



AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 255 523 5	(22)	10.10.83	(44)	26.08.87
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 5, DD

(72) Malke, Horst, Doz. Dr. sc. nat., DD; Ferretti, Joseph J., Prof. Dr., US

(54) Verfahren zur Synthese von Streptokinase durch heterologe Produzenten

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Streptokinase durch heterologe Produzenten. Ihr Ziel besteht in der Isolierung eines Streptokinasegens (**skc**) und in der Bereitstellung von heterologen Wirten, die nach Aufnahme dieses **skc**-Gens Streptokinase zu produzieren vermögen. Diese Aufgaben sind in der Weise gelöst, daß im ersten Schritt eine Genbibliothek der genomischen DNA von **Streptococcus equisimilis** H46A mit Hilfe eines in-vitro-Systems zur DNA-Verpackung im Bakteriophagenvektor Lambda L47 angelegt wird. Die rekombinanten Phagenpartikeln werden dann unter Verwendung eines Plasminogen und Casein/Fibrin enthaltenden Assaysystems einem auf Streptokinasesynthese gerichteten Screening unterworfen. Die DNA der solcherart durch Primärklonierung erhaltenen **skc**⁺-rekombinanten Phagenstämme wird mit Restriktionsenzymen analysiert, und Teile der Target-DNA-Inserts mit funktionellem **skc**-Gen werden in Plasmidvektoren subkloniert. Mit den **skc**⁺-rekombinanten Plasmiden werden heterologe Bakterienarten, vorzugsweise **Escherichia coli**, **Streptococcus sanguis** und **Bacillus subtilis**, transformiert und die solcherart gentechnisch manipulierten Bakterien zur Streptokinaseproduktion durch submerse Fermentation eingesetzt.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Synthese von Streptokinase durch heterologe Produzenten unter Anwendung von Teilen gentechnischer Standardmethoden der DNA-Rekombination, **gekennzeichnet dadurch**, daß
 - das Gen für Streptokinase (**skc**) von einem **Streptococcus** der serologischen Gruppe C primär auf einem Bakteriophagenvektor kloniert wird, indem genomische DNA eines Gruppe C-Streptokokkenstammes und der Phagenvektor mit Restriktionsenzymen, die kompatible Enden liefern, gespalten werden, die so erhaltenen DNA-Fragmente ligiert werden, die ligierte DNA auf an sich bekannte Weise mittels eines Verpackungssystems in vitro in Partikeln des jeweils herangezogenen Phagenvektors verpackt wird und die resultierenden Phagenpartikeln nach Plaquebildung einem screening auf **skc**⁺-rekombinante Phagenstämme unterworfen werden,
 - die DNA von so erhaltenen **skc**⁺-rekombinanten Phagenstämmen mit Restriktionsenzymen analysiert wird sowie Teile der Target-DNA-Inserts mit funktionellem **skc**-Gen aus einem durch die Primär-Klonierung erhaltenen rekombinanten Phagenstamm in an sich bekannte Plasmidvektoren, vorzugsweise für **Escherichia coli**, **Streptococcus sanguis** oder **Bacillus subtilis**, subkloniert werden,
 - die erhaltenen **skc**⁺-rekombinanten Plasmidvektoren mit an sich bekannten Methoden in Stämme aus o. g. Bakterienarten transformiert werden und solcherart gentechnisch manipulierte Bakterienstämme zur fermentativen Produktion von Streptokinase eingesetzt werden, wobei die gebildete Streptokinase mit gängigen biochemischen Assays nachgewiesen oder gegebenenfalls quantitativ bestimmt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß
 - **S. equisimilis**, vorzugsweise Stamm H46A, als **skc**-Gendonor herangezogen wird, die chromosomale DNA des eingesetzten Stammes mit Restriktionsenzymen, die mit den Insertionsorten im Bakteriophagenvektor kompatibel sind, vorzugsweise mit **Sau3AI** oder **MboI**, partiell gespalten und durch Sucrosegradientenzentrifugation fraktioniert wird, wobei Donor-DNA-Fragmente mit einer Größe, die mit der Verpackungskapazität der Bakteriophagenvektor-DNA harmonisiert, vorzugsweise von 4 kb bis 15 kb, gesammelt und zur Ligation eingesetzt werden,
 - ein **E. coli**-Bakteriophagenvektor, vorzugsweise Lambda L47, zur Primärklonierung des **skc**-Gens herangezogen und durch komplette Verdauung mit einem das zentrale stuffer-Fragment entfernenden Enzym, vorzugsweise **BamH1**, für die Ligation vorbereitet wird
 - und die so präparierten Donor-DNA- und Bakteriophagen-DNA-Fragmente mit DNA-Ligase, vorzugsweise T4-DNA-Ligase, in an sich bekannter Weise ligiert und in vitro in Lambdaphagenpartikeln verpackt werden.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß im Ergebnis der Primärklonierung erhaltenen rekombinanten Phagenpartikeln auf Wirtsstämmen, vorzugsweise auf **E. coli**-Wirtsstämmen, insbesondere auf WL87 oder WL95(P2), ausgeplattet und nach erfolgter Plaquebildung mit einem im Diffusionsbereich der Plaques Streptokinasesynthese anzeigenden Assaymedium, vorzugsweise ein Agar- oder Agarosemedium, bestehend aus Casein (Magermilch) oder Fibrin und humanem Plasminogen, überschichtet werden.
4. Verfahren nach Punkt 1, 2 und 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß die im Ergebnis der Primärklonierung erhaltenen **skc**⁺-rekombinanten Lambda L47-Phagenstämme, darunter die als λ L47Askc bis λ L47Kskc bezeichneten rekombinanten Phagenklone, insbesondere der Klon λ L47Eskc, mit den Restriktionsenzymen **HindIII**, **EcoRI** und **BamH1** durch anschließende Agarose-Gelelektrophorese analysiert werden.
5. Verfahren nach Punkt 1, 2 und 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß **skc**⁺-Fragmente der Target-DNA des jeweiligen Phagenklons, vorzugsweise eines von **E. coli**-Bakteriophagenvektoren hergeleiteten Klons, insbesondere des Klons Lambda L47Eskc, in Plasmidvektoren, vorzugsweise in **E. Coli**-Plasmidvektoren, insbesondere in Plasmid pBR322, subkloniert werden.
6. Verfahren nach Punkt 1 und 5, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein durch partielle **HindIII**-Verdauung erhaltenes 7.4 kb-**skc**⁺-Fragment der Target-DNA von Klon Lambda L47Eskc in den singulären **HindIII**-Ort von pBR322 inseriert wird und das so erhaltene **skc**⁺-rekombinante Plasmid pMF1 (11.8 kb) sowohl zur Transformation von **E. coli**-Stämmen als auch zur Konstruktion weiterer **skc**⁺-rekombinanter Plasmide eingesetzt wird.
7. Verfahren nach Punkt 1 und 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß durch Enzym **EcoRI** oder durch Enzym **PstI** aus dem Plasmid pMF1 jeweils ein **skc**⁺-Fragment herausgetrennt und erneut in **E. coli**-Plasmidvektoren mit singulären **EcoRI**- und/oder **PstI**-Orten, vorzugsweise in pACYC184, pBR322 oder pPLa2311 subkloniert wird.

