14. Isäntäsolut tai -organismit, t u n n e t t u siitä, että ne on transformoitu ainakin yhdellä patenttivaatimuksien 1 - 13 mukaisella DNA-sekvenssillä.

15. Isäntäsolut tai -organismit, t u n n e t t u siitä, että ne on transformoitu patenttivaatimuksien 11 tai 12 mukaisella typistetyllä TSL1-geenillä, siten että ne ilmentävät trehaloosisyntaasia, joka inhiboituu vähemmän fosfaatilla kuin intakti trehaloosisyntaasi.

16. Patenttivaatimuksen 14 tai 15 mukaiset transformoidut isäntäsolut tai -organismit, t u n n e t u t siitä, että ne on valittu ryhmästä, johon kuuluvat kasvit, sienet, hiivat ja bakteerit.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukaiset transformoidut isäntäsolut tai -organismit, t u n n e t u t siitä, että hiiva on Saccharomyces cerevisiae.

18. Jonkin patenttivaatimuksen 14 - 17 mukaiset transformoidut isäntäsolut tai -organismit, t u n n e t u t siitä, että organismin osilla on korkeampi trehaloosipitoisuus kuin samoissa olosuhteissa kasvatetun lähtösolujen tai -organismien vastaavilla osilla.

19. Jonkin patenttivaatimuksen 14 - 17 mukaiset transformoidut isäntäsolut tai -organismit, t u n n e t u t siitä, että solut tai organismit ovat kestävimpiä kuumuutta, kylmyyttä ja vedenpuutetta vastaan kuin lähtösolut tai -organismit.

20. Trehaloosisyntaasi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lyhyen ketjun, jonka molekyylipaino on noin 57 kDa, ja ainakin toisen kahdesta pitkästä ketjusta, joista toisen molekyylipaino on noin 99 kDa ja toisen 123 kDa, tai 123 kDa:n ketjun typistetyt muodot.

21. Trehaloosi-6-fosfaattisyntaasi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää polypeptidin, jonka molekyylipaino on noin 57 kDa, joka vastaa vaatimuksen 20 lyhyttä ketjua ja jolla on sekvenssin SEQ ID. NO: 2 mukainen aminohapposekvenssi, tai tämän funktionaalisesti ekvivalenttiset mutantit.

22. Trehaloosi-6-fosfaattifosfataasi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää polypeptidin, jonka molekyylipaino on noin 99 kDa ja joka käsittää sekvenssien SEQ ID NO:t 29 - 38 tai 44 - 49 mukaisen aminohapposekvenssin, tai tämän funktionaalisesti ekvivalenttiset mutantit.

23. Menetelmä etanolin tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että käytetään patenttivaatimuksien 14 - 17 mukaisia isäntäsoluja tai -organismeja, jolloin etanolin saanto tai sen tuotto on korkeampi kuin vastaavien transformattomien solujen tai organismien käytöllä.

24. Patenttivaatimuksen 23 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ainakin yksi patenttivaatimuksien 1 - 12 mukaisista DNA-sekvensseistä yhdistetään funktionaalisesti promoottoreihin, jotka ovat aktiivisia käymisolosuhteissa.

25. Menetelmä sellaisen viljakasvin tuottamiseksi, jolla on parannettu vastustuskyky veden puutetta, kuumuutta ja kylmyyttä vastaan, t u n n e t t u siitä, että kasvi transformoidaan tuomalla kasviin ainakin yksi patenttivaatimuksien 1 - 12 mukainen DNA-sekvenssi.

26. Menetelmä trehaloosin tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että kasvatetaan isäntäsolua tai -organismia, joka on transformoitu ainakin yhdellä patenttivaatimuksien 1 - 12 mukaisella DNA-sekvenssillä.

27. Menetelmä trehaloosilla rikastettujen elintarviketuotteiden tuottamiseksi kasveista, t u n n e t t u siitä, että niihin tuodaan ainakin yksi patenttivaatimuksien 1 - 12

mukainen DNA-sekvenssi, siten että trehaloosisyntaasia syntetisoidaan kasvin syötävissä osissa.

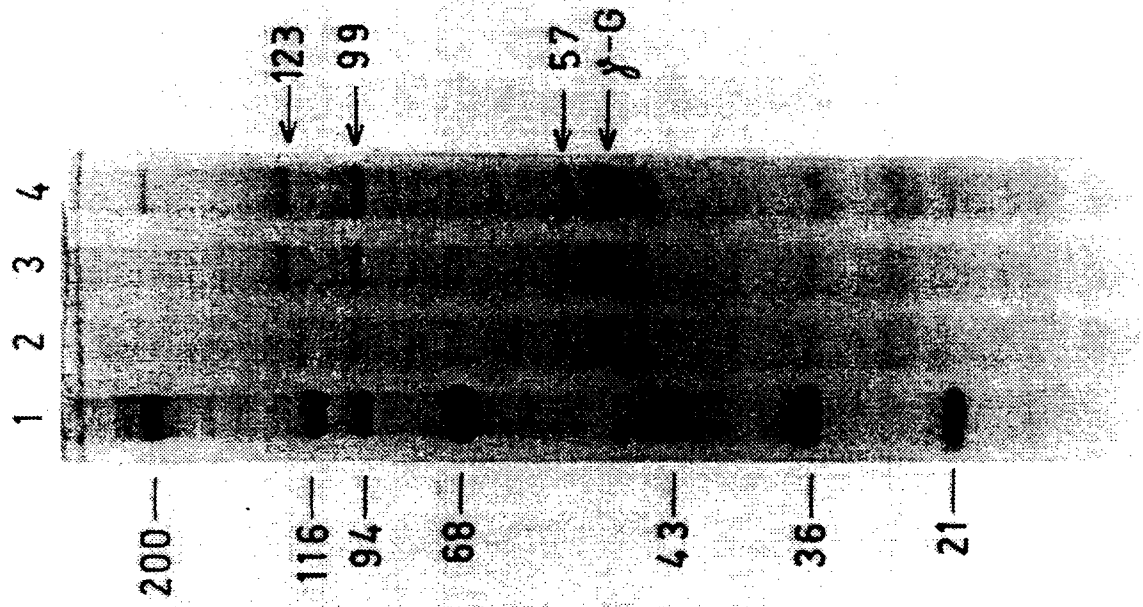

1 2 3 4
123
99
57
γ-G
200
116
94
68
43
36
21
17/12

FIG. 2

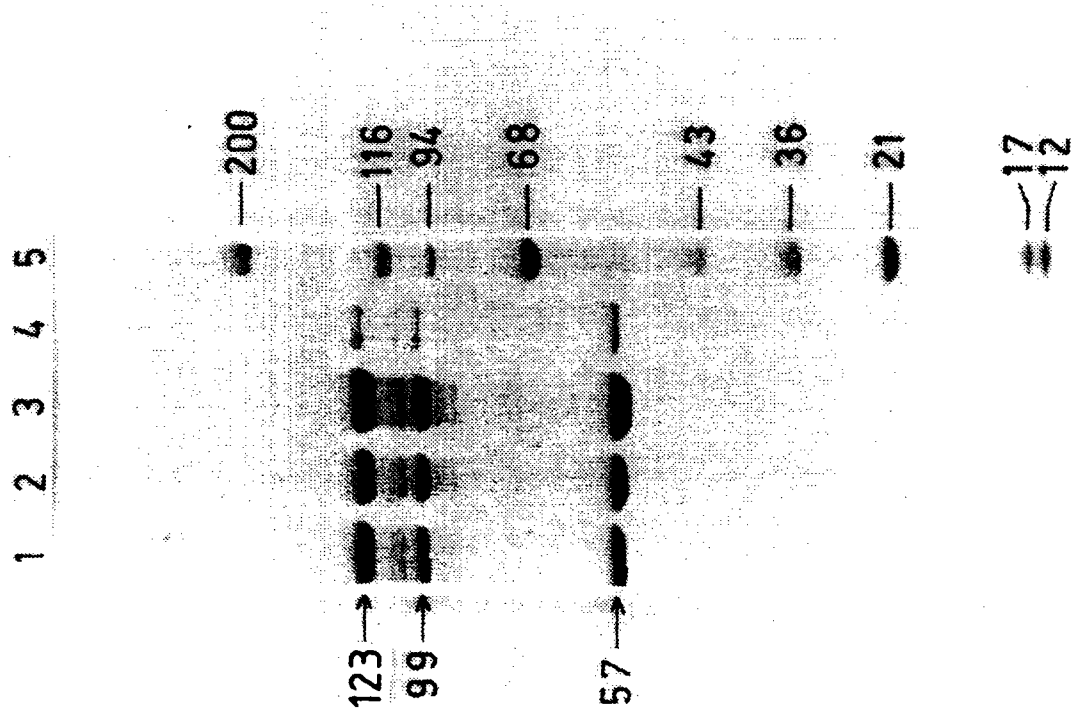

1 2 3 4 5
200
116
94
68
43
36
21
17
12
123
99
57

FIG. 1

Promoter

TTGTTGCGAT TGTTCTGTTC CATCTGCACC AGAACAAAGA ACAAAAGAAC -396

AAGGAACAAA GTCCAAGCAC GTCAGCGCTG TTTATAAGGG GATTGACGAG -346

GGATCGGGCC TAGAGTGCCA GCGCGCCAGG GAGAGGGAGC CCCCTGGGCC -296

CTCATCCGCA GGCTGATAGG GGTCACCCCG CTGGGCAGGT CAGGGCAGGG -246

GCTCTCAGGG GGGCGCCATG GACAAACTGC ACTGAGGTTC TAAGACACAT -196

GTATTATTGT GAGTATGTAT ATATAGAGAG AGATTAAGGC GTACAGCCGG -146

GTGGTAGAGA TTGATTAACT TGGTAGTCTT ATCTTGTCAA TTGAGTTTCT -96

GTCAGTTTCT TCTTGAACAA GCACGCAGCT AAGTAAGCAA CAAAGCAGGC -46

TAACAAACTA GGTACTCACA TACAGACTTA TTAAGACATA GAACT **ATG** +3

Terminator

ACC AAA AAC **TGA TGA** ACCCGATGCA AATGAGACGA TCGTCTATTC +1521

CTGGTCCGGT TTTCTCTGCC CTCTCTTCTA TTCACTTTTT TTATACTTTA +1571

TATAAAATTA TATAAATGAC ATAACTGAAA CGCCACACGT CCTCTCCTAT +1621

TCGTTAACGC CTGTCTGTAG CGCTGTTACT GAAGCTGCGC AAGTAGTTTT +1671

TTCACCGTAT AGGCC +1686

FIG. 3A

```
                    10                  20                  30
M T T D N A K A Q L T S S S G G N I I V V S N R L P V T I T

                    40                  50                  60
K N S S T G Q Y E Y A M S S G G L V T A L E G L K K T Y T F

                    70                  80                  90
K W F G W P G L E I P D D E K D Q V R K D L L E K F N A V P

                   100                 110                 120
I F L S D E I A D L H Y N G F S N S I L W P L F H Y H P G E

                   130                 140                 150
I N F D E N A W F G Y N E A N Q T F T N E I A K T M N H N D

                   160                 170                 180
L I W V H D Y H L M L V P E M L R V K I H E K Q L Q N V K V

                   190                 200                 210
G W F L H T P F P S S E I Y R I L P V R Q E I L K G V L S C

                   220                 230                 240
D L V G F H T Y D Y A R H F L S S V Q R V L N V N T L P N G

                   250                 260                 270
V E Y Q G R F V N V G A F P I G I D V D K F T D G L K K E S

                   280                 290                 300
V Q K R I Q Q L K E T F K G C K I I V G V D R L D Y I K G V

                   310                 320                 330
P Q K L H A M E V F L N E H P E W R G K V V L V Q V A V P S

                   340                 350                 360
R G D V E E Y Q Y L R S V V N E L V G R I N G Q F G T V E F

                   370                 380                 390
V P I H F M H K S I P F E E L I S L Y A V S D V C L V S S T

                   400                 410                 420
R D G M N L V S Y E Y I A C Q E E K K G S L I L S E F T G A

                   430                 440                 450
A Q S L N G A I I V N P W N T D D L S D A I N E A L T L P D

                   460                 470                 480
V K K E V N W E K L Y K Y I S K Y T S A F W G E N F V H E L

                   490       494
Y S T S S S S T S S S A T K N
```

