

A találmány tárgya eljárás szuperoxid diszmutáz klónozására és mikroorganizmusokban történő kifejezésére és acetilezett polipeptid előállítására.

A szuperoxid diszmutáz („SOD”) valójában különböző enzimek sokaságát jelenti, melyek a legtöbb élő szervezetben megtalálhatók. Az emlősökben egyik funkciója az, hogy elbontja a szuperoxidot. Ez az anyag természetes úton keletkezik a fagocitózis folyamán. A szuperoxid diszmutáz családok jellemzése azon alapszik, hogy milyen fém kapcsolódik az enzimhez. A fém lehet vas, mangán, réz és réz-cink. Például a marhamáj eredetű szuperoxid diszmutáz klinikai felhasználásra kerül, mivel emlősöknél – beleértve az embereket is – mint gyulladásgátló szer alkalmazható. Egyéb haszna a következőkben van: – eltávolítja a szuperoxid anionokat, amelyek akkor keletkeznek, amikor egy gazdaszervezet ki van téve különböző szuperoxid-indukáló hatásoknak, pl. sugárzásnak, paraquat (gyomirtószert) mérgezésnek, stb.; – bizonyos degeneratív betegségek, ilyen pl. az emfizéma (emphysema), kezelése és megelőzése; – élelmiszer-tartósítás; és hasonló területek.

Fentiek alapján fontos, hogy fiziológiai szempontból elfogadható szuperoxid diszmutázból állandó ellátást biztosítsunk, különösen in vivo felhasználás céljára, gyulladásgátlószerként, vagy más terápiás célokra. Humán alkalmazás a homológ enzim használata lenne a legkedvezőbb, a lehetséges immunválasz minimumra való csökkentése érdekében. A rekombináns DNS technológia alkalmazásával lehetőség van arra, hogy olyan hatékony terméket állítsunk elő, amely a szuperoxid diszmutáz kívánt biológiai aktivitásával, azaz immunológiai és enzimatisz aktivitásával rendelkezik.

A humán vörösvérsejt Cu–Zn szuperoxid diszmutáz aminosav szekvenciáját Jabusch és munkatársai [Biochemistry, 19., 2310–2316. (1980)], valamint Barra és munkatársai [FEBS Letters, 120, 53–55. (1980)] közölték. A marha Cu–Zn SOD leírása Steinman és munkatársai [J. Biol. Chem. 249, 7326–7338. (1974)] közleményében található. Egy SOD–1 cDNS klónról Lieberman-Hurwitz és munkatársai [Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 79, 2808–2811. (1982)] tudósítanak, melynek során humán szuperoxid-diszmutáz cDNS-t klónoznak, és alkalmaznak próbaként különböző humán és eger sejtek által kódolt mRNS-nél. A cikk a Down-szindróma molekuláris mechanizmusát tárgyalja, és nem tesz említést élesztőben történő SOD-termelésről, ezenkívül az általuk alkalmazott baktériumok nem fejezték ki a klónozott DNS-t és a szuperoxid-diszmutáz polipeptidet sem termelték. Hogy az iniciációs kodon feletti (upstream) transzlátatlan régió változtatása milyen hatással van a transzláció hatékonyságára, erről a következő közlemények tájékoztatnak: Gheysen és munkatársai, Gene, 17, 55–63. (1982); Thummel és munkatársai, J. Virol. 37, 683–697. (1981); Matteucci és Heyneker, Nucl. Acids Res., 11, 3113–3121. (1983). A J. Bacteriol. 1983, 155(3), 1078–87. cikke E. coli mangán szuperoxid diszmutáz klónozását és genetikai térképét ismerteti. Ez a gén a találmány szerinti réz/cink szuperoxid diszmutáztól lényegesen eltérő szerkezetű

proteint kódol. A 131 843 számú európai nyilvánossághozatali irat szarvasmarha és humán növekedési hormont kifejező specifikus vektorokat ismert. Megemlíti ugyan, hogy ezen vektorok számos protein, köztük szuperoxid diszmutáz kifejezésére is alkalmasak, azonban csak a bGH-t és hGH-t kódoló gén klónozását ismertetik, a szuperoxid diszmutáz klónozását és kifejezését nem.