8. Verfahren nach Punkt 1, 6 und 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein durch komplette **EcoRI**-Verdauung von pMF1 erhaltenes 6.4 kb-**skc**⁺-Fragment in den singulären **EcoRI**-Ort von pACYC184 inseriert wird und die so erhaltenen **skc**⁺-rekombinanten Plasmide pMF2I und pMF2II von jeweils 10.4 kb sowohl zur Transformation von **E. coli**-Stämmen als auch zur Konstruktion weiterer **skc**⁺-rekombinanter Plasmide eingesetzt werden.
9. Verfahren nach Punkt 1, 6 und 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein durch komplette **PstI**-Verdauung von pMF1 erhaltenes 2.5 kb-**skc**⁺-Fragment in den singulären **PstI**-Ort von pBR322 inseriert wird und die so erhaltenen **skc**⁺-rekombinanten Plasmide pMF5I und pMF5II von jeweils 6.9 kb sowohl zur Transformation von **E. coli**-Stämmen als auch zur Konstruktion weiterer **skc**⁺-rekombinanter Plasmide eingesetzt werden.
10. Verfahren nach Punkt 1, 6 und 8, **gekennzeichnet dadurch**, daß das 6.4 kb-**skc**⁺-Fragment mittels **EcoRI** aus pMF1 oder aus pMF2 herausgetrennt und in den singulären **EcoRI**-Ort von pLa2311 inseriert wird, wobei das **skc**-Gen stromabwärts unter die Kontrolle des starken p_L-Promoters gerät, der nach Temperaturinduktion des Phagen λCI857 eingeschaltet wird und das so erhaltene **skc**⁺-rekombinante Plasmid pSM22311 (10.2 kb) zur Transformation von λCI857-lysogenen **E. coli**-Stämmen, vorzugsweise HB101 (λCI857), eingesetzt wird.
11. Verfahren nach Punkt 1, 6, 8 und 9, **gekennzeichnet dadurch**, daß das 2.5 kb-**skc**⁺-Fragment mittels **PstI** aus pMF1, pMF2 oder pMF5 herausgetrennt, in den singulären **PstI**-Ort von pLa2311 inseriert wird, wobei das **skc**-Gen stromabwärts unter die Kontrolle des starken p_L-Promoters gerät, der nach Temperaturinduktion des Phagen λCI857 eingeschaltet wird und das so erhaltene **skc**⁺-rekombinante Plasmid pSM52311 (6.3 kb) zur Transformation von λCI857-lysogenen **E. coli**-Stämmen, vorzugsweise HB101 (λCI857), eingesetzt wird.
12. Verfahren nach Punkt 1, 6, 8 und 9, **gekennzeichnet dadurch**, daß jeweils eines der **skc**⁺-rekombinanten Plasmide pMF1, pMF2I und pMF2II, pMF5I und pMF5II in die **E. coli**-Stämme HB101, 294 oder CP78 transformiert wird, die so erhaltenen transformierten **E. coli**-Stämme zur Submersfermentation für die Produktion von Streptokinase eingesetzt werden und die dabei gebildete Streptokinase teils aus dem zellfreien Kulturmedium sowie teils aus dem Periplasma und dem Cytoplasma der **E. coli**-Zellen gewonnen wird.
13. Verfahren nach Punkt 1, 6, 8, 9, 10 und 11, **gekennzeichnet dadurch**, daß jeweils eines der **skc**⁺-rekombinanten Plasmide pMF1, pMF2I und pMF2II, pMF5I und pMF5II, pSM22311 und pSM52311 in den einen thermolabilen Phagenrepressor tragenden Lambda-lysogenen **E. coli**-Stamm HB101 (λCI857) transformiert wird, die so erhaltenen transformierten Stämme zur Submersfermentation für die Produktion von Streptokinase eingesetzt werden und die gesamte dabei gebildete Streptokinase nach Hitzeschock der jeweiligen Kultur aus dem zellfreien Medium gewonnen wird.
14. Verfahren nach Punkt 1 und 6 oder 8, **gekennzeichnet dadurch**, daß das 6.4 kb-**skc**⁺-Fragment durch komplette Spaltung mit **EcoRI** aus pMF1 oder pMF2 herausgelöst, in den singulären **EcoRI**-Ort des Streptokokken-Vektorplasmids pSM7 inseriert, das so erhaltene **skc**⁺-rekombinante Plasmid pSM720 (12.8 kb) in Stämme der Art **Streptococcus sanguis**, vorzugsweise in **S. sanguis** Challis 6, transformiert wird, die transformierten Stämme zur Submersfermentation für die Produktion von Streptokinase eingesetzt werden und die gesamte dabei gebildete Streptokinase aus dem zellfreien Medium gewonnen wird.
15. Verfahren nach Punkt 1, 9 und 14, **gekennzeichnet dadurch**, daß die DNA von pMF5 mit **EcoRI** linearisiert, anschließend mit **EcoRI**-gespaltener pSM7-DNA ligiert und die so erhaltene **skc**⁺-rekombinante bifunktionelle Plasmidchimäre (shuttle-Plasmid) pSM752 wahlweise in **S. sanguis**-Stämme, vorzugsweise in **S. sanguis** Challis 6, oder in **E. coli**-Stämme transformiert wird.
16. Verfahren nach Punkt 1 und 6 oder 8 und 14, **gekennzeichnet dadurch**, daß das durch komplette **EcoRI**-Spaltung aus pMF1 oder pMF2 herausgelöste 6.4 kb-**skc**⁺-Fragment in den singulären **EcoRI**-Ort von Plasmid pUB110 inseriert und das so erhaltene **skc**⁺-rekombinante Plasmid pSM2110 (11.0 kb) in **Bacillus subtilis**-Stämme, vorzugsweise in **B. subtilis** 168, transformiert wird.
17. Verfahren nach Punkt 1, 6, 8 oder 9 und 14, **gekennzeichnet dadurch**, daß das durch komplette **PstI**-Spaltung aus pMF1, pMF2 oder pMF5 herausgelöste 2.5 kb-**skc**⁺-Fragment in den singulären **PstI**-Ort des Plasmids pE194 oder des Plasmids pL603 inseriert wird und die so erhaltenen **skc**⁺-rekombinanten Plasmide pSM5194 (6.2 kb) bzw. pSM5603 (7.3 kb) in **B. subtilis**-Stämme, vorzugsweise in **B. subtilis** 168, transformiert werden.

Hierzu 4 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Klonierung eines Gens für Streptokinase (**skc**) und den Einsatz von heterologen Produzenten für die bakterielle Produktion des Genprodukts durch submerse Fermentation. Das Anwendungsgebiet der Erfindung liegt somit in der mikrobiologisch-pharmazeutischen Forschung und Industrie.

Streptokinase ist ein Protein, das von beta-hämolytischen Streptokokken gebildet und als potentieller Virulenzfaktor ins Medium exportiert wird. Heterolog nennen wir erfindungsgemäß solche Streptokinase-produzierenden Bakterien, die anderen taxonomischen Einheiten als die bisher bekannten Produzenten angehören, normalerweise nicht Streptokinase produzieren, aber durch gezielte genetische Manipulation diese Fähigkeit erworben haben.

Streptokinase katalysiert die Konversion des enzymatisch inerten Plasminogen des Blutplasmas zum enzymatisch aktiven Plasmin, das durch begrenzte Proteolyse das Fibrinnetzwerk von Blutgerinnseln solubilisiert. Auf dieser fibrinolytischen Reaktion basiert der Einsatz von Streptokinase in der klinischen Medizin als bedeutsames Therapeutikum zur Behandlung thromboembolischer Gefäßverschlüsse (venöse und arterielle Thrombosen, Thrombophlebitiden, Lungenembolien, Gehirnembolien etc.).

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bisher konnte Streptokinase nur durch submerse Fermentation von geeigneten Stämmen des Genus **Streptococcus** gewonnen werden. Solche Streptokinaseproduzenten sind unter den pathogenen Streptokokken der serologischen Gruppen A, B, C, G und F weit verbreitet. Zur industriellen Streptokinaseherstellung sind bevorzugt Stämme der Species **S. equisimilis** (serologische Gruppe C) eingesetzt worden. Ihre Streptokinasen werden z. B. unter den Handelsnamen Kabikinasen (Kabi, Schweden), Streptase (Behringwerke AG, BRD) und Awelysin (AWD, DDR; vgl. Patentschrift DD 111096) vertrieben. Verfahren zur Optimierung der Streptokinaseproduktion in der industriellen Mikrobiologie haben sich praktisch nur auf die Verbesserung der Milieubedingungen während der Fermentation und der Reinigungsschritte bei der Streptokinasegewinnung aus den Kulturmedien beschränkt (s. Patentschrift DD 126342). Eine Optimierung der Produktionsstämme selbst mit konventionellen genetischen Methoden konnte dabei nicht erfolgen, da nichts über die Genetik der Produzenten im allgemeinen und die genetischen Grundlagen der Streptokinasynthese im besonderen bekannt ist.

Seit einigen Jahren werden im zunehmenden Maße von der Grundlagenforschung entwickelte Methoden zur in-vitro-Rekombination von DNA ausgenutzt, um Gene zu isolieren, die für industriell und medizinisch wichtige Proteine kodieren. Diese Gene können in vitro in Vektor-DNA-Moleküle gespleißt und im Verbund mit diesen in geeignete homologe oder heterologe Wirte überführt werden. Dort können sie sich im Verein mit dem Vektor replizieren und unter bestimmten Bedingungen auch zur Expression gelangen. Organismen, die solche klonierten Gene tragen, sind viel besser einer genetischen Manipulation zugänglich als die Wildtypen, die als Genspender dienen. Freie Wahl der Wirtsorganismen, Kontrolle des Gen-Dosiseffekts und Manipulation von Regulationsdeterminanten sind nur einige Faktoren, die dann zur Optimierung der Genproduktsynthese ausgenutzt werden können. Da das Streptokinasegen vorher nicht kloniert worden ist, ist auch die Streptokinasynthese durch heterologe Organismen bisher nicht möglich gewesen.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht in der Isolierung eines Streptokinasegens (**skc**) und in der Bereitstellung von heterologen Wirten, die nach Aufnahme dieses **skc**-Gens Streptokinase zu produzieren vermögen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Erfindung basiert auf der Aufgabe, ein gentechnisches Verfahren zur Klonierung des Streptokinasegens zu entwickeln und heterologe Mikroorganismen zur Produktion des Genproduktes bereitzustellen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe in einer Reihe von experimentellen Schritten wie folgt gelöst:

1. Auswahl des Genspenders

Als Gendonor wird ein **Streptococcus** der serologischen Gruppe C, vorzugsweise ein **S. equisimilis** und insbesondere Stamm H46A, verwendet. Letztgenannter Stamm, der als guter Streptokinaseproduzent bekannt ist, wird bereits zur technischen Herstellung des Proteins eingesetzt (Awelysin).

2. Isolierung der Total-DNA von H46A

Der bevorzugt eingesetzte Gendonor H46A ist plasmidfrei, so daß das Streptokinasegen in der genomischen DNA gesucht werden muß. Die DNA wird nach Zellyse mittels Mutanolysin, Pronase und Natriumdodecylsulfat durch Extraktion mit Phenol/Chloroform vorgereinigt, mit Äthanol präzipitiert und anschließend weiter durch Zentrifugation im Ethidiumbromid-Cäsiumchlorid-Dichtegradienten gereinigt. Die so gewonnene DNA hat eine durchschnittliche Fragmentgröße von 50 Kilobasenpaaren (kb).

3. Anlage einer Genbibliothek für H46A

Die DNA des bevorzugt herangezogenen Gendonors H46A wird partiell mit einem kleinschneidenden Restriktionsenzym, das mit den Insertionsorten im verfahrensgemäß verwendeten Bakteriophagenvektor kompatibel ist, vorzugsweise mit **M6ol** oder **Sau3AI**, verdaut und nach Zentrifugation durch einen Sucrosegradienten größenfraktioniert. Gradientenfaktionen, die Verdauungsfragmente im Größenbereich zwischen 4 und 15 kb enthalten, werden vereinigt, und diese DNA wird mit einem an sich bekannten Bakteriophagen-Vektor, vorzugsweise mit Lambda L47, der zuvor komplett mit einer das zentrale stuffer-Fragment entfernenden und kompatible Enden liefernden Endonuclease, vorzugsweise mit **BamH1**, gespalten wurde, ligiert. Die Ligation wird in an sich bekannter Weise mit DNA-Ligase, vorzugsweise T4-DNA-Ligase, durchgeführt.