FIG. 3B

Promoter

TGTAGTAACT TATTGCGAAA TTTCTGCTCT TCTCGTCTCG CTCAAAAATC -392

GCGTTCAGGG TAAAAGGGGC GAAACAGAGG GCCAGATAGA AATTTCGAGA -342

AAACGGGTCA CCCCGCCCCT GCATTTTGAT ATGGCGTATT TGGGATTGCT -292

TGCTCGAAAG TGTCTAAGTC CGGCTGGCGG GCCTGGCGCC CTCGCCGAAG -242

GGAGATAGGA AGGGGCGGGG GTCCGGGCAG CGGCTATGGT GTCAGTTACC -192

TAGGGAAGGA GAAGGGGGTA GAACCAAGGG GCTAGCACAC TCACCCTGGG -142

GCCCCCGTCT AGCCAAGCTT AAATATAAAT ACTAATGTAA CTATAAATAT -92

AAGGATCTAC CGTGTCATTG CACATCCACC CACCCGTCGA TTAAAAAACC -42

AAACAAAGCA AAGAATACAA TAGCAACGCA AGATCAACAC A **ATG** GCT +6

Terminator

TTC ACG ATC ATT TCA AGA ATC ATT GAA GAT **TAA** ATTTTACCAT +3307

TTTAAAATTT TAATGTTCTT GGGTATGAAC TTTTATTTTC AACTGCTTAT +3357

TATATATCAA TTCTATAAAT TTTTTTCTTC TCTCTAACGA CCAATTATAA +3407

AATTCATCCT CTTATTTATT ACAGCATCTT ATACATTATG TATATGGGTA +3457

GCTATTATTC ATTTTTGCTT CGTAAGGACT TTTTTTGTCA ACTTTTTCAT +3507

CCTAAGCGGC TAAAAGTGAT TGGAGAGGAA TGtccaggcg accaatgata +3557

aaaacgcttt ctcttggaac aagaaatagg agcaattgac agttgtcgat +3607

FIG. 4A

```
                    10                  20                  30
MALIVASLFLPYQPQFELDTSLPENSQVDS

                    40                  50                  60
SLVNIQAMANDQQQQRALSNNISQESLVAP

                    70                  80                  90
APEQGVPPAISRSATRSPSAFNRASSTTNT

                   100                 110                 120
ATLDDLVSSDIFMENLTANATTSHTPTSKT

                   130                 140                 150
MLKPRKNGSVERFFSPSSNIPTDRIASPIQ

                   160                 170                 180
HEHDSGSRIASPIQQQQQDPTTNLLKNVNK

                   190                 200                 210
SLLVHSLLNNTSQTSLEGPNNHIVTPKSRA

                   220                 230                 240
GNRPTSAATSLVNRTKQGSASSGSSSGSSAP

                   250                 260                 270
PSIKRITPHLTASAAKQRPLLAKQPSNLKY

                   280                 290                 300
SELADISSSETSSQHNESDPDDLTTAPDEE

                   310                 320                 330
YVSDLEMDDAKQDYKVPKFGGYSNKSKLKK

                   340                 350                 360
YALLRSSQELFSRLPWSIVPSIKGNGAMKN

                   370                 380                 390
AINTAVLENIIPHRHVKWVGTVGIPTDEIP

                   400                 410                 420
ENILANISDSLKDKYDSYPVLTDDDTFKAA

                   430                 440                 450
YKNYCKQILWPTLHYQIPDNPNSKAFEDHS

                   460                 470                 480
WKFYRNLNQRFADAIVKIYKKGDTIWIHDY

                   490                 500                 510
HLMLVPQMVRDVLPFAKIGFTLHVSFPSSE

                   520                 530                 540
VFRCLAQREKILEGLTGADFVGFQTREYAR
```

FIG. 4B

```
                    550                 560                 570
H F L Q T S N R L L M A D V V H D E E L K Y N G R V V S V R

                    580                 590                 600
F T P V G I D A F D L Q S Q L K D G S V M Q W R Q L I R E R

                    610                 620                 630
W Q G K K L I V C R D Q F D R I R G I H K K L L A Y E K F L

                    640                 650                 660
V E N P E Y V E K S T L I Q I C I G S S K D V E L E R Q I M

                    670                 680                 690
I V V D R I N S L S T N I S I S Q P V V F L H Q D L D F S Q

                    700                 710                 720
Y L A L S S E A D L F V V S S L R E G M N L T C H E F I V C

                    730                 740                 750
S E D K N A P L L L S E F T G S A S L L N D G A I I I N P W

                    760                 770                 780
D T K N F S Q A I L K G L E M P F D K R R P Q W K K L M K D

                    790                 800                 810
I I N N D S T N W I K T S L Q D I H I S W Q F N Q E G S K I

                    820                 830                 840
F K L N T K T L M E D Y Q S S K K R M F V F N I A E P P S S

                    850                 860                 870
R M I S I L N D M T S K G N I V Y I M N S F P K P I L E N L

                    880                 890                 900
Y S R V Q N I G L I A E N G A Y V S L N G V W Y N I V D Q V

                    910                 920                 930
D W R N D V A K I L E D K V E R L P G S Y Y K I N E S M I K

                    940                 950                 960
F H T E N A E D Q D R V A S V I G D A I T H I N T V F D H R

                    970                 980                 990
G I H A Y V Y K N V V S V Q Q V G L S L S A A Q F L F R F Y

                   1000                1010                1020
N S A S D P L D T S S G Q I T N I Q T P S Q Q N P S D Q E Q

                   1030                1040                1050
Q P P A S P T V S M N H I D F A C V S G S S S P V L E P L F

                   1060                1070                1080
K L V N D E A S E G Q V K A G H A I V Y G D A T S T Y A K E

                   1090        1098
H V N G L N E L F T I I S R I I E D
```

FIG. 4C

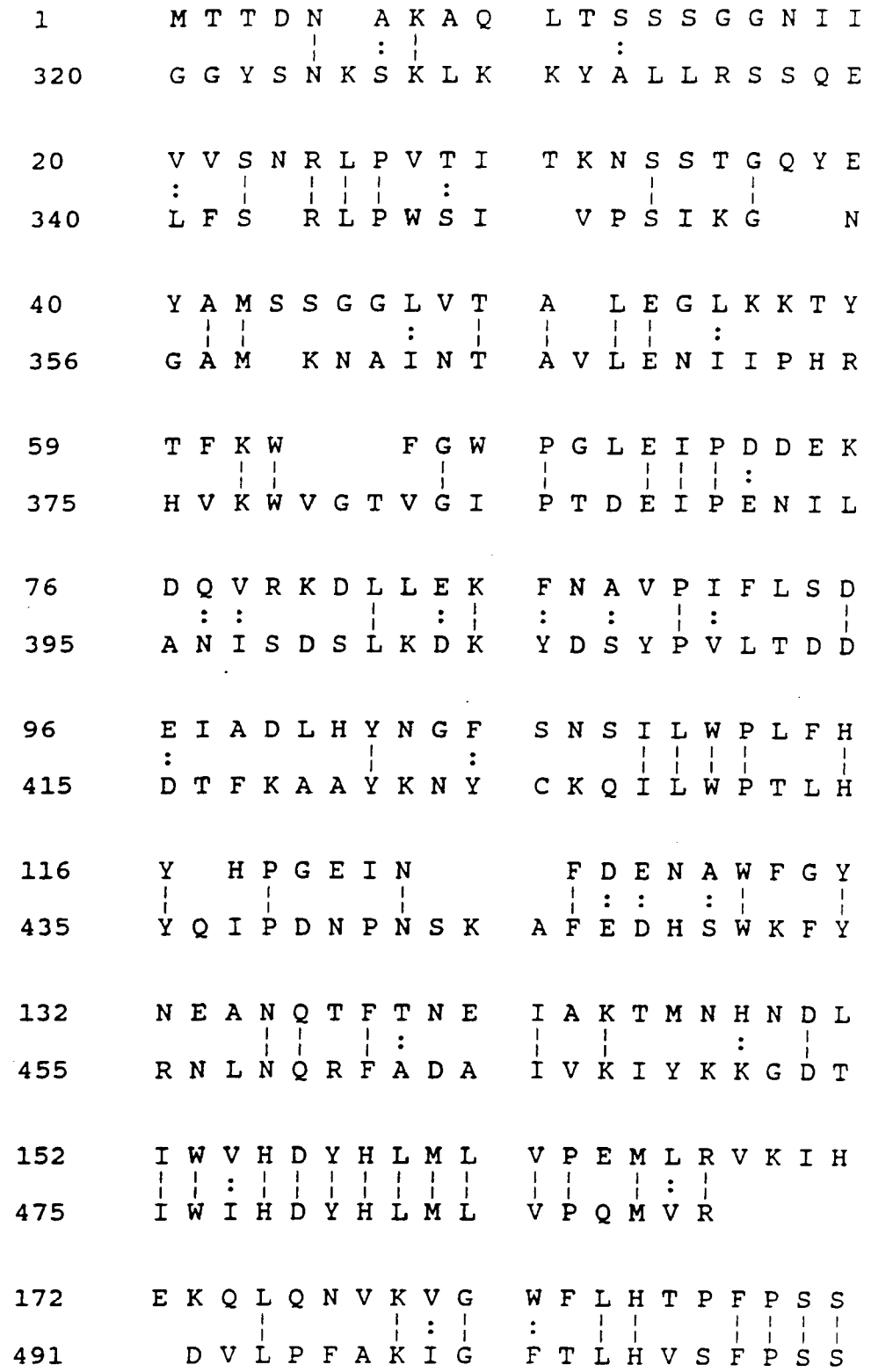

1 M T T D N A K A Q L T S S S G G N I I
320 G G Y S N K S K L K K Y A L L R S S Q E
20 V V S N R L P V T I T K N S S T G Q Y E
340 L F S R L P W S I V P S I K G N
40 Y A M S S G G L V T A L E G L K K T Y
356 G A M K N A I N T A V L E N I I P H R
59 T F K W F G W P G L E I P D D E K
375 H V K W V G T V G I P T D E I P E N I L
76 D Q V R K D L L E K F N A V P I F L S D
395 A N I S D S L K D K Y D S Y P V L T D D
96 E I A D L H Y N G F S N S I L W P L F H
415 D T F K A A Y K N Y C K Q I L W P T L H
116 Y H P G E I N F D E N A W F G Y
435 Y Q I P D N P N S K A F E D H S W K F Y
132 N E A N Q T F T N E I A K T M N H N D L
455 R N L N Q R F A D A I V K I Y K K G D T
152 I W V H D Y H L M L V P E M L R V K I H
475 I W I H D Y H L M L V P Q M V R
172 E K Q L Q N V K V G W F L H T P F P S S
491 D V L P F A K I G F T L H V S F P S S