Az alábbiakban röviden ismertetjük az ábrákat.

Az 1. ábrán a DNS linker szekvenciákat mutatjuk be felhasználásuk folyamat-diagramjával; a 2. és 3. ábra folyamat-diagramjai a plot5/SOD előállítását ábrázolják; a 4. ábrán a humán SOD cDNS kódoló szála (5'→3') és a képződött transzlációs terméknek a szekvenciája látható.

Az 5. ábrán az alább következő leírás szerint izolált humán SOD-gén szekvenciáját mutatjuk be.

A 6. ábrán az alábbi leírás szerint izolált humán SOD-gén restrikciós térképét ábrázoljuk.

A találmány olyan módszerekre és anyagokra vonatkozik, amelyek felhasználása lehetővé teszi humán Cu–Zn szuperoxid diszmutáz („hSOD”) biológiai aktivitásával rendelkező polipeptidek hatékony expresszióját. Az eljárás folyamán egy olyan DNS szekvenciát („hSOD-gén”) alkalmazunk, amely a hSOD aminosav szekvenciájának lényeges részét kódolja és össze van kapcsolva egy transzlációt indító régióval. Ez a régió optimalizálja az expressziós gazdaszervezetben történő kifejeződést. A hSOD gént, gazdaszervezetben történő kifejeződése érdekében, megfelelő vektorba építjük be olyan alkalmas körülmények mellett, amelyek oly módon biztosítják a szekretálódást, hogy a SOD terméket az extracelluláris közegből kinyerhessük.

A találmány ezenkívül olyan módszerekre és anyagokra is vonatkozik, amelyek segítségével a hSOD polipeptidek N-terminális acetilezése elvégezhető. Itt az acetilezés a polipeptidek és proteinek aminosav-terminálásához történő addíciót jelent, ellentétben azzal, amikor az aminosav oldalláncokat – például a lizint – módosítjuk, ami a természetben is megfigyelhető. A polipeptidek és proteinek acetilezése számos különböző ok miatt hasznos. Amikor a polipeptid természetes körülmények között acetileződik – ez történik a citoplazma eredetű hSOD-dal – akkor azok az expressziós módszerek, amelyek magukba foglalják az acetileződést, fogják a kívánt természetes struktúrával és konformációval rendelkező terméket eredményezni. Ahol a termék gyógyszerként és/vagy in vitro vagy in vivo diagnosztikumként kerül alkalmazásra, az acetilezett anyagnak minimális lesz, vagy megszűnik immunogén hatása gazdaszervezetnek történő beadása és/vagy biológiai anyagokkal való kapcsolata esetén. Ezenkívül az acetilezett polipeptidek valószínűleg sokkal stabilabban és rezisztensebbek a proteázok lebontó hatásával szemben, és ezért tovább megmaradnak a sejten, vérben és a test- és szövetnedvekben.

A hSOD polipeptid strukturális génje –5' végén – egy acetilációs szignál szekvenciát tartalmaz, s ez a szignál szekvencia készíti az expressziós élesztő gazdaszervezetet az acetilezésre. Az acetilációs szignál szekven-

cia a polipeptidben lévő első két N-terminális aminosavat is kódolja. Az első aminosav alanin vagy glicin lesz, míg a második aminosav poláris aminosav, rendszerint treonin, szerin vagy aszparaginsav.