Das Ligationsgemisch wird mittels eines an sich bekannten Lambda-DNA-Verpackungssystems in vitro in Lambda-Partikeln verpackt und durch Differenzialplattierung auf Wirtsstämmen, vorzugsweise auf **E. coli**-Wirtsstämmen, insbesondere auf WL87 oder WL95 (P2), auf den Gehalt an rekombinanten Lambdaphagenpartikeln geprüft, in denen das zentrale **BamH1**-stuffer-Fragment des Vektors durch H46A-DNA-Segmente ersetzt ist. Dabei ist die Ausbeute an rekombinanten Phagen mindestens 20fach größer als die Zahl rekombinanter Phagen, die auf Grund theoretischer Berechnungen zur Repräsentation des gesamten H46A-Genoms im Labdapräparat notwendig ist, das aus Ligation und in-vitro-Verpackung resultiert.

Die Primärklonierung der Gendonor-DNA, so daß der H46A-DNA, in dem vorzugsweise eingesetzten Vektor Lambda L47, der Plaques bildet, hat den Vorteil, daß die Etablierung der Genbank nicht lebensfähige Wirtszellen erfordert, wie dies bei der Verwendung von Cosmid- oder Plasmidvektoren notwendig wäre. Lange DNA-Segmente von H46A können so kloniert werden, selbst wenn sie sich schädlich auf die Lebensfähigkeit von **E. coli**-Zellen auswirken.

4. Nachweis von rekombinanten Vektorphagen, die **skc** enthalten

Die Lambdaphagenpartikeln der Genbank werden unter Standardbedingungen vorzugsweise auf einem Rasen von WL95(P2), der selektiv rekombinante Partikeln anzeigt, zur Plaquebildung gebracht und anschließend mit einem Indikatormedium überschichtet, das Agar oder Agarose, Casein (Magermilch) oder Fibrin und humanes Plasminogen enthält. Phagen, die **skc** enthalten, bilden Plaques, die von einer klaren Verdauungszone, hervorgerufen durch streptokinasevermittelte Plasminogenaktivierung, umgeben sind. Solche caseinolytischen/fibrinolytischen Plaques lassen sich nicht nachweisen, wenn dem Assaysystem Plasminogen entzogen wird — ein vorläufiger, guter Beweis für die Identität des in **E. coli**-Zellen durch Phageninstruktion gebildeten Genprodukts. Das Assaysystem produziert ferner keinen background, d. h. WL95(P2)- und WL87-Zellen sowie Wildtypvektorphagen sind unter den verwendeten Assaybedingungen nicht im geringsten caseinolytisch/fibrinolytisch.

5. Subklonierung von **skc** in Plasmidvektoren von **E. coli**

Die rekombinanten Vektorphagen, die **skc** enthalten, darunter die als λ L47Askc bis λ L47Kskc bezeichneten rekombinanten Phagenklone, insbesondere Klon λ L47Eskc, werden durch wiederholte Einzelplaqueisolierung gereinigt und vorzugsweise auf WL87 vermehrt, so daß hochtitrige Lysate zur DNA-Extraktion entstehen.

Die DNA von so erhaltenen **skc**⁺-rekombinanten Phagenstämmen, darunter insbesondere von Phagenklon λ L47Eskc, wird anschließend mit den Restriktionsenzymen **HindIII**, **EcoRI** und **BamH1** sowie Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Die Insert-DNA-Fragmente werden dann durch Verdauung mit **HindIII** oder **EcoRI**, die mit je 2 Orten die **BamH1**-Orte des jeweiligen Primärklons flankieren, herausgeschnitten und in Plasmidvektoren, vorzugsweise in **E. coli**-Vektoren und insbesondere in pBR322 oder pACYC184, subkloniert. Partielle **HindIII**-Verdauung der DNA eines Primärklons (λ L47Eskc) liefert nach Insertion der partiell verdauten Fragmente in den singulären **HindIII**-Ort von pBR322, nach Transformation von **E. coli** HB101 und nach screening auf caseinolytische Transformantenkolonien unter Verwendung der Casein-Plasminogen-Überschichtungstechnik das Streptokinaseprodukt determinierende Plasmid pMF1 (11.8 kb). pMF1 trägt im **HindIII**-Ort ein 7.4 kb langes Insert, das selbst aus 4 **HindIII**-Subfragmenten von der Größe 2.65, 2.60, 1.90 und 0.2 kb besteht, die durch partielle **HindIII**-Verdauung von pMF1 kartiert werden können.

Nach Erhalt von Plasmid pMF1 wird das Verfahren in der Weise fortgeführt, daß aus diesem Plasmid durch Enzym **EcoRI** oder durch Enzym **PstI** jeweils ein **skc**⁺-Fragment herausgetrennt und erneut in **E. coli**-Plasmidvektoren mit singulären Orten für **EcoRI** und/oder für **PstI**, vorzugsweise in pACYC184, pBR322 oder pLa2311, subkloniert wird.

Durch **EcoRI**-Verdauung von pMF1 entsteht eine 6.4 kb langes Fragment, das u. a. 29 Basenpaare des Vektors pBR322 und als wesentliche H46A-DNA-Segmente die kompletten 2.65 kb plus 1.90 kb langen **HindIII**-Fragmente von pMF1 enthält. Aus der Insertion dieses Fragments in den singulären **EcoRI**-Ort des **E. coli**-Vektors pACYC184 resultieren die neuen Plasmide pMF2I und pMF2II (jeweils 10.4 kb), die ebenfalls Streptokinaseproduktion in HB101 determinieren.

Durch komplette **PstI**-Verdauung von pMF1 entsteht u. a. ein 2.5 kb langes Fragment, das Teile der 2.65 und 1.90 kb langen **HindIII**-Fragmente von pMF1 enthält. Insertion dieses Fragments in den singulären **PstI**-Ort von pBR322 liefert die Plasmide pMF5I und pMF5II (jeweils 6.9 kb), die ebenfalls Streptokinaseproduktion durch HB101 spezifizieren.

6. Identifizierung des **skc**-Genprodukts in **E. coli**

Die folgenden Beweise zeigen eindeutig, daß die Klonierungsprozedur zur Isolierung des Streptokinasegens (und nicht eines Proteasegens) geführt hat, das in **E. coli** so exprimiert wird, daß ein Protein mit einer für Streptokinase charakteristischen Substrat- und Immunospezifität synthetisiert wird:

- Die caseinolytische/fibrinolytische Reaktion aller Primär- und Subklone ist abhängig von der Anwesenheit von humanem Plasminogen;
- Ersatz von humanem Plasminogen durch bovines Plasminogen im Assaysystem, das bovines Fibrin als Substrat enthält, führt zu Fibrinolyse nur dann, wenn entsprechende Präparate von **E. coli**-Klonen, die **skc** enthalten, vor der Testung mit humanem Plasminogen vermischt werden (H46A-Streptokinase aktiviert nicht Rinderplasminogen);
- Diisopropylfluorophosphat, ein Inhibitor von Serienproteasen, hemmt nicht die Plasminogenaktivierung durch entsprechende Präparate der **E. coli**-Klone oder Subklone unter Bedingungen, die zu einer kompletten Inhibition der Caseinolyse durch Trypsin führen;

- Im Immunodiffusionstest liefern **E.coli**-Streptokinase und authentische Streptokinase aus H46A eine Identitätslinie aus der Präzipitationsreaktion mit einem gegen authentische Streptokinase produzierten Antikörper. Ferner neutralisiert dieser Antikörper die caseinolytische/fibrinolytische Aktivität von geeigneten Präparaten, die aus **E.coli**-Klonen gewonnen wurden, die **skc** tragen. Diese spezifischen serologischen Reaktionen erfolgen nicht mit ähnlichen **E.coli**-Präparaten, die sich von Stämmen mit den insertfreien Vektoren ableiten.

7. Synthese von Streptokinase in **E.coli**

Als Ergebnis der Subklonierungsprozeduren, die zu den Plasmiden pMF2 sowie pMF5 führten, wurden HB101-Klone erhalten, die das **EcoRI**- bzw. **PstI**-Insert in beiden möglichen Orientierungen (I und II) im Vektor tragen. Für beide Plasmide liegt dabei der Befund vor, daß sie Streptokinasesynthese unabhängig von der Orientierung von **skc** determinieren.

Hieraus folgt, daß in beiden Plasmiden der eigene Promoter des **skc**-Gens anwesend ist und vom Transkriptionssystem der Wirtszellen auch benutzt wird.

Interessanterweise wurde in diesem Zusammenhang gefunden, daß der Expressionsgrad von **skc** in pMF5 in einer Orientierung (II) größer ist als in der anderen (I). Dies legt nahe, daß sich die Transkription von einem oder beiden Promotern des Beta-Lactamasegens (**bla**) von pBR322 in Orientierung II in die **skc**-Genregion hinein erstreckt und damit zu dessen erhöhter Expression führt. Aus diesem Befund läßt sich auch das **skc**-Gen in beiden Plasmiden bezüglich der Richtung seiner Transkription (Lage des Promoters) orientieren.

Bezüglich der Lokalisation von Streptokinase in **E.coli skc**-Kulturen wurde gefunden, daß auf festem Nährboden der Nachweis der Streptokinaseproduktion mittels der Casein-Plasminogen-Überschichtungstechnik nicht die vorherige Lysierung der Kolonien erfordert, d. h. die **E.coli**-Zellen sind in der Lage, signifikante Streptokinasmengen in das umgebende Medium zu sekretieren und somit Caseinolysehöfe zu produzieren. Die Größe dieser Höfe ist mit denen vergleichbar, die Kolonien von **S.equisimilis** H46A unter ähnlichen Bedingungen produzieren. Streptokinaseausschüttung ins Medium erfolgt auch bei Kultivierung von **skc**⁺-**E.coli**-Klonen in Flüssigkeitskultur, wie sich aus Aktivitätsbestimmungen von zellfreien Kulturüberständen oder -filtraten ergibt. Da **E.coli**-Zellen normalerweise nicht zur Sekretion von klonierten Fremdproteinen ins Medium befähigt sind, verdient ihre Befähigung zu Streptokinasesekretion besondere Beachtung. Da sie durch pMF2- und pMF5-tragende Klone erfolgt, die **skc** in beliebiger Orientierung enthalten, ist anzunehmen, daß die Streptokinase-Spezifische Signalsequenz für den Proteinexport eine entscheidende Rolle spielt und dieser nicht durch die entsprechenden Signalsequenzen der **bla** bzw. **cat**-Gene der beiden Vektoren vermittelt wird, in die kloniert wurde.