FIG. 5A

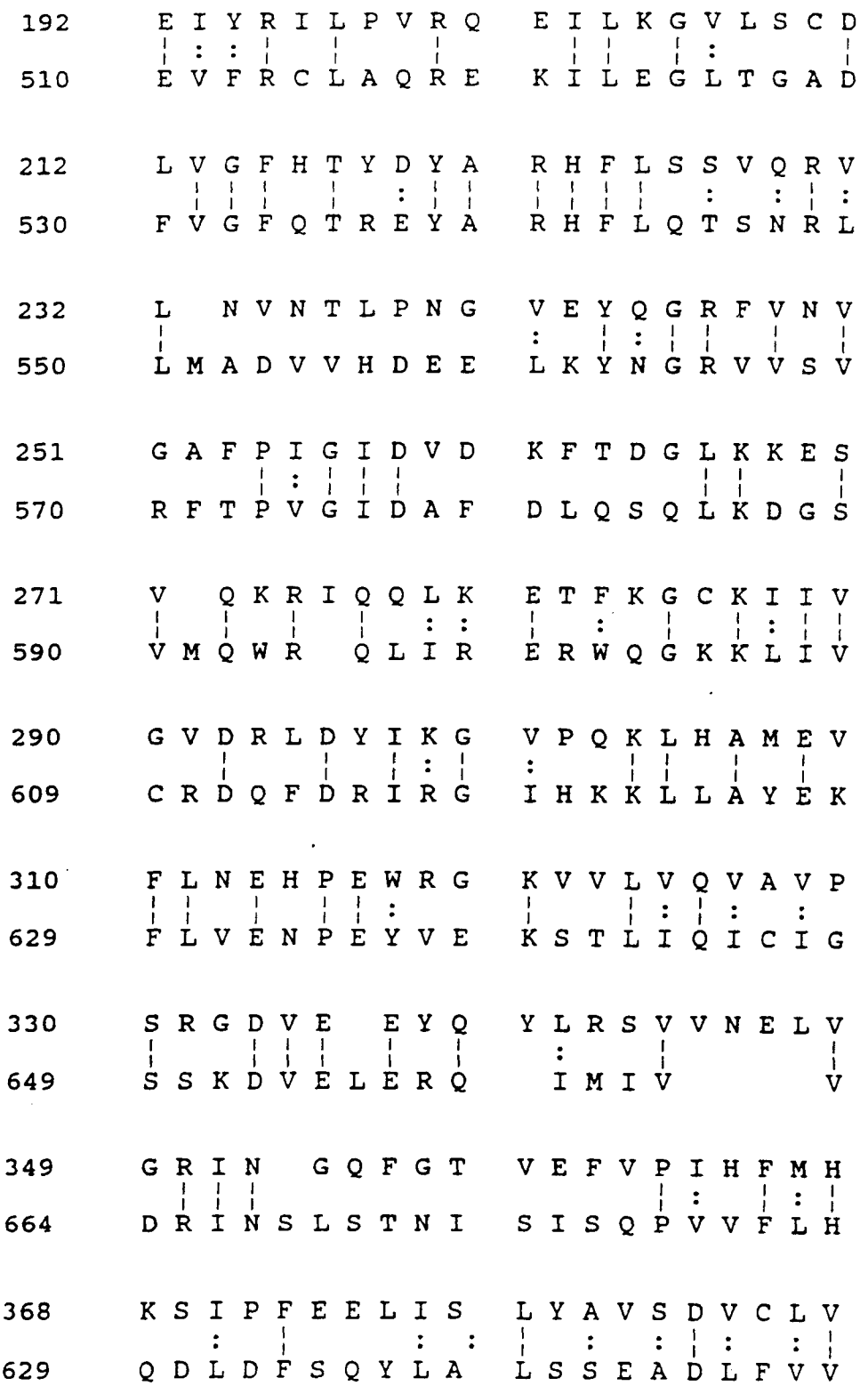

192 E I Y R I L P V R Q E I L K G V L S C D
510 E V F R C L A Q R E K I L E G L T G A D
212 L V G F H T Y D Y A R H F L S S V Q R V
530 F V G F Q T R E Y A R H F L Q T S N R L
232 L N V N T L P N G V E Y Q G R F V N V
550 L M A D V V H D E E L K Y N G R V V S V
251 G A F P I G I D V D K F T D G L K K E S
570 R F T P V G I D A F D L Q S Q L K D G S
271 V Q K R I Q Q L K E T F K G C K I I V
590 V M Q W R Q L I R E R W Q G K K L I V
290 G V D R L D Y I K G V P Q K L H A M E V
609 C R D Q F D R I R G I H K K L L A Y E K
310 F L N E H P E W R G K V V L V Q V A V P
629 F L V E N P E Y V E K S T L I Q I C I G
330 S R G D V E E Y Q Y L R S V V N E L V
649 S S K D V E L E R Q I M I V V
349 G R I N G Q F G T V E F V P I H F M H
664 D R I N S L S T N I S I S Q P V V F L H
368 K S I P F E E L I S L Y A V S D V C L V
629 Q D L D F S Q Y L A L S S E A D L F V V

FIG. 5B

```
388     S S T R D G M N L V   S Y E Y I A C Q E E
        | |   | : | | | |       | : |   |   | :
684     S S L R E G M N L T   C H E F I V C S E D

408     K K G S L I L S E F   T G A A Q S L N   G
        |       | : | | | |   | | : |     | |   |
724     K N A P L L L S E F   T G S A S L L N D G

427     A I I V N P W N T D   D L S D A I N E A L
        | | | : | | |   |       |   | |       |
744     A I I I N P W D T K   N F S Q A I L K G L

447     T L P D V K K E V N   W E K L Y K Y I S K
          : |     | :     :   |   | |   |   |
764     E M P F D K R R P Q   W K K L M K D I I N

467     Y T S A F W   G E N   F V H E L Y S T S S
            | :   |                     |
784     N D S T N W I K T S   L Q D I H I S W Q F

486     S S T S S S A T K     N
                |       |     |
804     N Q E G S K I F K L   N
```

Length = 511 Identities = 188 Gaps = 32

Identities/Length = 36.8 %

FIG. 5C

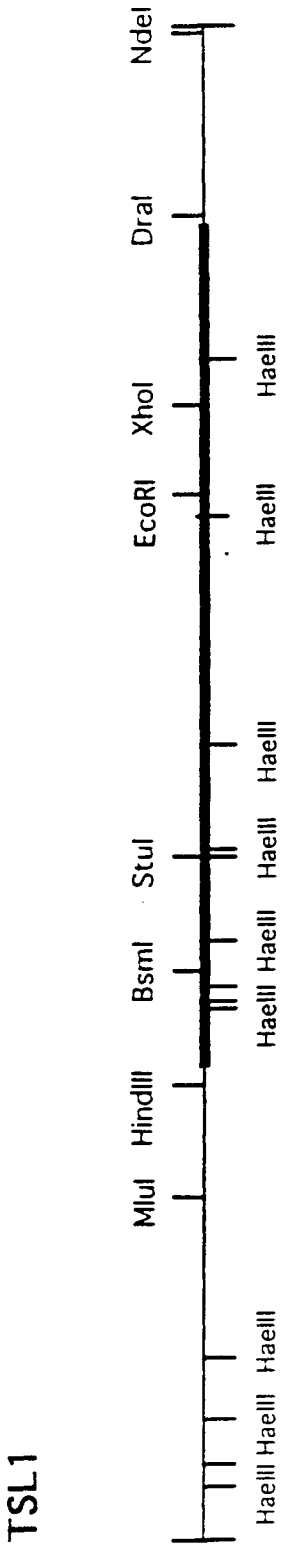

TSL1
MluI
HindIII
BsmI
StuI
EcoRI
XhoI
DraI
NdeI
HaeIII
1 kb

FIG. 6A

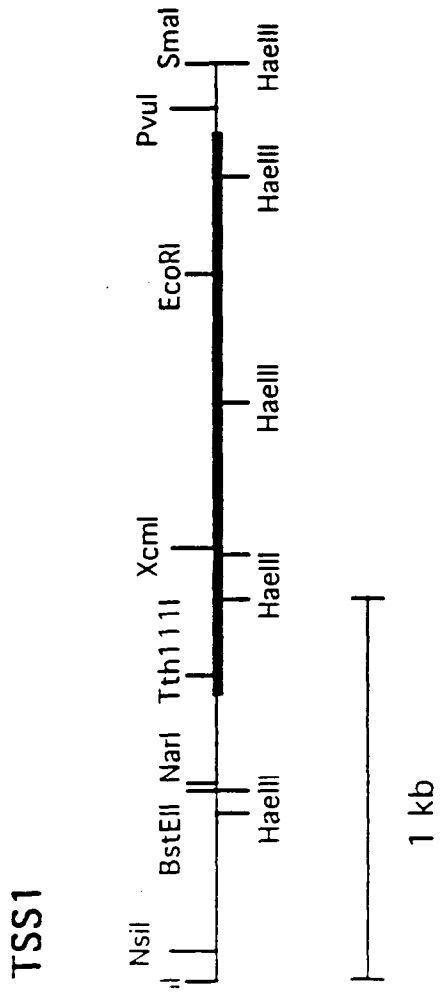

TSS1
NsiI
BstEII
NarI
Tth111I
XcmI
EcoRI
PvuI
SmaI
HaeIII
1 kb

FIG. 6B

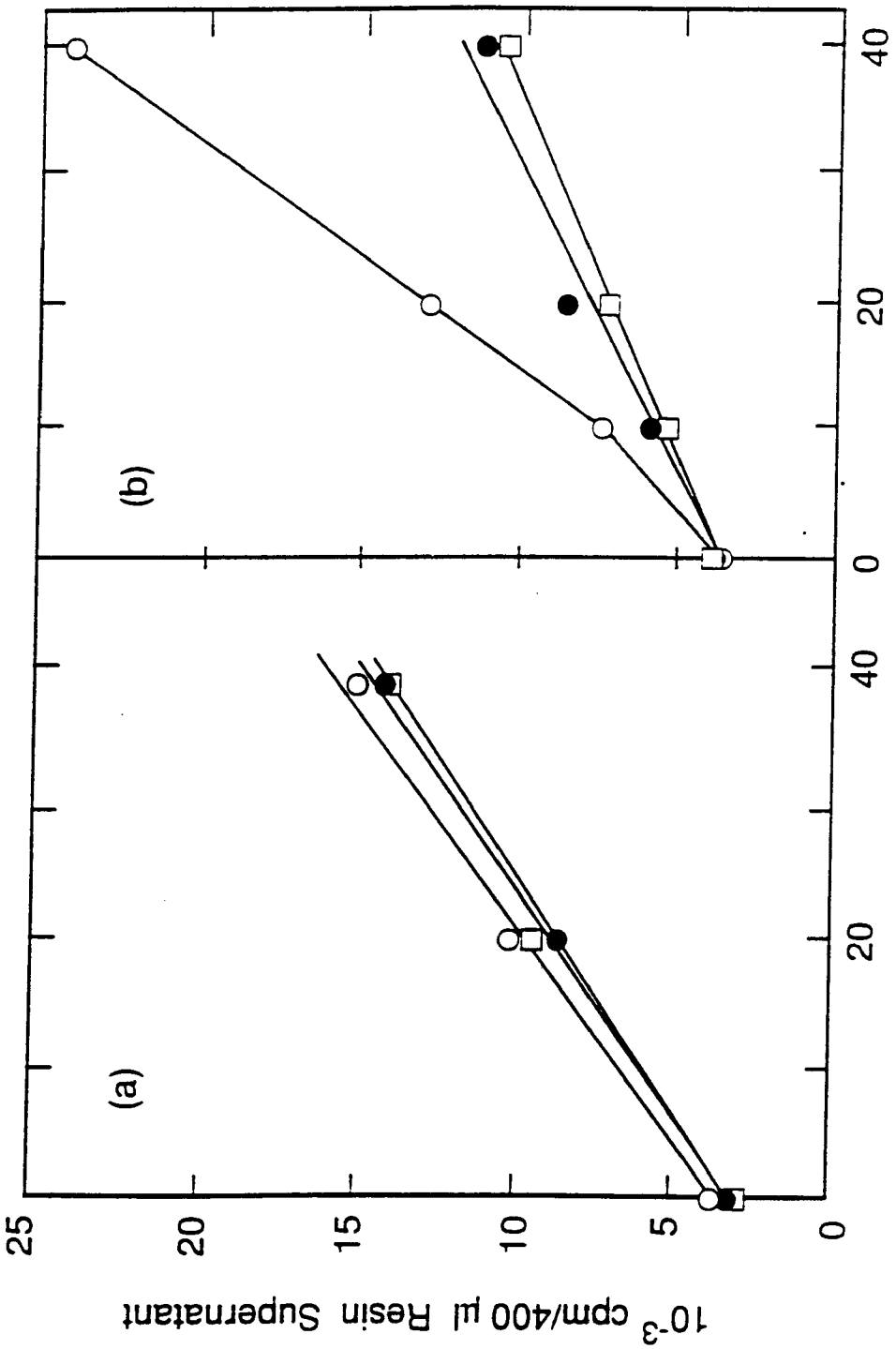

(a)
(b)
0
5
10
15
20
25
0
20
40
0
20
40
TIME (mins)
10-3 cpm/400 µl Resin Supernatant