Az aminosavak olyan N-terminális aminosavak lehetnek, amelyek a kifejezendő polipeptidben normál körülmények közt is megvannak. Ez a helyzet a hSOD esetében is, ahol az első két aminosav az alanin, illetve treonin. Egyéb olyan természetben előforduló acetilezett proteinek, amelyek élesztőben kifejeződhetnek és acileződhetnek, a következők:

Protein	Eredet	Szignál szekvencia
Citokróm C	Ember, Rhesus majom, kutya, ló stb.	GLY-ASP
Citokróm C	Castor (hód) Sesamum indicum (szezámfű), Phaseolus aureus (arany paszuly)	ALA-SER
Glutaminsav dehidrogenáz	Neurospóra	SER-ASN
Kalmodulin	Disznó	SER-ALA
Miozin (A2 könnyű lánc)	–	SER-PHE
ADH	Drosophila	SER-PHE

A jelen találmány szerinti eljárást, a természetben nem acetilezett formában előforduló polipeptidek és proteinek acetilezésére is fel lehet használni. Az acetilezést el lehet érni úgy, hogy az acetilációs szignál szekvenciát a polipeptid strukturális génjének 5' végéhez kapcsoljuk. Az acetilációs szignál szekvencia legalább két aminosavat határoz meg (lásd fent) és többet is kódolhat, tízet, vagy ennél többet, de előnyösen ötnél kevesebb aminosavat. Kevesebb aminosav hozzáadása rendszerint kedvezőbb, ha polipeptid kívánt aktivitásával való interferenciát vagy az aktivitás elvesztését korlátozni, illetve elkerülni akarjuk. A szignál szekvenciát alkalmas módon szintetizáljuk és hozzákapcsolhatjuk a strukturális génhez jól ismert módszerekkel.

Más módon is hozzáadhatjuk az acetilációs szignál szekvenciát a strukturális génhez, ugyanis a strukturális gén 5'-végét néha úgy is lehet módosítani, hogy a polipeptid első két aminosava közül az egyiket, vagy mindkettőt szubsztituáljuk. Az ilyen módosítást különböző konvencionális módszerekkel hajthatjuk végre. Például: a strukturális gént 5' vége közelében elhasítjuk, hogy a meghatározott számú nukleotidot eltávolítsunk. Ezután egy szintetikus oligonukleotidot kapcsolhatunk a hasítás után visszamaradt kohéziós véghez. Az oligonukleotid helyreállítja és helyettesíti azokat a bázispárokat, amelyek szükségesek a kívánt acetilációs szignál szekvencia előállításához. Ezenkívül például az M13 fágot használhatjuk arra – helyspecifikus mutagenézist alkalmazva –, hogy a strukturális gén 5'-végét megfelelően módosítsuk.

A hSOD előállításához szükségünk van egy olyan DNS szekvenciára, amely hSOD-t határoz meg. Egy

ilyen szekvenciához való jutás egyik módja az, ha hSOD termelő sejtek mRNS-éből származó cDNS-t klónozzunk. Alkalmas módon, humánmájsejteket használhatunk erre a célra. Miután a cDNS-t klónoztuk, amikor is a DNS kódoló szekvencia egy része ismert, kiszűrhetjük a cDNS-t olyan próbaanyagok segítségével, amelyek az aminosav csoportok speciális sorát kódoló nukleotidok összes lehetséges változatát tartalmazzzák. A szekvencia által kódolt csoportoknak a megválasztása bizonyos fokig önkényes, bár a kiválasztott csoportokat rendszerint úgy kell szelektálni, hogy ezzel minimalizáljuk a szintetizálendő különböző szekvenciák számát.

Ami a hSOD-t illeti, előnyösen legalább a 19–24 aminosav csoportot kódoló DNS szekvenciát használhatjuk, de különösen egy olyan próbaanyagot, mely legalább körülbelül 15 bázisból, de nem több mint 20 bázisból áll, legelőnyösebben mintegy 17 bázisból. Ezután restriktions enzimmel a klónokat emésztjük, amelyek a jelzett próbaanyagokkal hibridizálnak, majd a DNS fragmentumokat frakcionáljuk. A hibridizálást megismétljük, előnyösen egy második olyan próbaanyag sorozat használatával, amelyek a hSOD-ban lévő különböző aminosav sorokat kódoló DNS szekvenciával hibridizálnak. Ezek előnyösen a 109–114 aminosav csoportok. Egy vagy több olyan klónt használhatunk, amelyek mindkét próbaanyaggal pozitívnek bizonyulnak, és ezeket használhatjuk fel a hSOD legalábbis egy lényeges részét kódoló cDNS forrásként.