Zellfraktionierung nach Standardmethoden ergibt für Streptokinase-produzierende **E.coli**-Kulturen ferner, daß das Protein in jungen stationären (gesättigten) Kulturen zusätzlich im periplasmatischen Raum und im Cytoplasma anwesend ist. In solchen Kulturen ist die Gesamtstreptokinaseaktivität im typischen Fall wie folgt verteilt: 17% im zellfreien Kulturmedium, 30% im Periplasma und 52% im Cytoplasma. Kulturen, die ≥ 8 Stunden nach Erreichen der stationären Phase weiter unter Schüttelbedingungen bebrütet werden, lassen gewöhnlich periplasmatische Streptokinaseaktivität vermissen, besitzen aber noch cytoplasmatische Aktivität. Offenbar wird bei verlängerter Kultivierung periplasmatisch lokalisierte Streptokinase komplett ins Medium sezerniert.

8. Klonierung von **skc** in anderen **E.coli**-Stämmen und anderen Bakterienspecies

Die Verfügbarkeit der rekombinanten Plasmide pMF1, pMF2 und pMF5 sowie definierter H46A-DNA-Segmente, die **skc** enthalten, erlaubt die Einführung des Gens in zusätzlich **E.coli**-Stämme sowie in andere geeignete Vektoren und Klonierungswirte, darunter vorzugsweise in die folgenden:

— Andere **E.coli**-Stämme:

Die **E.coli**-Stämme 294 und CP78 lassen sich, wie in der weiteren Ausgestaltung des Verfahrens gefunden wurde, unter Standardbedingungen direkt mit pMF1, pMF2 und pMF5 transformieren, wobei für Ap^r bzw. Tc^r zu selektieren ist.

Solche Stämme sind ähnlich wie HB101 zur Streptokinaseproduktion befähigt, und für sie gelten hinsichtlich der Lokalisation des Proteins qualitativ die gleichen Verhältnisse wie für HB101.

Da im **E.coli**-Wirtssystem offenbar die Hauptmenge der Streptokinase zellgebunden im Peri- oder Cytoplasma verbleibt, ist für die praktische Gewinnung des Proteins ein Produktionsstamm von Interesse, der effektiv ohne den Einsatz aufwendiger Fraktionierungsprozeduren und kostspieliger Chemikalien lysiert werden kann. Hierfür eignet sich HB101 (Lambda cl857), ein Lambda-lysogener Abkömmling von HB101, dessen Prophage dank der Anwesenheit eines thermolabilen Repressors durch Hitzeschock induzierbar ist.

Dieser Stamm wird bei 30°C mit obigen Plasmiden transformiert. Flüssigkeitskulturen der Transformanten werden in der späten logarithmischen Wachstumsphase dann zur Inaktivierung des Lambdarepressor für 15 Minuten unter kräftigem Schütteln einer Temperatur von 42°C bis 43°C ausgesetzt und anschließend 2 Stunden bis 3 Stunden bei 37°C bis 38°C weiter bebrütet. In dieser Nachbebrütungszeit erfolgt Zellyse und damit die Ausschüttung der Streptokinase ins Medium. Die Möglichkeit Lambda-vermittelter Zellyse wird vorteilhaft mit der Reklonierung des 6.4kb-**EcoRI**-Fragments aus pMF1 bzw. aus pMF2 (I oder II) sowie des 2.5kb-**PstI**-Fragments wahlweise aus pMF1, pMF2 (I oder II) bzw. aus pMF5 (I oder II) in den jeweils singulären **EcoRI**- bzw. **PstI**-Ort des **E.coli**-Expressionsvektors pLa2311 verbunden, so daß die neuen, mit pSM22311 bzw. pSM52311 bezeichneten Plasmide entstehen. Die genannten Klonierungsorte liegen bei pLa2311 stromabwärts vom starken p_L-Promoter des Phagen Lambda. Nach Temperaturinduktion von Lambda tritt p_L in Funktion und vermittelt außerordentlich hohe Transkriptionsraten, wenn die **skc**-tragenden Inserts in der richtigen Orientierung in den jeweiligen Klonierungsort gespleißt sind.

— **Streptococcus sanguis** (Challis):

Bei **S.sanguis** (Challis) handelt es sich um den klassischen transformierbaren Streptokokkenstamm der serologischen Gruppe H, der als Wildtyp Streptokinase-negativ ist. Aus der für ihn existierenden Plasmidvektorfamilie mit singulärem **EcoRI**-Ort, in den Fremd-DNA kloniert werden kann, wird für den verfahrensgemäßen Zweck pSM7 (6.4kb) ausgewählt, ein Vektor, für den auf Erythromycin-haltigen Medien selektiert werden kann. Das 6.4kb-**EcoRI**-Fragment von pMF1 bzw. von pMF2 (I oder II) wird in den **EcoRI**-Ort von pSM7 inseriert und das resultierende neue Plasmid, bezeichnet als pSM720, unter Standardbedingungen zur Transformation von Challis, vorzugsweise von Challis 6, benutzt.

Eine weitere Variante zur Einführung von **skc** in *Challis* besteht darin, daß pMF5 (I oder II) mit **EcoRI** linearisiert, **EcoRI**-gespaltene pSM7-DNA mit pMF5 (I oder II) ligiert und zur Transformation von *Challis* oder *E.coli* HB101 eingesetzt wird. Das resultierende neue Plasmid, bezeichnet als pSM752, erweist sich als eine bifunktionelle Chimäre zwischen pBR322 und pSM7, die **skc** weiterhin im **PstI**-Ort von pBR322 enthält, aber die zusätzliche wichtige Eigenschaft der Replikation in *E.coli* plus *S.sanguis* besitzt (shuttle-Plasmid). pSM752 spezifiziert Streptokinasesynthese durch *E.coli* HB101 und durch *S.sanguis* *Challis* 6.

— *Bacillus subtilis*:

Für diesen Organismus, der neben *E.coli* bekanntlich die größte Rolle als alternativer prokaryotischer Klonierungswirt spielt, existiert eine große Zahl von Plasmidvektoren, von denen sich einige, die singuläre **EcoRI**-, **PstI**- oder **HindIII**-Orte besitzen, unmittelbar für die Reklonierung von **skc** und die nachfolgende Einführung in *B.subtilis*, vorzugsweise in Stamm 168, durch Transformation eignen.

Vorteilhaft wird insbesondere in pGR71 oder in pC194, die über singuläre **HindIII**-Orte verfügen, nach partieller Verdauung von pMF1-DNA ein Segment, bestehend aus den 2,65 + 1,90kb **HindIII**-Fragmenten, gespleißt, so daß die neuen, mit pSM171 bzw. pSM1194 bezeichneten Plasmide entstehen;

in pUB110 mit singulärem **EcoRI**-Ort wird nach **EcoRI**-Verdauung von pMF2 das 6,4kb-**EcoRI**-Fragment gespleißt, so daß das neue, mit pSM2110 bezeichnete Plasmid entsteht;

in pE194 oder in pPL603 mit singulären **PstI**-Orten wird das 2,5kb-**PstI**-Fragment von pMF5 gespleißt, so daß die neuen, mit pSM5194 bzw. pSM5603 bezeichneten Plasmide entstehen.

Vorteile der Erfindung

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird die Gewinnung einer Streptokinase durch submerse Fermentation von Bakterien möglich, die nicht zur Spezies *Streptococcus equisimilis* gehören und nicht wie diese pathogen sind.

Das Klonierungsverfahren ermöglicht weiterhin die Produktion einer mit Sicherheit unikaligen Streptokinase, d. h. die Gewinnung eines Gemisches von Isostreptokinasen, bedingt durch das Vorliegen multipler Streptokinase-Gene, ist ausgeschlossen.

An Bakterienproteine, die wie Streptokinase parenteral verabreicht werden, müssen Anforderungen höchster Reinheit gestellt werden, die sich insbesondere auf Toxinfreiheit und die Abwesenheit von Pyrogenen beziehen. Die bisherigen Streptokinaseproduzenten bilden Hämolyse, Streptodornase, Hyaluronidase, Diphosphopyridinnucleotidase etc., die im Zuge der Reinigungsschritte ebenso wie die schlecht definierten pyrogenen Substanzen abgetrennt werden müssen.

Diese störenden Substanzen fallen nicht bei der Fermentation mit den verfahrensgemäß eingesetzten heterologen Produzenten an. Ihre Verwendung eröffnet weiterhin diverse Möglichkeiten zur genetischen Manipulation der technischen Streptokinaseproduzenten.

Ausführungsbeispiele

I. Primärklonierung des Streptokinasegens (**skc**)

I1. Isolierung der Total-DNA von *Streptococcus equisimilis* H46A

H46A wird über Nacht bei 37°C in 100 ml brain heart infusion broth als Standkultur bebrütet. Die Zellen werden auf der Zentrifuge zweimal mit eiskaltem TES-Puffer (0,05 M NaCl, 0,03 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,005 M EDTA) gewaschen und in 3 ml einer TES-Lösung, die 25% (w/v) Glucose enthält, resuspendiert. Die Zellsuspension erhält 0,5 ml einer TES-Lösung mit 0,25 M EDTA, 1 ml einer TES-Lösung mit 10 mg Mutanolysin und wird 30 Minuten bei 37°C bebrütet. Danach wird 0,5 ml einer Pronaselösung zugegeben, die aus der 30 Minuten langen Selbstverdauung des Enzyms (5 mg/ml TES) bei 37°C resultiert. Nach weiteren 30 Minuten werden die Zellen durch Zugabe von 2 ml einer 2%igen Natriumdodecylsulfatlösung in TES komplett lysiert, das Lysat erhält 1,75 ml einer 5 M NaClO₄-Lösung in TES, und die resultierende Mischung wird so oft mit Phenol/Chloroform (2:1) extrahiert, bis die Interphase kein Protein zeigt. Die DNA wird dann aus der wäßrigen Phase durch Zugabe von 2 Volumen Äthanol gefällt, mit 70%igem Äthanol gewaschen und in 5 ml TES-Puffer gelöst. Zu dieser DNA-Lösung werden 5,4 g CaCl₂ und 1 ml einer Ethidiumbromidlösung (4 mg/ml TES) gegeben (Brechungsindex = 1,3910), bevor sie 60 Stunden bei 37 000 rpm in einem Festwinkelrotor bei 15°C zentrifugiert wird. Die DNA sammelt sich in einer Bande, wird durch Punktur des Röhrchens geerntet, mit Isopropanol zur Entfernung des Ethidiumbromids extrahiert, gegen TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA) dialysiert und in einer Konzentration von ca. 1 mg/ml bei 4°C aufbewahrt. Elektrophorese durch ein 0,4%iges Agarosegel mit nativer Lambda-DNA als Standard zeigt, daß die so präparierte H46A-DNA eine durchschnittliche Fragmentgröße von 50 kb besitzt.