FIG. 7

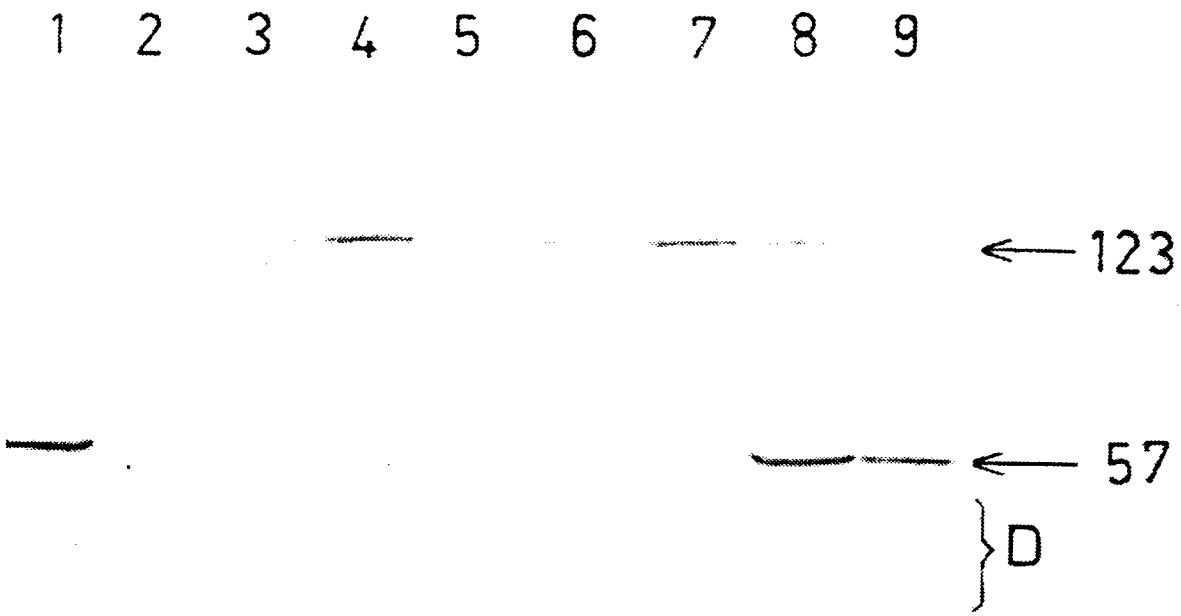


FIG. 8

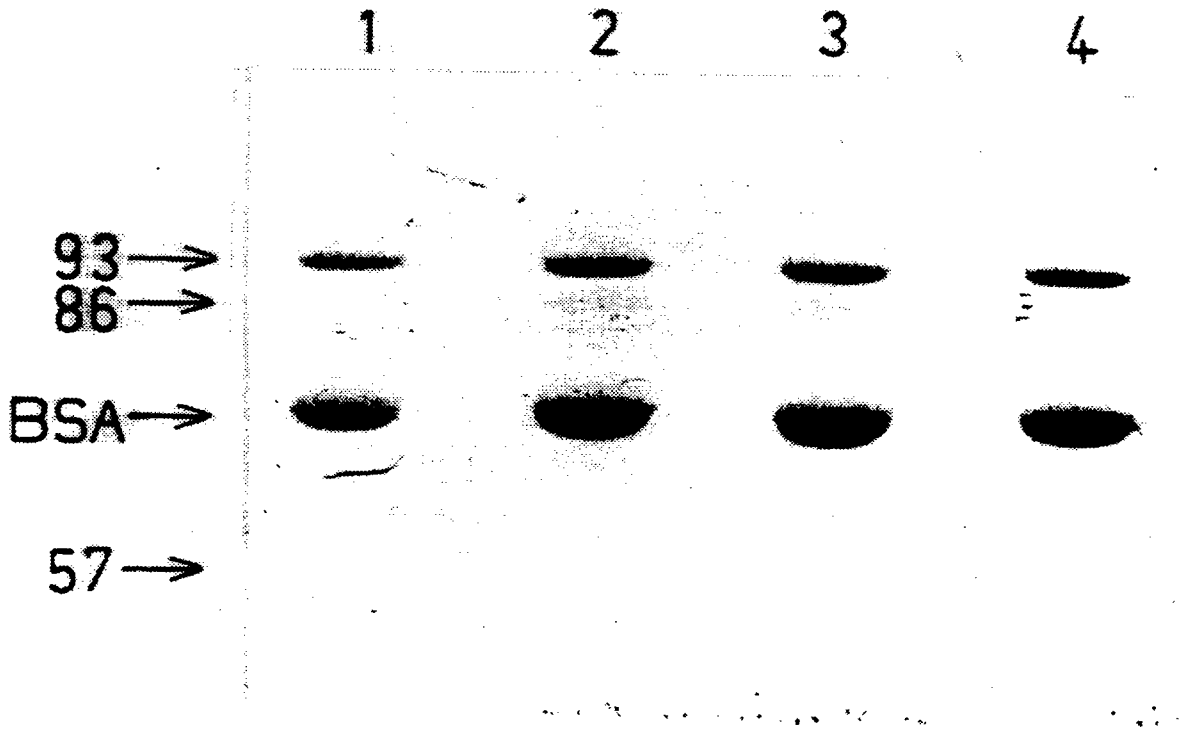


FIG. 10

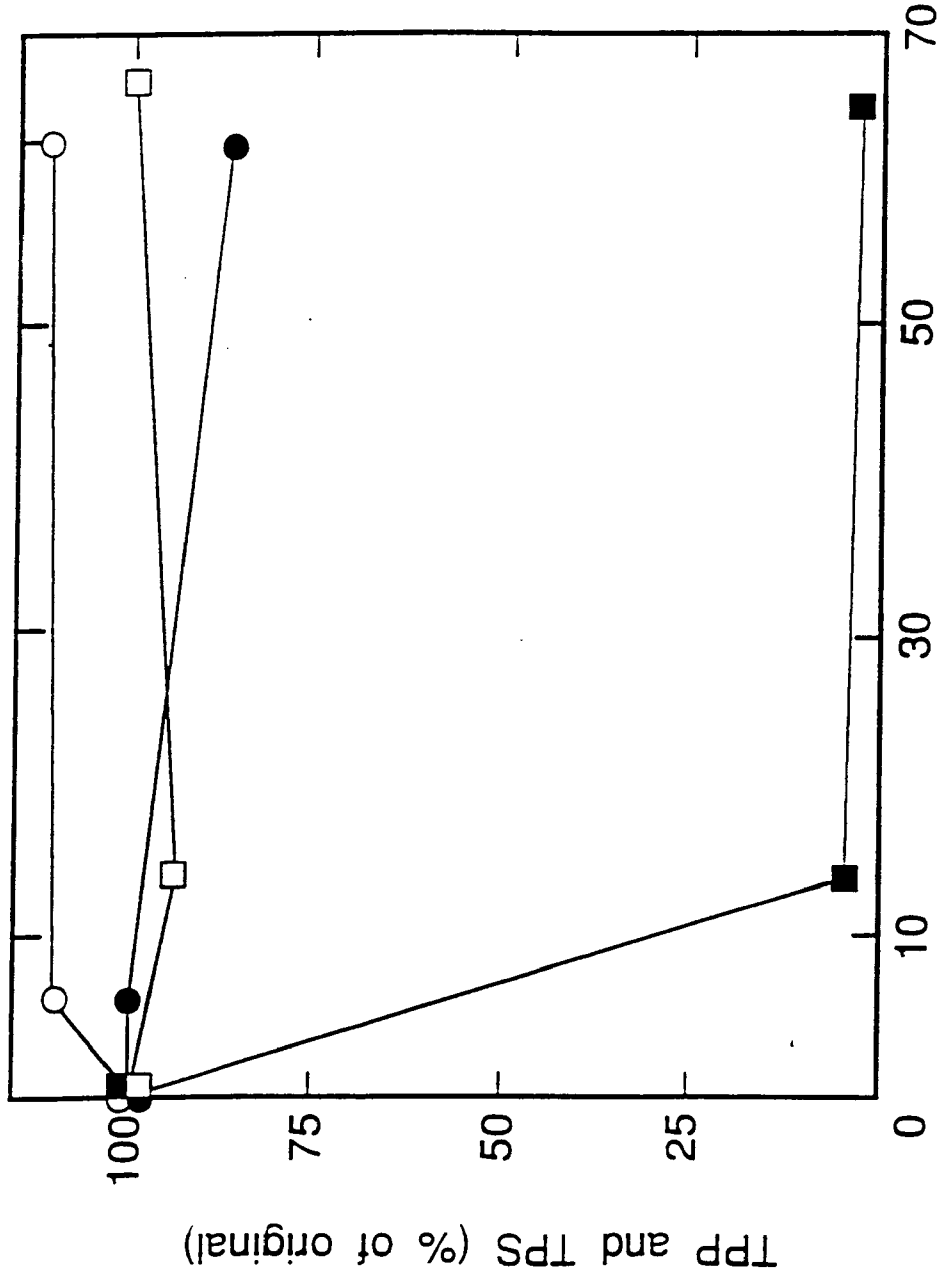


FIG. 9

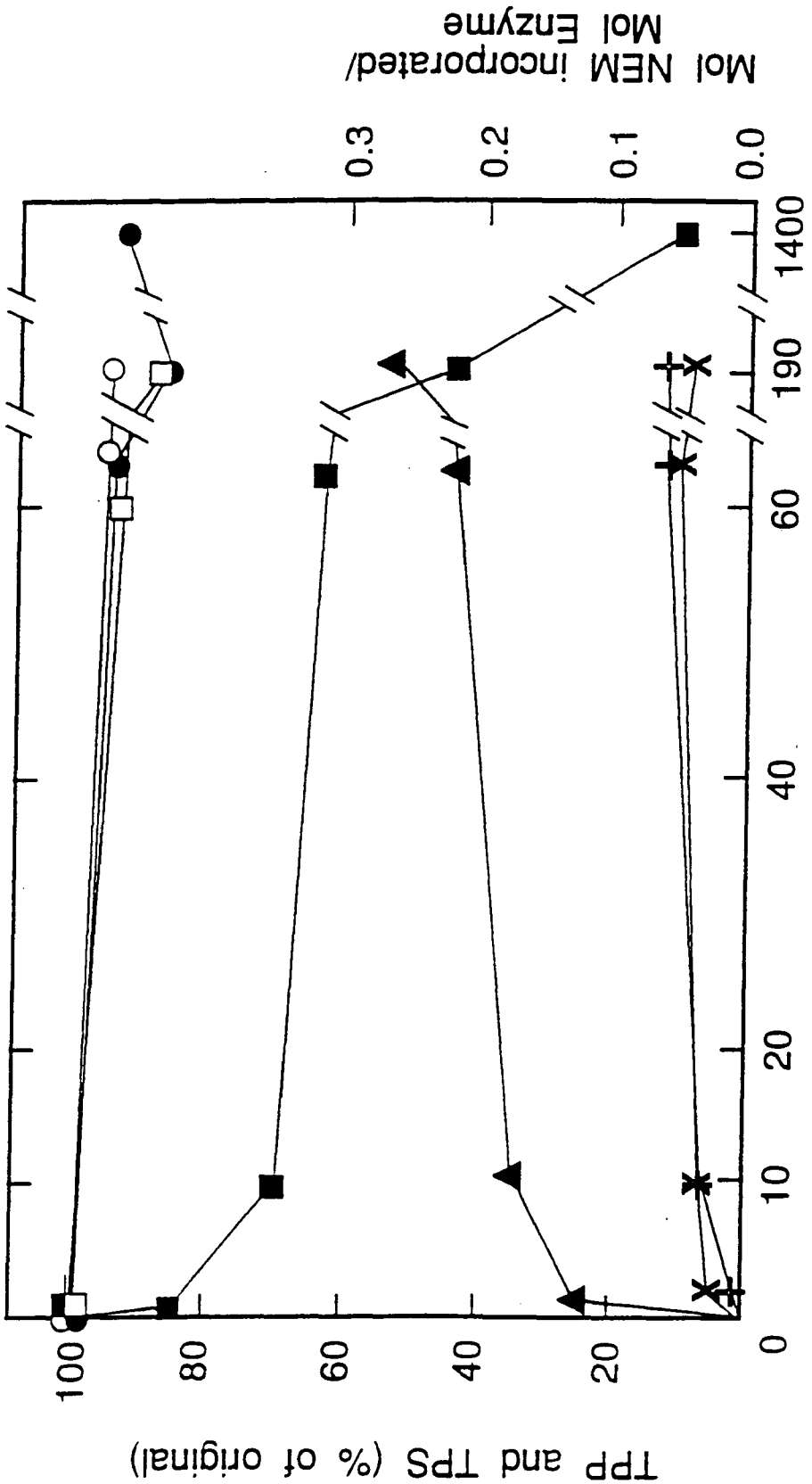
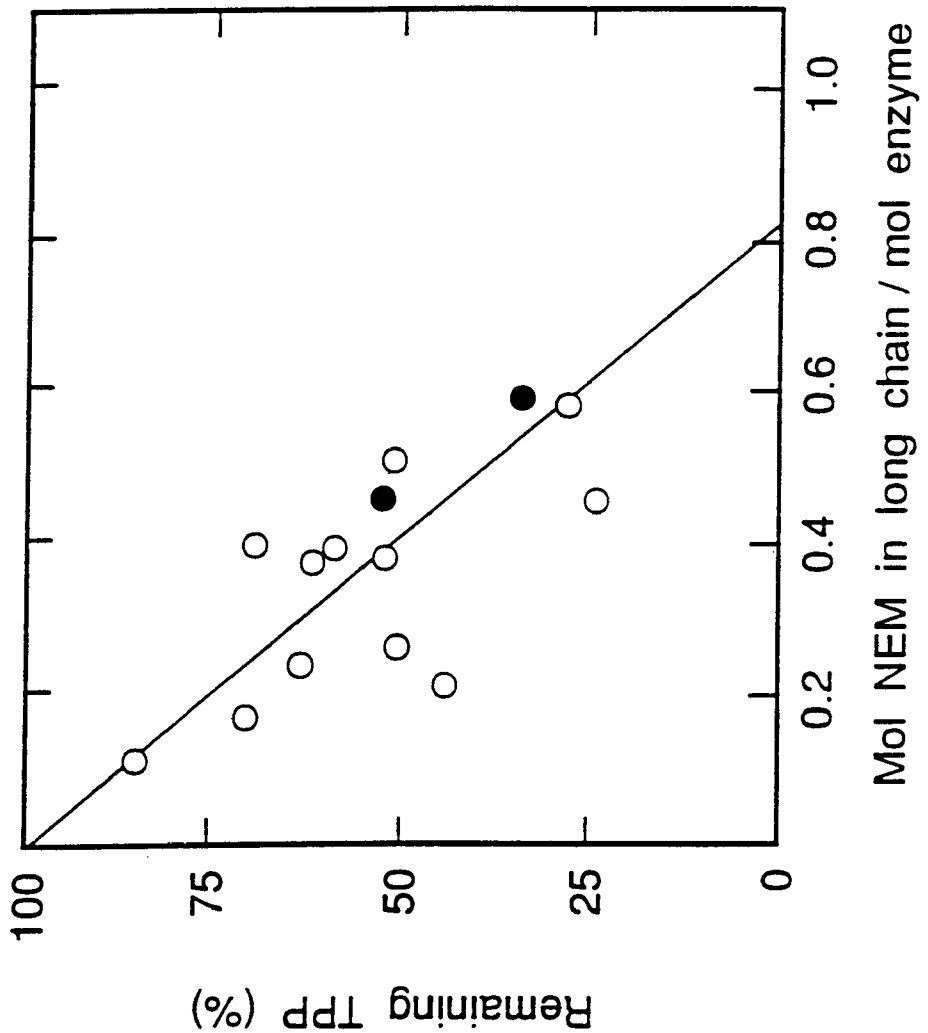

TPP and TPS (% of original)
100
80
60
40
20
0
10
20
40
60
190
1400
TIME (min)
Mol NEM incorporated/
Mol Enzyme
0.3
0.2
0.1
0.0

FIG. 11

FIG. 12


Remaining TPP (%)
100
75
50
25
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
Mol NEM in long chain / mol enzyme