Meglepő módon azt találtuk, hogy a hSOD-ra közölt aminosav szekvenciák a csoportok szignifikáns számában különböztek a cDNS által meghatározott aminosav szekvenciától. Ahol a két közölt szekvencia [Jabusch és munkatársai, Biochemistry, 19, 2310–2316 (1980) és Barra és munkatársai, FEBS Letters, 120, 153–156 (1980)] különbözött, azokat pontos jelöléssel a következőképpen soroljuk fel: 11. csoport, aszparaginsav; 17. csoport, izoleucin; 26. csoport, aszparagin; 49. csoport, glutaminsav; 52. csoport, aszparaginsav; 53. csoport, aszparagin; 92. csoport, aszparaginsav; 98. csoport, szerin (lásd a 4. ábrát).

Míthogy a riboszóma kötő hely és a translációt iniciáló kodon – rendszerint AUG – közti távolságnak a translációra való hatása bizonytalan, jelen eljárás egy olyan módszert ismertet, amellyel változtatni lehet ezt a távolságot és azokat a nukleotidokat, amelyek a riboszóma kötő helyet az iniciációs kodontól elválasztják. A riboszóma kötő hely és az iniciációs kodon közti üres régióban (spacer) rendszerint 6–15, leggyakrabban 6–12 nukleotid van. Mivel az iniciáció helyétől lefelé (downstream) eső bázis szekvencia szintén befolyásolhatja a transláció hatékonyságát, jelen találmány szerinti eljárás módszert ad arra is, hogyan variáljuk a nukleotid szekvenciát (de nem a hosszát) a polipeptid kezdeti néhány 5'-kodonján belül, amennyire ezt a genetikai kód degenerációs lehetőségei megengedik. Ez a variációs lehetőség az iniciáció helyétől lefelé (downstream) 4 kodonig terjedhet, de rendszerint 2 kodonig.

Számos linkert állítunk elő legalább 2 nukleotiddal, rendszerint legalább 3 nukleotiddal, de nem többel, mint 10 nukleotid, általában nem többel, mint 6 nukleotid. Ha a spaceren belül változtatunk, a 4 nukleotidosokat használjuk, hogy ha a polipeptid strukturális génjén belül, akkor a 2, 3 vagy 4 nukleotidos linkereket használjuk, amennyire ezt a genetikai kódredundancia megengedi. Ezenkívül olyan – különböző számú nukleotidot tartalmazó – linkereket is előállítunk, amelyek nemcsak szekvenciájukban, hanem hosszúságukban is különböznek. A hosszúságbeli különbözőséget úgy lehet elérni, hogy a linker szintézise folyamán a hordozó egy részét eltávolítjuk, és ha szükséges, a szintézist a következő lépésnél folytatjuk úgy, hogy különböző hosszúságú linkereket kapjunk. A keverékben a linker hosszát általában legalább egy nukleotidos, s rendszerint 4 nukleotidnál többet nem tartalmaznak.