I2. **Sau3A**-Verdauung der H46A-DNA

In jedem von 20 parallel laufenden Ansätzen werden 10 µg H46A-DNA mit 0,4 U **Sau3A** für 20 Minuten bei Raumtemperatur in einem Reaktionsvolumen von 30 µl partiell verdaut. Die Verdauungsgemische werden vereinigt und mit Phenol extrahiert. Die DNA wird mit Äthanol präzipitiert, in 300 µl TE gelöst und 21 Stunden bei 25 000 rpm und 18°C durch einen linearen 10- bis 40%igen Sucrosegradienten (37 ml in 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM EDTA) zentrifugiert. Gradientenfractionen von 1 ml werden gesammelt und Aliquote durch Agarose (0,5%)-Gelelektrophorese mit ungespaltener, **Sall**- und **HindIII**-vertrauter Lambda-DNA als Größenstandards analysiert. Gradientenfunktionen, die DNA-Fragmente im Größenbereich von 4 bis 15 kb enthalten, werden vereinigt, gegen TE dialysiert und durch wiederholte Extraktion mit Butanol konzentriert. Die DNA wird mit Äthanol präzipitiert und schließlich zu einer Konzentration von 1 mg/ml in TE gelöst.

I3. Ligation

Die 4 bis 15 kb langen **Sau3A**-Fragmente der H46A-DNA werden in den Bakteriophagen-replacement-Vektor Lambda L47 gespleißt, dessen DNA nach Standardmethoden präpariert oder kommerziell erworben werden kann. Dazu wird 1 µg Lambda L47-DNA komplett mit **Bam**H1 gespalten und nach Phenolextraktion in einem Reaktionsvolumen von 10 µl mit 1 µg H46A/**Sau3A**-DNA und 2 U T4-DNA-Ligase für 16 Stunden bei 12°C ligiert.

I4. In-vitro-Verpackung der ligierten DNA

Das Ligationsgemisch wird in vitro durch Anwendung eines Verpackungssystems für Lambda-DNA, das nach Standardmethoden präpariert oder kommerziell erworben werden kann, in Lambdaphagenpartikeln verpackt. Der Größenbereich der H46A-DNA/Sau3A-Fragmente (4 bis 15 kb) entspricht dabei der Verpackungskapazität des Vektors für die **BamH1**-Orte. Der Einsatz von 4 µl Ligationsgemisch für die Verpackung liefert 10⁵ Plaque-bildende Lambdaphagen (PFU) auf einem Wirtsrasen von *E.coli* WL87, der die Gesamtphagenausbeute anzeigt (Verpackungseffizienz: 10⁵ Total-PFU/0,4 µg Vektor-DNA). Plattierung eines aliquoten Volumens auf *E.coli* WL95(P2), der bekanntlich ein selektiver Wirt für rekombinante Phagen ist, zeigt, daß 20% der durch in-vitro-Ligation und Verpackung erhaltenen Gesamtphagenanzahl rekombinante Genome trägt, in denen das zentrale **BamH1**-Fragment des Vektors durch H46A-DNA ersetzt ist. Werden 10 zufallsgemäß ausgewählte rekombinante Phagenstocks nach **HindIII**-Verdauung ihrer DNA durch Gelelektrophorese analysiert, ergibt sich für sie eine durchschnittliche H46A-DNA-Insertgröße von ca. 10 kb. (Im Vektor flankieren 2 **HindIII**-Orte die beiden **BamH1**-Orte, so daß Insert-DNA mit **HindIII** herausgeschnitten werden kann.) Unter der Voraussetzung, daß das H46A-Genom eine Größe von etwa 2000 kb hat, läßt sich aus der Kenntnis der Insertgröße nach der Beziehung

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)}$$

(P = Wahrscheinlichkeit für die Anwesenheit einer beliebigen Sequenz;

f = Fraktioneller Anteil des Gesamtgenoms in einer rekombinanten Phagenpartikel)

die Zahl N der rekombinanten Lambda L47-Partikeln berechnen, die zur vollständigen Repräsentation des H46A-Genoms in der Phagenbank notwendig ist. Für P = 99% und f = 10 kb/2000 kb ergibt sich N ≈ 900. Diese theoretische Betrachtung zeigt, daß die Zahl der aus Ligation und in-vitro-Verpackung resultierenden rekombinanten Phagen mehr als 20mal größer als N ist (nämlich ca. 20000).

I5. Nachweis von Streptokinase-bildenden Plaques

Phagen aus der H46A-Genbibliothek werden mit WL95(P2) als Indikatorstamm so nach der Doppelschichtmethode auf Standardmedien ausgeplattet, daß sich innerhalb von 6 Stunden bis 8 Stunden bei 37 °C maximal 300 Plaques pro Platte ausbilden. Die Platten werden mit 9 ml einer 50 mM Tris-HCl (pH 8,1) — 150 mM NaCl-Lösung überschichtet, die 90 mg Agar oder Agarose, 100 µg Humanplasminogen und 1 ml Magermilch enthält. Nach einer minimalen Bebrütungszeit von 2 Stunden bei 37 °C entwickeln solche Frequenzen Caseinolysehöfe, die von Phagenpartikeln mit dem Streptokinasegen herrühren (Abb. 1). Unter insgesamt 8360 ausgeplatteten rekombinanten Phagen wurden 10 gefunden, die caseinolytische Plaques bilden. Die Häufigkeit solcher Phagen in der Genbank (1/836) ist mit der theoretischen Erwartung für die Häufigkeit des Streptokinasegens auf der Grundlage der unter I4. angestellten Betrachtungen konsistent.

Die caseinolytische Reaktion erfolgt nicht, wenn die Überschichtung mit einem Medium erfolgt, dem Humanplasminogen fehlt — ein Beweis dafür, daß sie auf Plasminogenaktivierung zurückzuführen ist.

I6. Restriktionsanalyse der skc-tragenden Lambda L47-Rekombination

Die 10 caseinolytischen Plaques wurden isoliert, durch je 2 weitere Einzelplaqueisolierungen gereinigt und in flüssigem Standardmedium auf WL87 propagiert, so daß 10 hochtitrige stock-Lysate (≥ 10¹⁰ PFU/ml) mit den Klonbezeichnungen Lambda L47A-Kskc resultierten. Aus je 10 ml dieser Lysate werden die Phagen durch Zentrifugation sedimentiert und nach Standardmethoden zur Extraktion ihrer DNA benutzt. Die DNA der Klone wird durch **HindIII**-Verdauung und anschließende Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Abb. 2 zeigt das **HindIII**-Verdauungsmuster der 10 Klone einschl. des insertfreien Vektors. Es ergibt sich, daß die Insertgrößen der Klone zwischen 7 und 15 kb liegen und die Klone E und G identisch sind. (Dies wird bestätigt durch Analyse ihrer **EcoRI**- und **BamH1**-Verdauungsmuster). Das hervorragende Merkmal der **HindIII**-Muster ist ein 1,90 kb-Fragment, das allen Klonen gemeinsam ist. Ein zweites **HindIII**-Fragment von 2,65 kb ist 5 Klone (incl. E und G) gemeinsam. Wie sich im weiteren zeigte, enthalten diese DNA-Segmente Sequenzen, die die Streptokinasebildung determinieren.

II. Subklonierung von skc

Die Subklonierung von **skc** wird in den Plasmidvektoren pBR322 oder pACYC184 von *E.coli* vorgenommen. Als Donor-DNA wird die DNA des Primärklons Lambda L47Eskc verwendet. Die Subklonierung erfolgt in 3 Stufen, die sukzessive zu einer Verkürzung des H46A-DNA-Fragments führen, welches **skc** enthält.

II1. Konstruktion von pMF1

In getrennten Reaktionsansätzen mit einem Gesamtvolumen von je 10 µl werden 1 µg Lambda L47Eskc-DNA partiell und 0,5 µg pBR322-DNA komplett mit **HindIII** gespalten. Die beiden Verdauungsgemische werden vereinigt, mit Phenol extrahiert, mit Äthanol präzipitiert und in einem Volumen von 10 µl 8 Stunden bei 12 °C ligiert. Zellen des durch Hitzeschock (42 °C) induzierten *E.coli*-Stammes HB101 (λcl857) werden nach der Standard-Ca-Cl₂-Methode zur Transformation kompetent gemacht, und 3 × 10⁹ kompetente Zellen werden in einem Reaktionsvolumen von 100 µl mit 10 µl des Ligationsgemisches transformiert. Die transformierten Zellen werden in 5 ml Luria-Bertani (LB)-Medium 1 Stunde bei 30 °C zur Expression der Ampicillin-Resistenz (Ap^r) bebrütet und dann in geeigneten Verdünnungen auf LB-Agar + 50 µg/ml Ap ausgeplattet. Nach Übernachtsbebrütung bei 30 °C wurden 260 Ap^r-Transformantenkolonien durch Abimpfung auf LB-Agar + 12,5 µg/ml Tetracyclin (Tc) auf Tc-Sensitivität (Tc^s) geprüft, und 37 erwiesen sich als Tc^s. Von diesen ist anzunehmen, daß sie Target-DNA im **HindIII**-Ort enthalten, der im Promoter des Tc^r-Gens liegt, der durch DNA-Insertion inaktiviert wird. Die Ap^rTc^s-Klone werden zur Koloniebildung auf LB-Agar ausgeplattet und mit der Casein-Plasminogen-Überschichtungsmethode auf Streptokinaseproduktion getestet. Es wurde ein caseinolytischer Klon gefunden. (Wird ein ähnliches Experiment mit Lambda L47Eskc-DNA ausgeführt, die komplett mit **HindIII** gespalten wurde, werden unter mehr als 500 Klone mit dem Phänotyp Ap^rTc^s keine gefunden, die caseinolytisch sind. Dies deutet darauf hin, daß das **skc**-Gen mindestens einen **HindIII**-Ort besitzt).