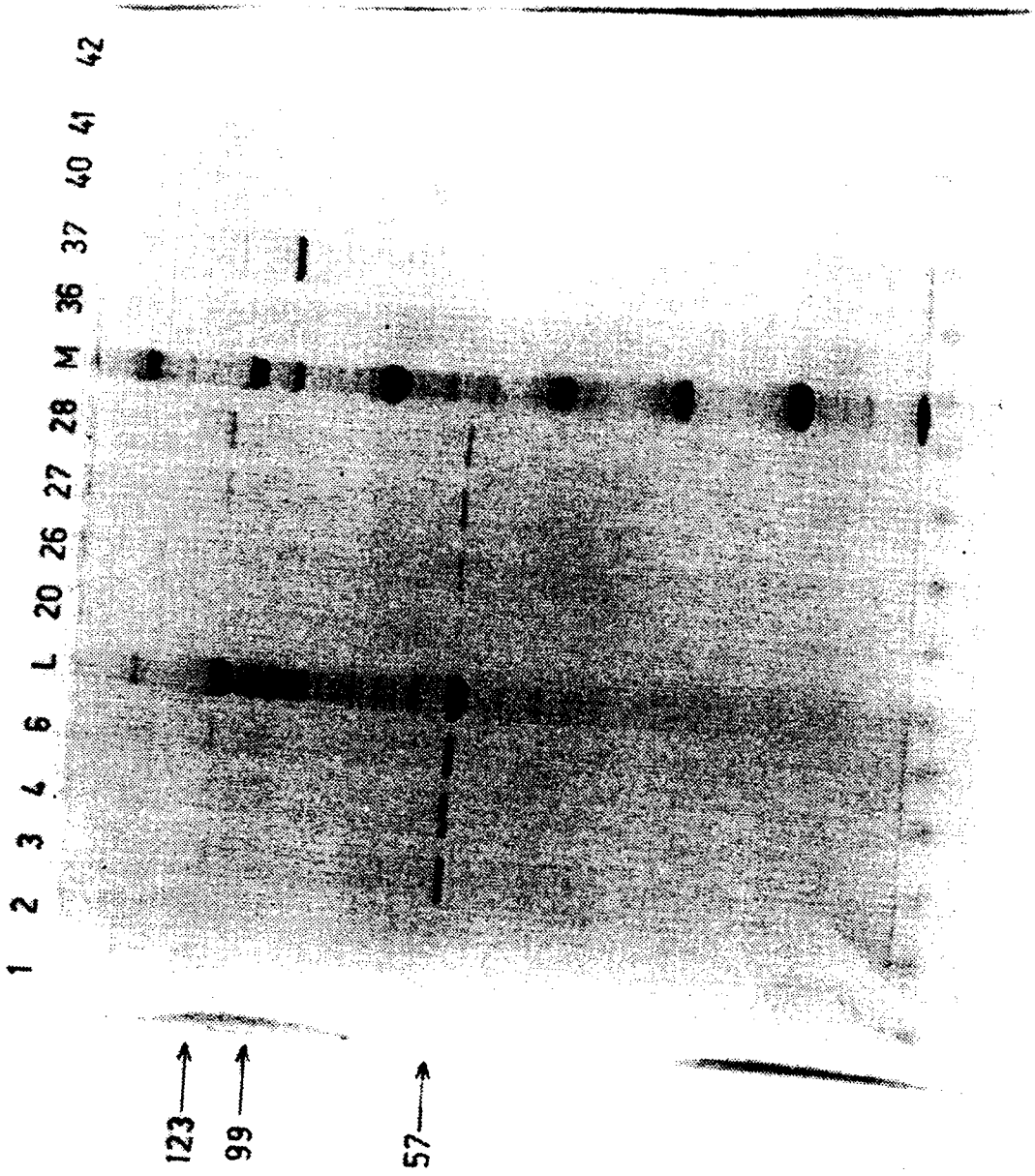


FIG. 13

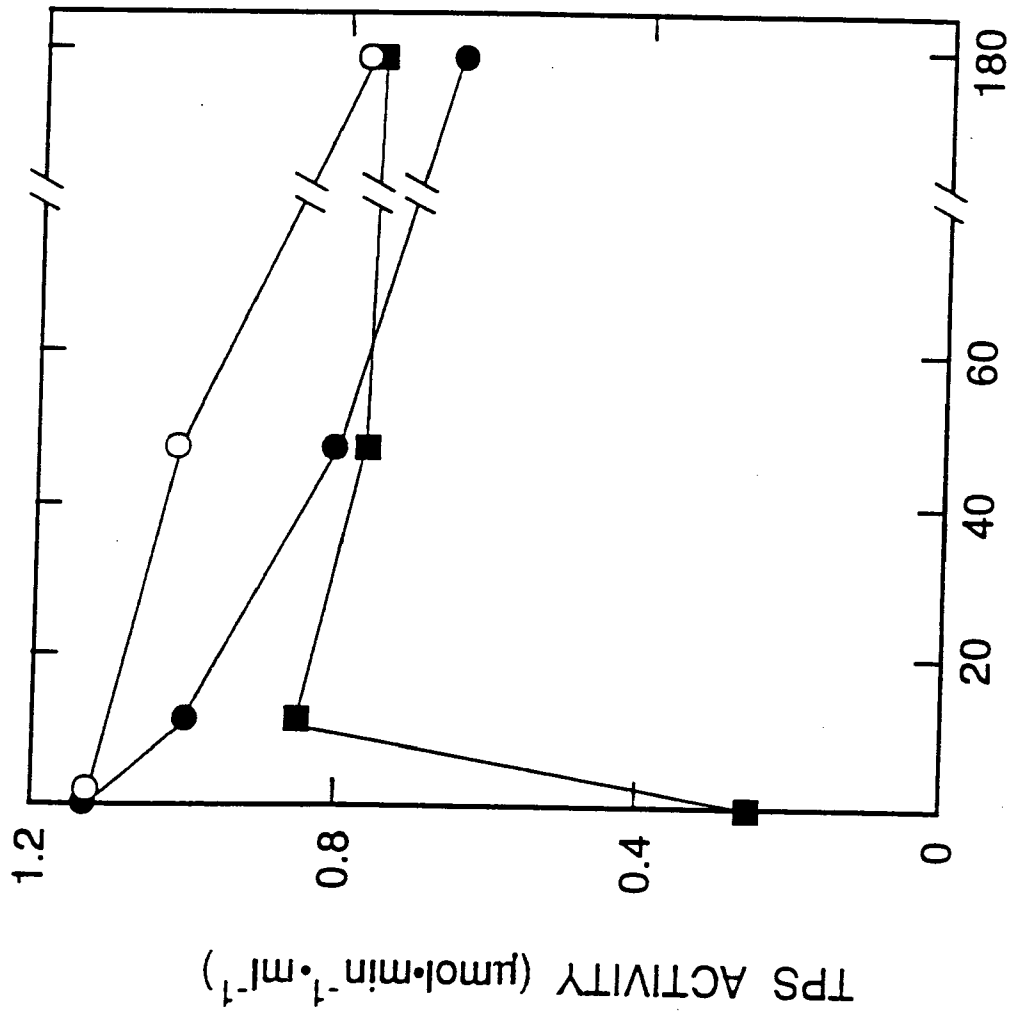


FIG. 14

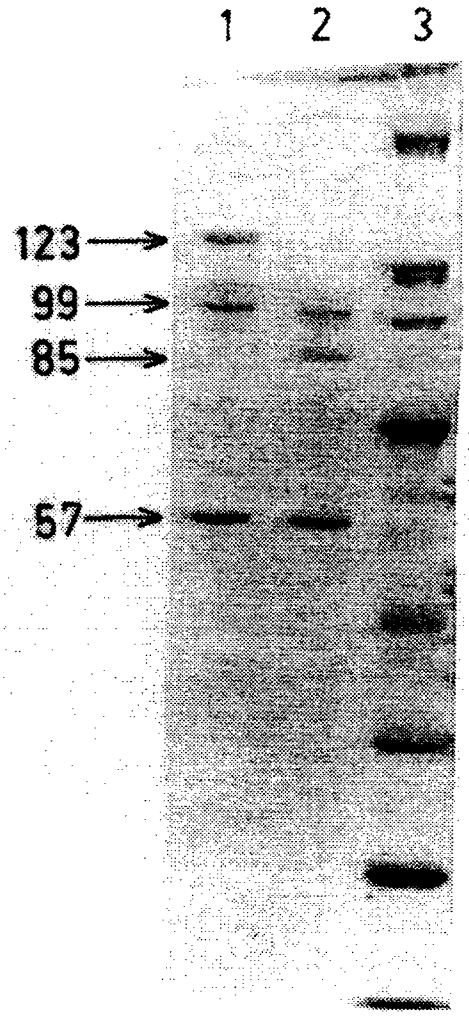


FIG. 15

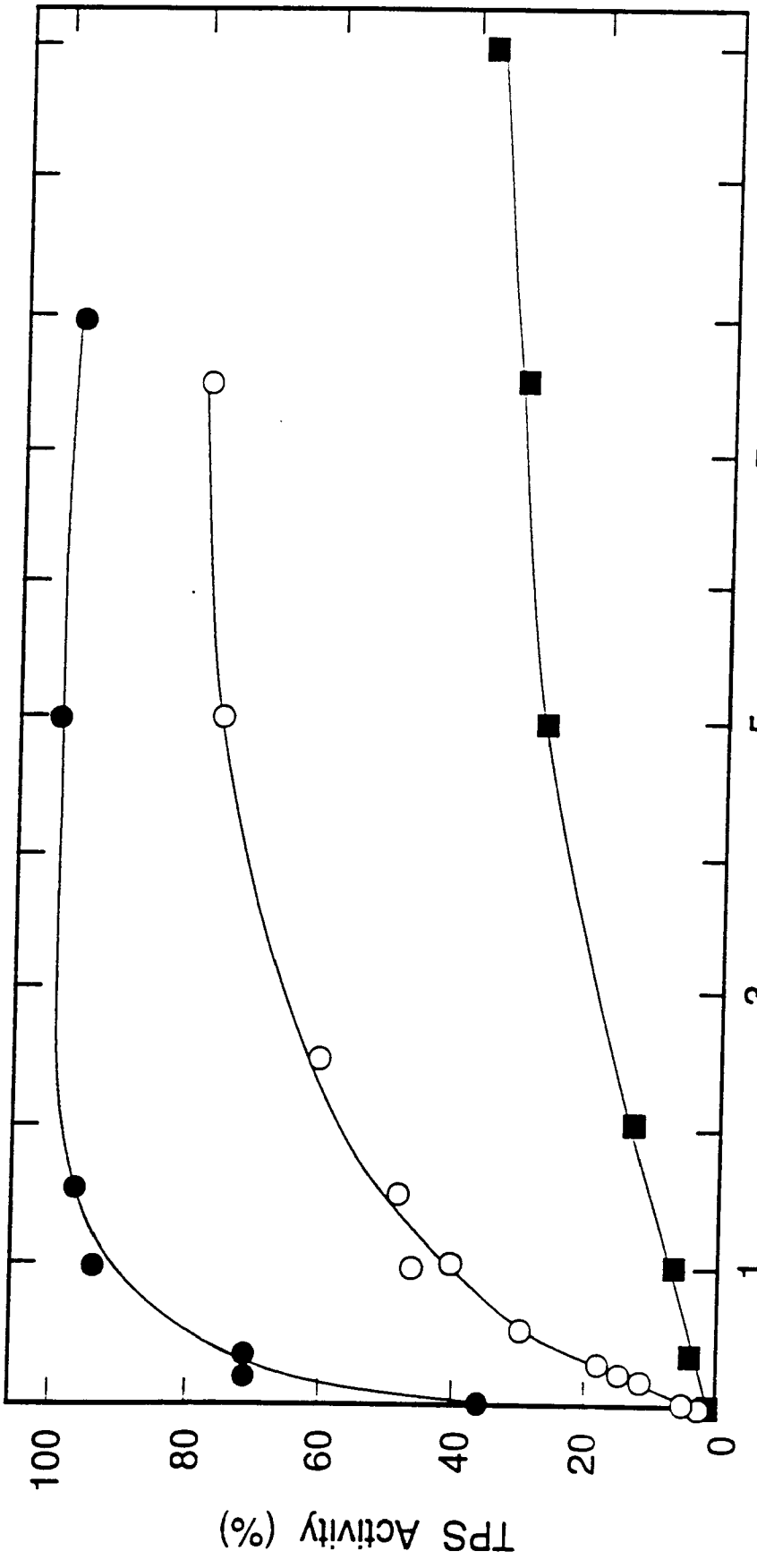


FIG. 16

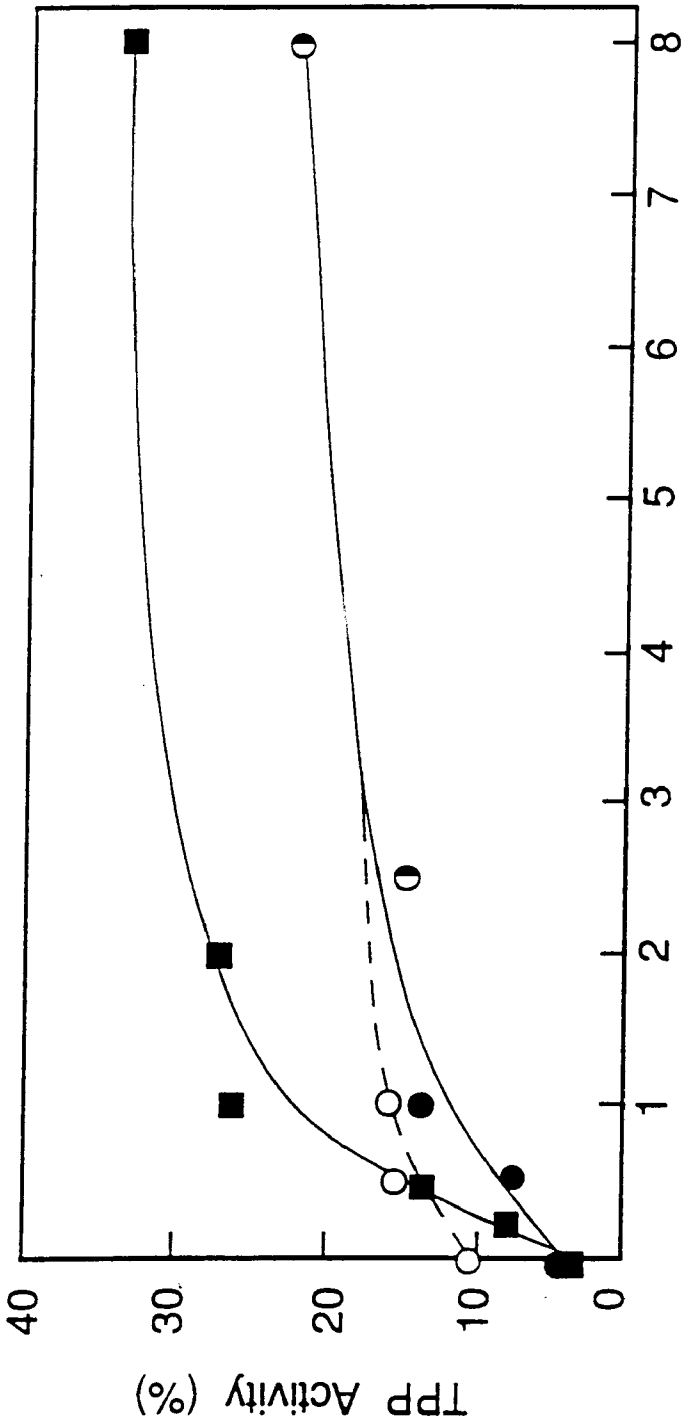


FIG. 17

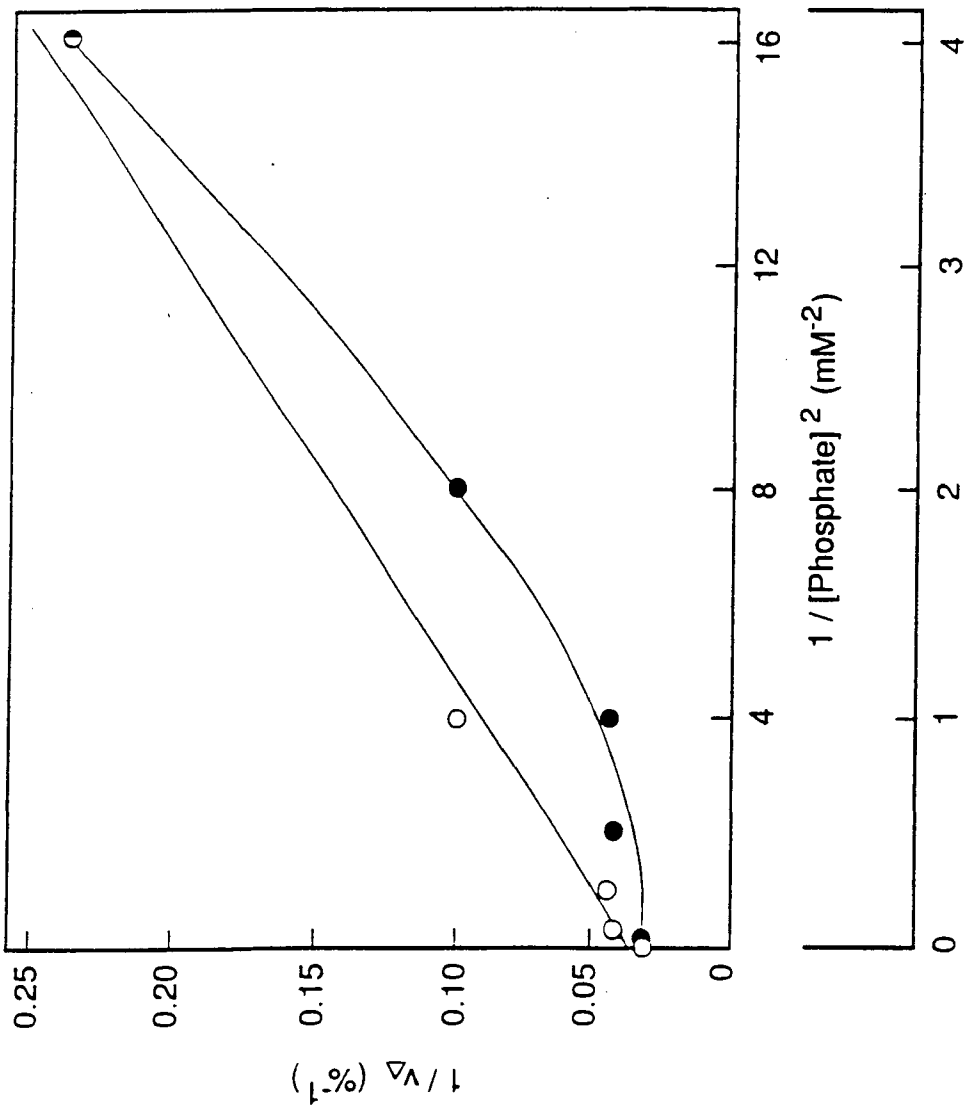

1 / v△ (%-1)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0
4
8
12
16
1 / [Phosphate]2 (mM-2)
0
1
2
3
4
1 / [Phosphate] (mM-1)