Aus einer LB-Kultur des caseinolytischen Klons wird nach der Standard-Klarlysatsmethode Plasmid-DNA präpariert und der Restriktionsanlage mit folgenden Enzymen unterworfen: **HindIII**, **AvaI**, **BamH1**, **EcoRI**, **PstI** und **Sall**. Die Daten, die die partielle **HindIII**-Verdauung, die komplette Verdauung mit den übrigen Enzymen und die Doppelverdauung mit Enzymkombinationen, wie **HindIII** + **BamH1**, **HindIII** + **EcoRI**, **HindIII** + **PstI** und **EcoRI** + **Sall** lieferten, wurden zur Konstruktion der Restriktionskarte

des Plasmids benutzt, die in Abb. 3 dargestellt ist. Das Plasmid, das die Bezeichnung pMF1 erhielt, hat eine Größe von 11,8 kb und besteht aus pBR322 mit einem 7,4 kb-Insert im **HindIII**-Ort. (Ein Fragment derselben Größe läßt sich in partiellen **HindIII**-Verdauungsgemischen von Lambda L47Eskc-DNA identifizieren, was anzeigt, daß das pBR322-Insert keine vermischten **HindIII**-Fragmente der H46A-DNA enthält.) Wichtig ist der Befund, daß pMF1 die kompletten 2,65 und 1,90 kb-**HindIII**-Fragmente des Primärklons benachbart enthält. Im Vergleich zum DNA-Gehalt des letzteren fehlen pMF1 die beiden Vektor-Arme und das 2,0 kb-**HindIII**-Fragment des Primärklons (s. Abb. 2).

Der *E.coli*-Klon, der pMF1 enthält, wurde in der Hinterlegungsstelle des Zentralinstituts für Mikrobiologie und experimentelle Therapie (ZIMET), Beutenbergstr. 11, Jena, 6900 unter der Bezeichnung HB101 (λ cl857, pMF1) und der Registriernummer ZIMET 10953 hinterlegt.

II2. Konstruktion von pMF2

Die Restriktionskarte von pMF1 (Abb. 3) erlaubte die Formulierung einer klaren Strategie für die weitere Subklonierung von **skc**. Sie richtete sich im nächsten Schritt auf die Klonierung des großen **EcoRI**-Fragments (6,4 kb) von pMF1, das die 2,65 und 1,90 kb **HindIII**-Fragmente komplett enthält (s. Abb. 3).

Zu diesem Zweck werden in getrennten 10 μ l-Ansätzen 1 μ g pMF1-DNA und 0,5 μ g pACYC184-DNA komplett mit **EcoRI** gespalten. Die Verdauungsgemische werden vereinigt, zur Inaktivierung von **EcoRI** 15 Minuten bei 65°C gehalten und 12 Stunden bei 12°C in einem Gasvolumen von 40 μ l ligiert. Mit dem Ligationsgemisch wird *E.coli* HB101 transformiert, auf LB-Agar + 12,5 μ g/ml Tc ausgeplattet, und Tc-Transformantenkolonien werden weiter auf Sensitivität gegenüber Chloramphenicol (Cm^s) geprüft. (Insertion in den **EcoRI**-Ort von pACYC184 inaktiviert das Cm^r -Gen *cat*).

Es wurden viele Transformanten mit dem Phänotyp $\text{Tc}^r\text{Cm}^s\text{skc}^+$ gefunden, die alle caseinolytisch sind. Sechs dieser Klone wurden zur Isolierung von Plasmid-DNA benutzt, die mit **EcoRI** und **AvaI** analysiert wird. **EcoRI**-Verdauung zeigte an, daß die 6 Klone ein 10,4 kb Plasmid besitzen, das aus dem linearisierten Vektor (4,0 kb) und dem erwarteten 6,4 kb-Insert besteht.

AvaI-Verdauung wird benutzt, um das Insert im Vektor zu orientieren (Vektor und 6,4 kb-Fragment tragen je einen asymmetrisch zu den **EcoRI**-Orten liegenden **AvaI**-Ort). Vier der 6 Klone trugen ein Plasmid, das **Aal**-Junktionsfragmente von 5,3 und 5,1 kb liefert; dieses Plasmid wird als pMF2I bezeichnet. Zwei Klone trugen ein Plasmid, das **AvaI**-Junktionsfragmente von 6,9 und 3,5 kb liefert; dieses Plasmid erhält die Bezeichnung pMF2II. Beide Plasmide determinierten Streptokinaseproduktion ohne feststellbare quantitativen Differenzen. Ihre Restriktionskarten mit relevanten Spaltorten sind in Abb. 4 dargestellt.

Ein *E.coli*-Klon, der pMF2I enthält, wurde in der o.g. Hinterlegungsstelle (ZIMET) unter der Bezeichnung BH101(pMF2I) und der Registriernummer ZIMET 10951 hinterlegt.

II3. Konstruktion von pMF5

PstI-Verdauung von pMF1 liefert 4 Fragmente von der Größe 6,0, 2,5, 2,2 und 1,1 kb (s. Abb. 3). Von diesen enthält das 2,5 kb-Fragment Teile der 2,65 kb und 1,90 kb-**HindIII**-Fragmente. Das 2,5 kb-**PstI**-Fragment wird in den singulären **PstI**-Ort von pBR322 ligiert und mit dem Ligationsgemisch wird *E.coli* HB101 zu Tc^r transformiert. Circa 30% der Tc^r -Transformanten waren Ap^sskc^+ . Aus 4 Klonen mit dem Phänotyp $\text{Tc}^r\text{Ap}^s\text{skc}^+$ wird die Plasmid-DNA isoliert und mit **PstI**, **HindIII** und **EcoRI** analysiert. **EcoRI** lieferte erwartungsgemäß ein Fragment von der Größe 6,9 kb. **PstI**-Verdauung liefert 2 Fragmente, von denen das 4,4 kb-Fragment den inearisierten Vektor und das 2,5 kb-Fragment das Insert repräsentiert. **HindIII**-Verdauung wird zur Orientierung des Inserts benutzt. Drei der 4 Klone tragen ein Plasmid, das **HindIII**-Junktionsfragmente von 5,3 und 1,6 kb liefert; dieses Plasmid wird als pMF5I bezeichnet. Der verbleibende Klon trägt ein Plasmid, das **HindIII**-Junktionsfragmente von 4,4 und 2,5 kb liefert; dieses Plasmid erhält die Bezeichnung pMF5II. Beide Plasmide determinieren Streptokinaseproduktion, doch ist sie, wie unter IV1. gezeigt werden wird, in den Klonen, die pMF5II enthalten, stärker ausgeprägt. Die Restriktionskarten von pMF5II mit relevanten Spaltorten sind in Abb. 4 dargestellt.

Ein *E.coli*-Stamm, der pMF5II enthält, wurde in o.g. Hinterlegungsstelle (ZIMET) unter der Bezeichnung HB101(pMF5II) und der Registriernummer ZIMET 10952 hinterlegt.

II4. Transformation der *E.coli*-Stämme HB101, 294 und CP78 mit **skc**-tragenden nativen Plasmiden

Nach Standardmethoden werden 3×10^9 kompetente Zellen von HB101, 294 und CP78, die in je 100 μ l Medium enthalten sind, mit ca. 0,5 μ g nativer Plasmid-DNA von pMF1 und pMF5II transformiert. Transformanten werden auf LB-Agar + 50 μ g/ml Ap bzw. 12,5 μ g/ml Tc selektiert und entwickelte sich mit einer Frequenz von der Größenordnung 10^5 (Stämme HB101 und 294) bzw. 10^3 (Stamm CP78) pro μ g Plasmid-DNA. Test auf Streptokinasebildung mittels der Casein-Plasminogen-Überschichtungsmethode zeigt an, daß alle Transformantenkolonien zur Streptokinaseproduktion befähigt sind. Ein Stamm, der pMF5II enthält, wurde in o.g. Hinterlegungsstelle (ZIMET) unter der Bezeichnung CP78 und der Registriernummer ZIMET 10954 hinterlegt.