FIG. 18

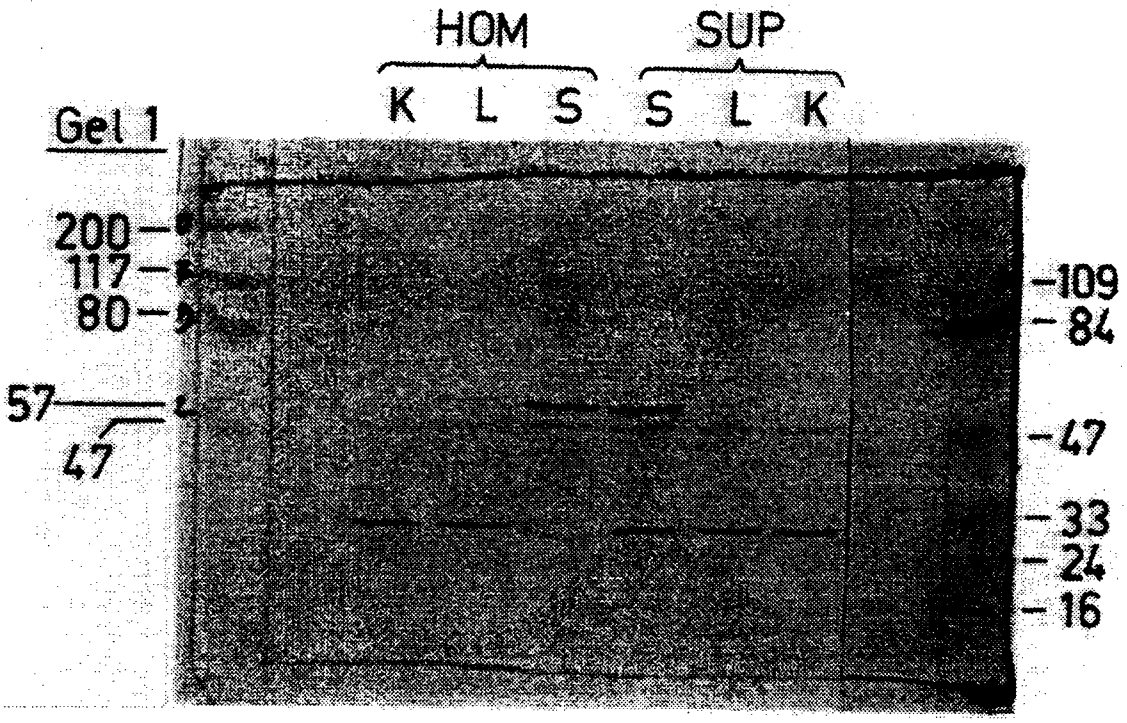


FIG. 19A

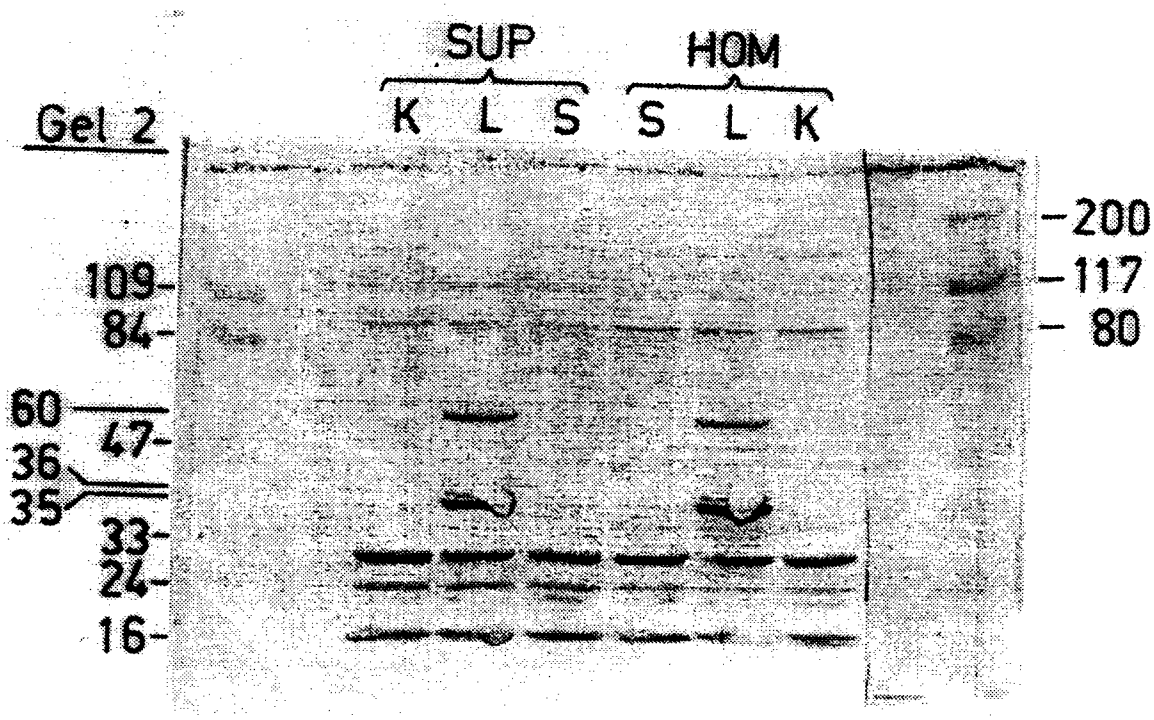


FIG. 19B

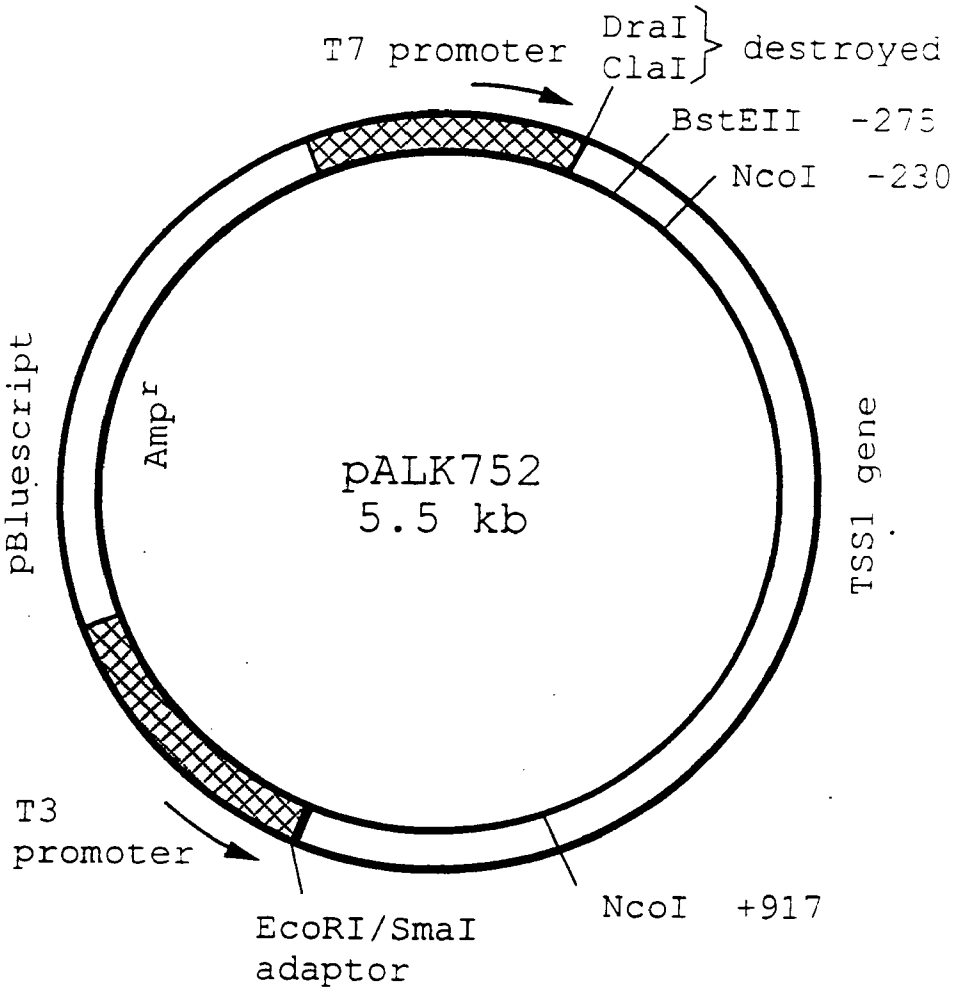

T7 promoter
DraI
ClaI
destroyed
BstEII -275
NcoI -230
pBluescript
Ampr
pALK752
5.5 kb
TSS1 gene
T3
promoter
EcoRI/SmaI
adaptor
NcoI +917

FIG. 20A

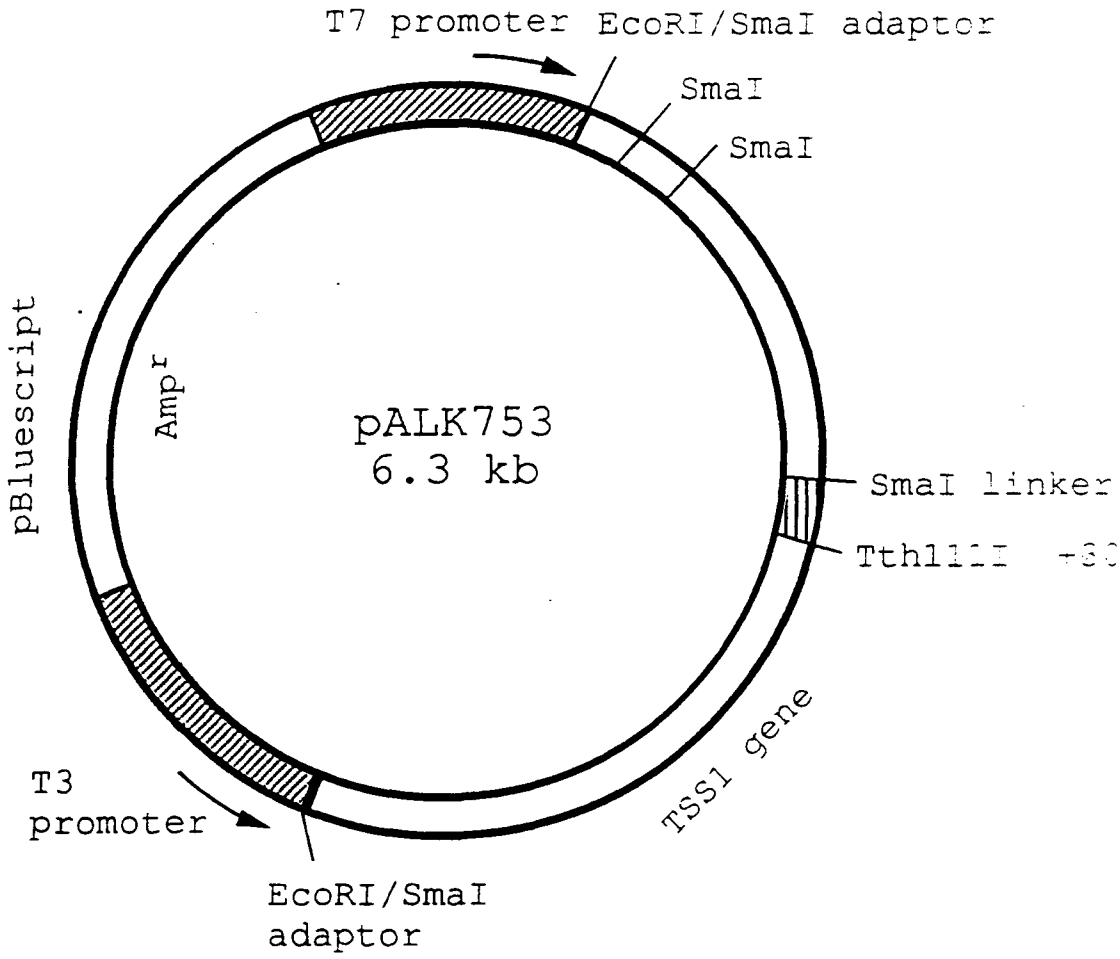

T7 promoter EcoRI/SmaI adaptor
SmaI
SmaI
pBluescript
Ampr
pALK753
6.3 kb
SmaI linker
Tth111I
T3
promoter
EcoRI/SmaI
adaptor
TSS1 gene

FIG. 20B

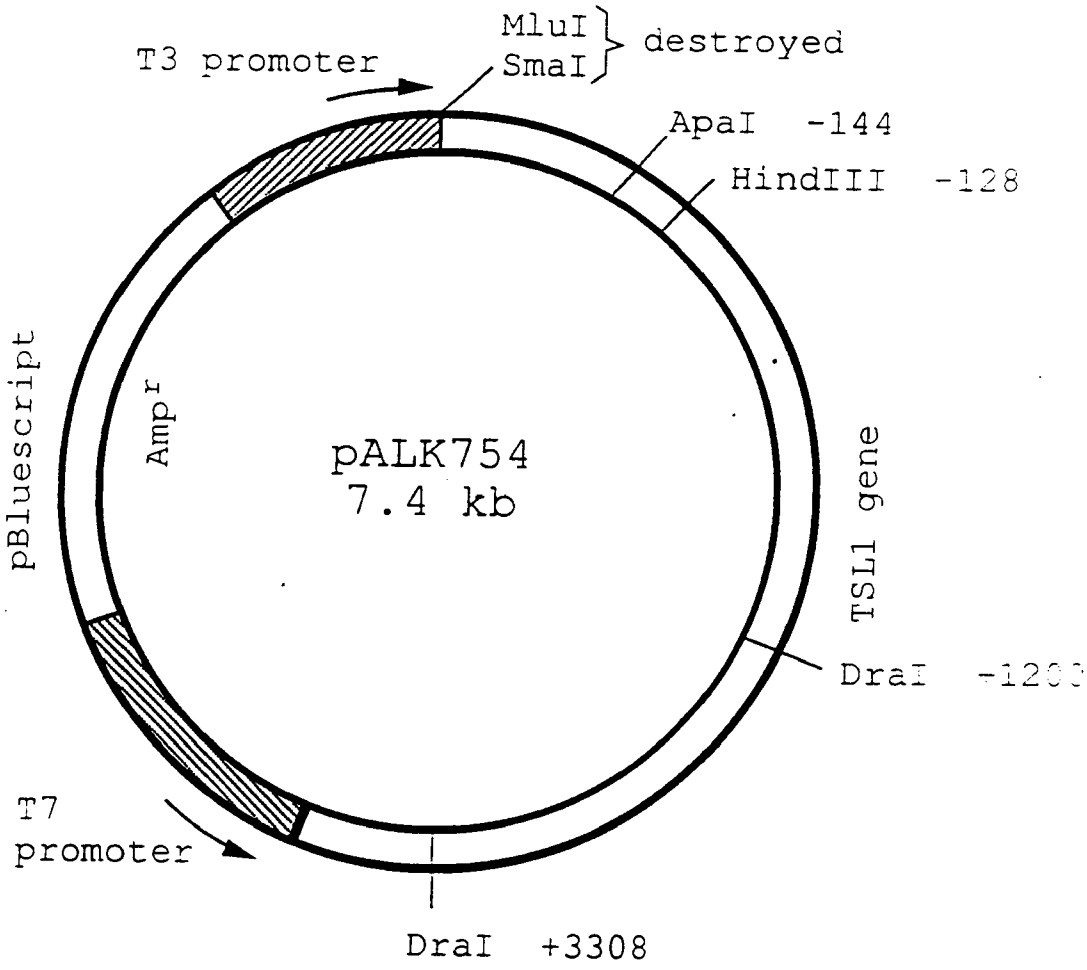

MluI
SmaI
destroyed
T3 promoter
ApaI -144
HindIII -128
pBluescript
Ampr
pALK754
7.4 kb
TSL1 gene
DraI -1200
T7
promoter
DraI +3308

FIG. 20C

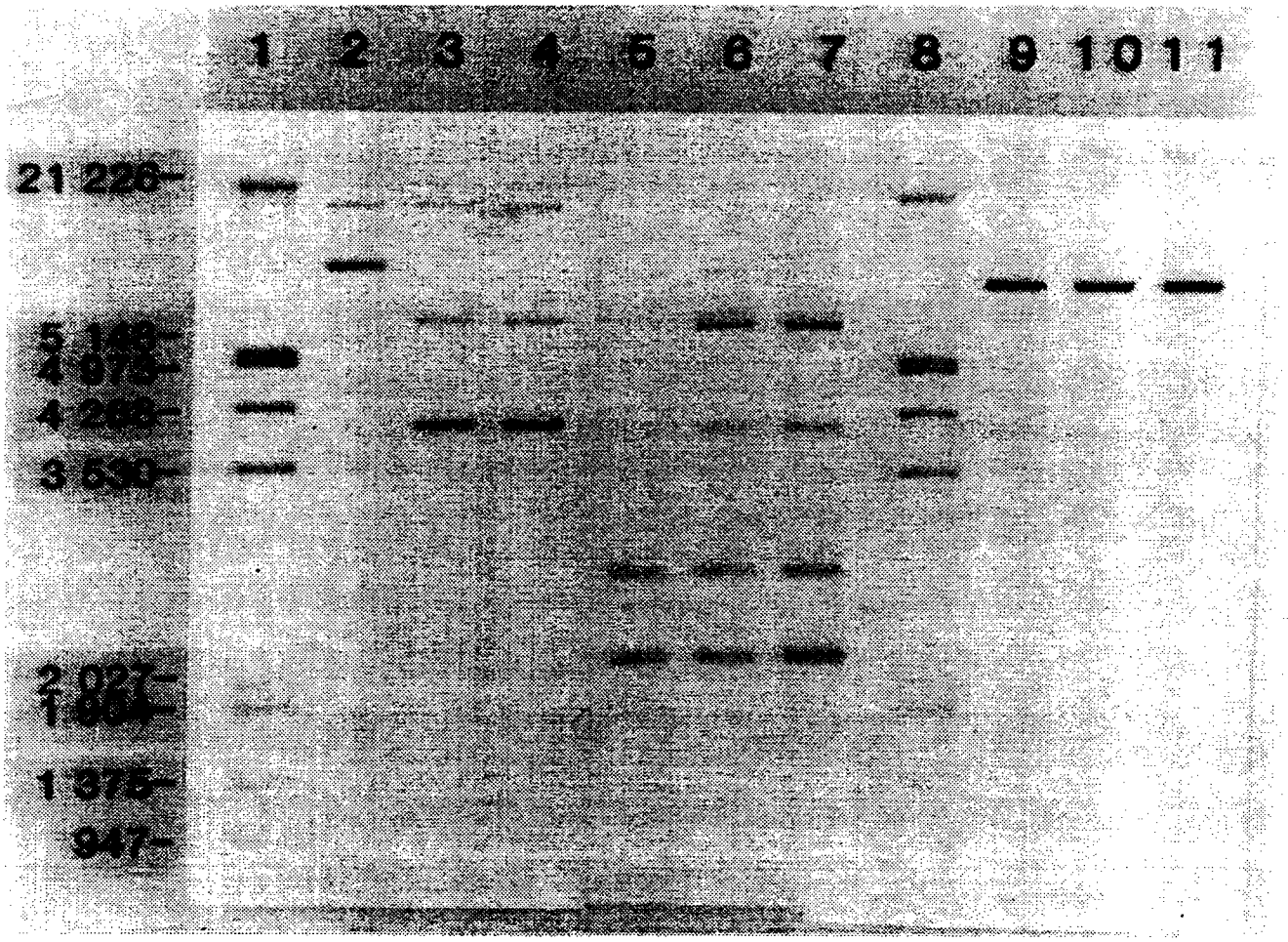


FIG. 21

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
Patentti- ja innovaatiolinja
PL 1160
00101 Helsinki

TUTKIMUSRAPORTTI

PATENTTIHAKEMUS NRO	LUOKITUS, IPC7
FI943739	

TUTKITUT PATENTTILUOKAT (luokitusjärjestelmät ja luokkatiedot)
TUTKIMUKSESSA KÄYTETYT TIETOKANNAT

VIITEJULKAISUT

Kategoria*)	Julkaisun tunnistetiedot ja tiedot sen olennaisista kohdista	Koskee vaatimuksia
	FI911500 A1 (GIST-BROCADES N.V.) 29.09.1991 LONDESBOROUGH J and VUORIO O. Trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex from bakers' yeast: purification of a proteolytically activated form. J Gen Microbiol. 1991, vol. 137, pages 323-30.	

Jatkuu seuraavalla sivulla ☐

*) X Julkaisu, jonka perusteella keksintö ei ole uusi tai ei eroa olennaisesti ennestään tunnetusta tekniikasta.
Y Julkaisu, jonka perusteella keksintö ei eroa olennaisesti ennestään tunnetusta tekniikasta, kun otetaan huomioon tämä ja yksi tai useampi samaan kategoriaan kuuluva julkaisu yhdessä.
A Yleistä tekniikan tasoa edustava julkaisu.

O Tullut julkiseksi esitelmän välityksellä, hyväksikäyttämällä tai muutoin muun kuin kirjoituksen avulla.
P Julkaistu ennen hakemuksen tekemispäivää mutta ei ennen aikaisinta etuoikeuspäivää.
T Julkaistu hakemuksen tekemispäivän tai etuoikeuspäivän jälkeen ja valaisee keksinnön periaatetta tai teoreettista taustaa.
E Aikaisempi suomalainen tai Suomea koskeva patentti- tai hyödyllisyysmallihakemus, joka on tullut julkiseksi hakemuksen tekemispäivänä (etuoikeuspäivänä) tai sen jälkeen.
D Julkaisu, joka on mainittu hakemuksessa.
L Julkaisu, joka kyseenalaistaa etuoikeuden, osoittaa toisen julkaisun julkaisupäivämäärän tai johon viitataan jostakin muusta syystä.

& Samaan patenttiperheeseen kuuluva julkaisu.

Lisätietoja liitteessä ☐

Päiväys	Tutkijainsinööri
10.02.2005	Enholm Susa