III. Reklonierung von **skc** in *Streptococcus sanguis*

In getrennten 10 μ l-Ansätzen werden 0,5 μ g pMF5II-DNA und 1 μ g pSM7-DNA komplett mit **EcoRI** gespalten. Die Verdauungsgemische werden vereinigt, zur Inaktivierung von **EcoRI** 15 Minuten bei 65°C gehalten und 12 Stunden bei 12°C in einem Gesamtvolumen von 40 μ l mit 1 Einheit T4-DNA-Ligase behandelt. Mit dem Ligationsgemisch werden 3×10^9 kompetente Zellen von *E.coli* HB101 in einem Reaktionsvolumen von 100 μ l transformiert. Die transformierten Zellen werden in 5 ml LB-Medium 1 Stunde bei 37°C zur Expression der Antibiotikum-Resistenz (Tc^r) bebrütet und dann auf LB-Agar + 12,5 μ g/ml TC ausgeplattet. Nach Übernachtbebrütung bei 37°C wurde gefunden, daß 1,5% der Tc^r -Transformanten gleichzeitig pSM7-determinierte Erythromycin-Resistenz (Em^r) (Wachstum auf $\geq 100 \mu\text{g/ml Em}$) tragen und zur pMF5II-determinierten Streptokinaseproduktion befähigt sind. Die Plasmid-DNA eines Klons mit dem Phänotyp $\text{Tc}^r\text{Em}^r\text{skc}^+$ wurde unverdaut und nach Spaltung mit **EcoRI** und **PstI** durch Elektrophorese im Agarosegel analysiert. Es lag eine einzige Plasmidspecies, bezeichnet als pSM752, vor. pSM752 (13,3 kb) ist ein Kointegrat zwischen pMF5II und pSM7, und liefert erwartungsgemäß nach **PstI**-Verdauung zwei Fragmente mit Größen von 10,8 kb und 2,5 kb (pSM7 hat keinen **PstI**-Ort) und nach **EcoRI**-Verdauung zwei Fragmente mit Größen von 6,9 kb (pMF5II) und 6,4 kb (pSM7). —

Zur Übertragung von pSM752 in den Challis-Stamm von *S.sanguis* werden 1,8 ml einer nach Standardmethoden kompetent gemachten Kultur (ca. 8×10^7 Koloniebildner/ml) mit 0,1 μ g pSM752-DNA (in 10 μ l TE-Puffer) versetzt und 3 Stunden bei 37°C in Transformationsmedium bebrütet. Die transformierte Kultur wird auf brain-heart-infusion (BHI)-Agar + 10 μ g/ml Em zur Selektion von Plasmidtransformanten und auf antibiotikumfreiem BHI-Agar zur Bestimmung der Gesamtzellzahl ausgeplattet. Nach Übernachtbebrütung bei 37°C wurde eine Transformationsfrequenz von ca. 10^{-5} gefunden. Die Transformantenkolonien wurden mit der Casein-Plasminogen-Überschichtungstechnik auf Streptokinasebildung getestet, und alle erwiesen sich als Streptokinase-positiv. Von einer Transformantenkolonie wurde nach wiederholter Subkultivierung auf BHI-Agar + 10 μ g/ml Em

und Einzelkolonieisolierung der Stamm *S. sanguis* Challis (pSM752) etabliert. Ein Vergleich der Durchmesser der durch Challis (pSM752)- und H46A-Kolonien auf BHI-Agar im Streptokinasetest gebildeten Caseinolysehöfe ergab, daß die Streptokinaseaktivität der Challis-Kolonien der der H46A-Kolonien vergleichbar war. Dies zeigt erstens, daß das *skc*-Gen von *S. equisimilis* in *S. sanguis* unter Kontrolle seines eigenen Promotors exprimiert wird (der Beta-Lactamase-Promotor wird von Challis nicht erkannt). Zweitens unterliegt das Expressionsniveau einem Gen-Dosiseffekt (das Replikationsvermögen von pSM752 in Challis ist auf die pSM7-Komponente zurückzuführen, und pSM7 ist ein Multikopie-Plasmid). Der charakterisierte Challis-Klon wurde in o. g. Hinterlegungsstelle (ZIMET) unter der Bezeichnung Challis (pSM752) und der Registriernummer ZIMET 10959 hinterlegt.

IV. Bestimmung der Streptokinaseproduktion durch *skc*-tragende *E. coli*-Stämme

IV1. Demonstration, daß pMF5II ein höheres Expressionsniveau von *skc* spezifiziert als pMF5I

LB-Agar-Platten werden so mit verdünnten Kulturen von HB101(pMF5I) und HB101(pMF5II) beimpft, daß sie nach 18stündiger Bebrütung bei 37°C bis 100 Kolonien pro Platte entwickeln. Die Platten werden mit Streptokinase-Assaymedium überschichtet, und nach 8stündiger Bebrütung bei 37°C wird an je 100 Kolonien der Durchmesser der von ihnen produzierten Caseinolysezonen gemessen. Ein repräsentatives Experiment ergab für HB101(pMF5I)-Kolonien eine Verdauungshofgröße von $6,51 \pm 0,28$ mm und für HB101(pMF5II)-Kolonien eine Hofgröße von $7,35 \pm 0,30$ mm. Statistische Analyse auf der Grundlage des t-Tests zeigt an, daß die Differenz im Expressionsniveau des *skc*-Gens hochsignifikant ist ($P \gg 0,99$). Zwei Wiederholungen dieses Experiments lieferten ähnliche Resultate.

IV2. Lokalisation der Streptokinase von *skc*-tragenden *E. coli*-Stämmen

Wie bereits oben (II1.–4., IV1.) wiederholt implizit festgestellt, scheiden *E. coli*-Kolonien, deren Zellen das *skc*-Gen tragen, Streptokinase ins Medium aus. Der Streptokinase-Nachweis auf festem Medium erfordert also nicht die vorherige Lysierung der Kolonien. Dieses Phänomen ist für Kulturen des nicht-lysogenen Stammes HB101(pMF1) in Abb. 5 illustriert. Sekretion der Streptokinase erfolgt nicht nur durch lebende Zellen ins feste Medium, sondern auch bei Kultivierung im flüssigen LB-Medium. Unabhängige 5 ml-HB101(pMF1)-Kulturen, die mit je einer Einzelkolonie beimpft und bis zur Sättigung (3×10^9 Zellen/ml) unter Schüttelbedingungen bei 37°C bebrütet worden sind, enthalten 8 bis 100 Streptokinaseeinheiten/ml zellfreies Medium, wie sich ergibt, wenn das Protein im Lochtest im Casein-Plasminogen-Agarmedium durch Vergleich mit den bekannten Aktivitäten von Verdünnungen einer authentischen Streptokinase-Stammlösung bestimmt wurde. Unter der Annahme, daß authentische Streptokinase (spezifischer Aktivitäten des verwendeten Präparats: 55000 U/mg Protein) und *E. coli*-Streptokinase dieselbe spezifische Aktivität haben, entspricht diese sezernierte Streptokinase menge 0,15 bis 1,82 mg/l Kulturmedium oder 600 bis 7000 Streptokinase-molekülen, die von einer Zelle sezerniert werden (M_r der authentischen Streptokinase: 47,4 K).

Streptokinase ist in *E. coli*-Kulturen nicht nur extrazellulär lokalisierbar, sondern auch im Periplasma und Cytoplasma der Zellen, wie sich aus Aktivitätsmessungen an entsprechenden Zellfraktionen ergibt. Das periplasmatische Protein wird nach der „Minishock“-Prozedur erhalten, indem 3×10^9 Zellen 2 mal in 1 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,3)-30 mM NaCl gewaschen, in 0,2 ml 30 mM Tris-HCl (pH 3,7)-20 % (w/v) Sucrose-0,1 mM EDTA resuspendiert, in dieser Lösung 10 Minuten bei Raumtemperatur gehalten und dann durch Zentrifugation sedimentiert werden. Das Zellsediment wird in 0,6 ml eiskalter 0,5 mM MgCl₂-Lösung resuspendiert und 10 Minuten bei 0°C geschüttelt (osmotischer Schock). Die Zellsuspension wird zentrifugiert, und der Überstand enthält als osmotische Schockflüssigkeit die Proteine des periplasmatischen Raumes. Das Zellsediment wird in 1 ml 0,5 mM MgCl₂-Lösung resuspendiert und bei 0°C mit 4 intermittierenden 20 sec-Pulsen von Ultraschall behandelt. Nach Abtrennung unlöslicher Rückstände durch Zentrifugation enthält der Überstand die cytoplasmatischen Proteine. Wird eine junge stationäre Kultur (3×10^9 Zellen/ml) von HB101(pMF5II) dieser Fraktionierung unterworfen und werden die Streptokinaseaktivitäten der oben definierten Kulturfraktionen bestimmt, so ergeben sich folgende Aktivitäten pro ml Kultur: Zellfreier Überstand: 8 U (17%), periplasmatische Fraktion: 14 U (30%), cytoplasmatische Fraktion: 24,5 U (52%). Alte stationäre Kulturen, die mehr als 8 Stunden nach Erreichen der Zellsättigung weiter bebrütet werden, lassen gewöhnlich die periplasmatische Aktivität vermissen, zugunsten des Anstiegens der extrazellulären Aktivität, besitzen aber noch cytoplasmatische Aktivität.

IV 3. Ausschüttung der Streptokinase ins Medium durch Hitzeinduktion von HB101(λcl857, pMF1)-Kulturen

Wird eine von zwei Parallelkulturen von HB101(λcl857, pMF1) in LB-Medium nach dem Erreichen einer Zellzahl von ca. 5×10^8 /ml durch 15 Minuten lange Bebrütung bei 42°C hitzeinaktiviert und darauf 2 Stunden bei 37°C zur Zelllysierung nachbebrütet, so hat der durch Zentrifugation gewonnene zellfreie Kulturüberstand eine mindestens 15fach höhere Streptokinaseaktivität als der entsprechende Überstand der nicht durch Hitzeschock lysierten Parallelkultur.

V. Serologische Identifizierung von *E. coli*-Streptokinase

Die Verfügbarkeit eines von Dr. Dieter Gerlach (ZIMET) hergestellten und durch Affinitätschromatographie gereinigten monospezifischen Antikörpers gegen authentische Streptokinase von H46A ermöglichte die Ausführung von serologischen Tests, die die Identität von *E. coli*-Streptokinase und H46A-Streptokinase anzeigen. Im Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony, ausgeführt auf 1%igen Agaroseplatten in Barbitallpuffer, entwickeln beide eine fusionierende Präzipitationsbande mit dem Antikörper. Im Lochplatten-Diffusionstest auf einem Casein-Plasminogen-Agarmedium wurde ferner gefunden, daß der Antikörper die Plasminogen-aktivierende Wirkung von *E. coli*-Streptokinase ebenso neutralisiert wie diejenige der authentischen Streptokinase (Abb. 6).

Abbildungslegenden

Abb. 1. Nachweis von rekombinanten Lambda L47-Phagen, die das Streptokinasegen tragen. Die Photographie zeigt caseinolytische Plaques des Klon Lambda L47Kskc nach Plattierung auf *E. coli* WL87 als Indikator.

Abb. 2. Analyse der DNA der Primärklone Lambda L47A-Kskc durch HindIII-Verdauung. 1: λL47; 2: λL47A_{skc}; 3: λL47B_{skc}; 4: λL47C_{skc}; 5: λL47D_{skc}; 6: λL47E_{skc}; 7: λL47F_{skc}; 8: λL47G_{skc}; 9: λL47H_{skc}; 10: λL47I_{skc}; 11: λL47K_{skc}; 12: λ-Wildtyp; 13: pBR322 verdaut mit AvalI

Abb. 3. Restriktionskarte von pMF1. Die dicke Linie repräsentiert die pBR322-Vektor-DNA.

Abb. 4. Restriktionskarten von pMF2 und pMF5. Die Orientierungen der Inserts sind durch Angabe einiger Restriktionsorte definiert. Dicke Linien repräsentieren Vektor-DNA. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung des *cat*-Gens in pACYC184 und des *bla*-Gens in pBR322 an.

Abb. 5. Caseinolysehöfe produziert durch HB101(pMF1)-Kolonien nach Überschichtung mit Casein-Plasminogen-Agar.

6. Neutralisierung der caseinolytischen Aktivität von *E.coli*-Streptokinase durch einen monospezifischen Antikörper gegen authentische Streptokinase von H46A.

Obere Reihe von links nach rechts: 2,5, 5, 10, 20 U gereinigte H46A-Streptokinase; mittlere Reihe von links nach rechts: H46A-Streptokinase (5 U) + Streptokinase-Antikörper, H46A-Streptokinase (5 U) + Nicht-Immunserum, H46A-Streptokinase (5 U); untere Reihe von links nach rechts: Kulturüberstand von HB101(pBR322), Kulturüberstand von HB101(pMF1) + Streptokinase-Antikörper, Kulturüberstand von HB101(pMF1) + Nicht-Immunserum, Kulturüberstand von HB101(pMF1).

Abb. 1

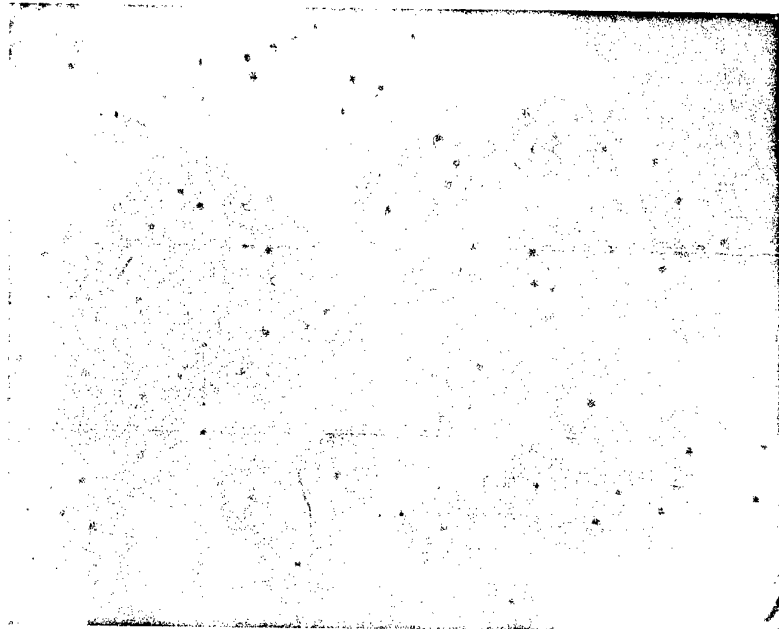


Abb. 3

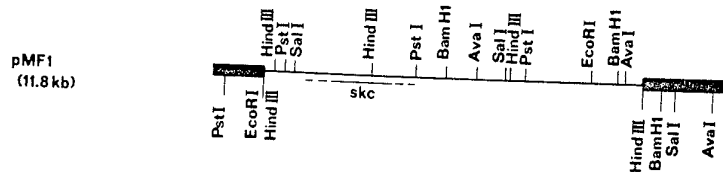


Abb. 2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

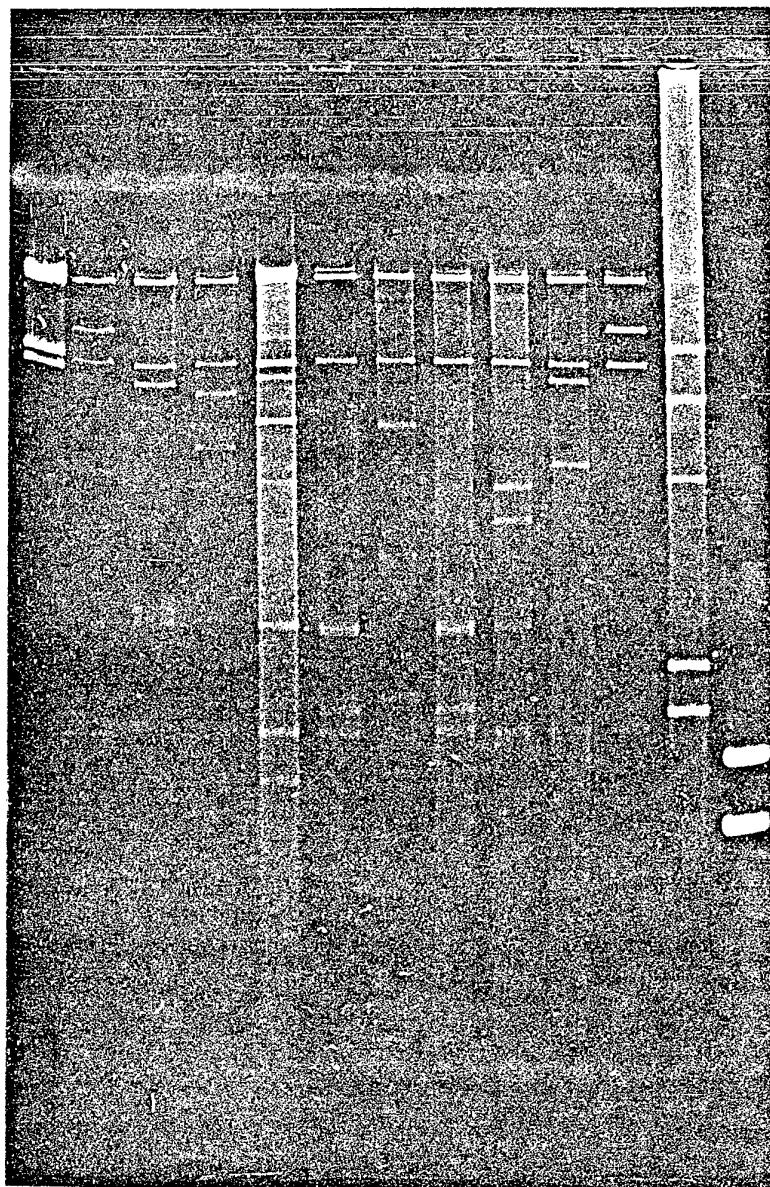
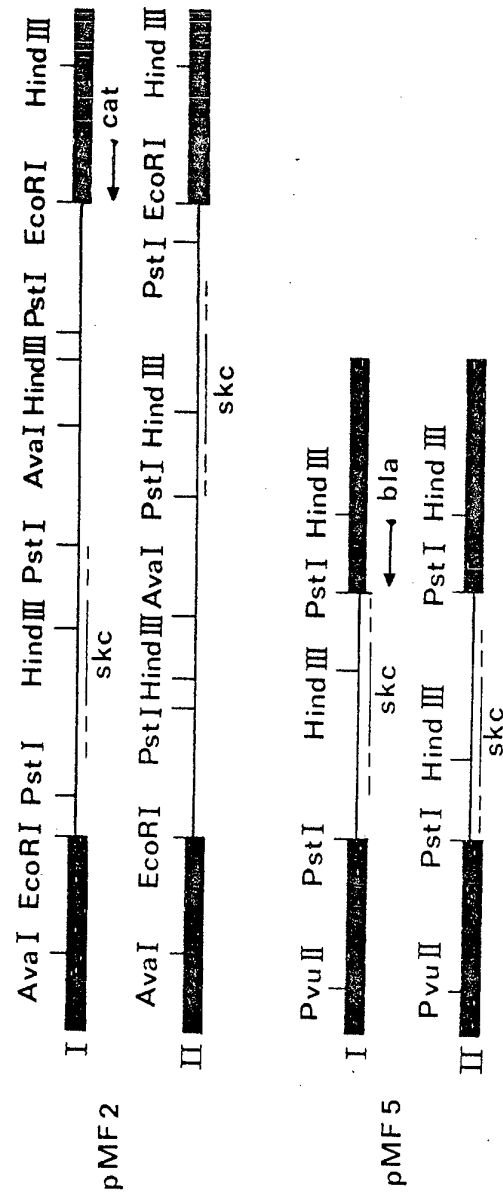


Abb. 4



26.JAN.1984*145933

Abb. 5

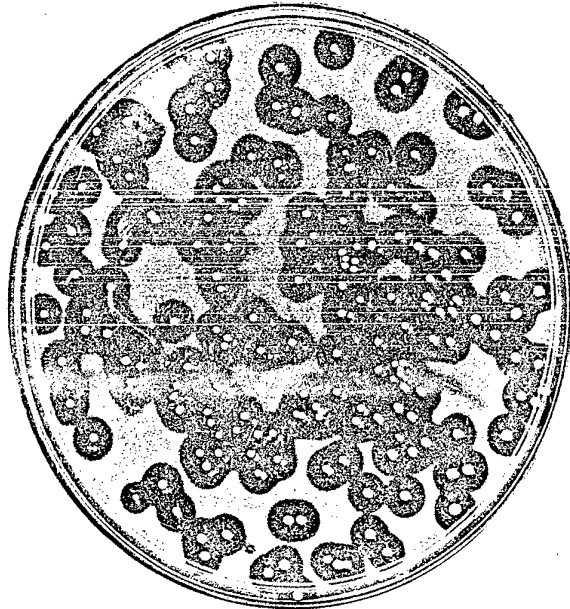


Abb. 6