Ez ott ábrázolható egyszerűbben, ahol a terminális bázisok hiányoznak. Minden lépés után a hordozó egy részét eltávolítjuk, és a szintézist azokkal a fonalakkal folytatjuk, amelyek, amelyek a hordozóhoz vannak kapcsolva, s minden lépésben mind a négy nukleotidról (dNTP = dezoxi-ribonukleozid-trifoszfát) gondoskodunk. Ezeket a szimpla szálat ezután egy olyan szimpla szállal hibridizáljuk, amelynek egy része komplementer ott, ahol a variábilis régió a túllógó szál. Ilyen módon olyan fokozatos linker sorozatot kapunk, amelyekben a túllógó szálnak mind a nukleotid szekvenciája, mind hossza különbözik. Az ezt követő hibridizációs eljárás egy megfelelő pontján, ligáz reakcióval, vagy klónozással betöltjük a túllógó régió(k)at, miáltal olyan kétszálú anyagot kapunk, amelyet a további manipulációba bevonhatunk. Ezt rendszerint és előnyösen in vitro végezzük, például a DNS polimeráz I Klenow fragmentjének segítségével; más esetekben, bizonyos szerkezetek esetén, a túllógó régiót szimpla szálként klónozzuk, és ennek betöltése in vivo, a transzformált vagy transzficiált gazdasejtben megy végbe. Egy komplementer szállal való hibridizálás kivitelezése úgy történhet, hogy a variábilis nukleotid sortól felfelé (upstream) egy 5' szekvenciával rendelkezünk, s ez a terminális szekvenciában lévő szekvenciával komplementer, amelyhez a linkert kell kapcsolni. A hiányzó bázisok helyét ezután in vitro vagy in vivo be lehet tölteni.

A linker szekvenciája magába foglalhatja a riboszóma kötő hely és az iniciációs kodon közti régió legalább egy részét, előnyösen azokat a nukleotidokat, amelyek az iniciációs kodon közelében vannak; a linker ugyancsak tartalmazhatja az iniciációs kodont és a strukturális gén egy részét, a riboszóma kötő helyét és a riboszóma kötő helytől felfelé eső bázisokat, amelyek vagy tartalmazhatják a transzkripció szabályozó szekvenciát, vagy nem.

A linker rendszerint legalább 50 bázisból áll, még inkább legalább körülbelül 20 bázisból, és általában nem haladja meg a körülbelül 200 bázist, rendszerint azonban a 100 bázist. Amikor a linker nagyobb, mint 35 bázisú, akkor olyan 10–35 bázisból álló egyszálú szekvenciákkal szereljük őket össze, amelyek egy

komplementer szálnak csak egy részével homológok, így túllógó szállal bíró komplementer, egymást fedő szekvenciákhoz jutunk, s ezáltal a különböző szimpla szálat hibridizálhatjuk és összekapcsolhatjuk. A hiányos és/vagy különböző hosszúságú túllógó részeket betölthetjük olyan módon, ahogy fent leírtuk, s ezzel a kívánt ragadós (cohesive) és/vagy tompa végű (blunt-ended) linkert előállítottuk.

Amikor a strukturális génben megfelelő restrikciós hely van, rendszerint az iniciációs kodontól lefelé nem több mint 50 bázissal, lehasíthatunk egy olyan fragmentumot, amely a strukturális gént tartalmazza, s ezt összekapcsolhatjuk a linker egy komplementer kohéziós végével, vagy betölthetjük, hogy egy tompa véget kapjunk, és ezt a tompa véget ligáz reakcióval a linker tompa végével kapcsolhatjuk össze. A linkert úgy szerkeszthetjük meg, hogy biztosítsa a strukturális gén teljességét, és hogy az iniciációs kodonnal leolvasási sorrendben legyen.

Ahogy jeleztük, a linker előállításánál egy sor olyan linker keletkezik, amelyek a nukleotidok random-sorozatát tartalmazzák, azaz a kódoló szálaban a négy lehetséges nukleotid mindegyikét (alávetve a genetikai kód megszorító kikötéseinek, ahogy ezt fent jeleztük), s amelyek különböző nagyságúak, hiányozván belőlük egy vagy több olyan nukleotid, amelyek az intermedier régiót határozzák meg, vagy áthidalják a riboszóma kötő helyet és az iniciációs kodont. Ezeket a szimpla szálból előállított linkereket hozzá lehet kapcsolni más szimpla vagy dupla DNS szálakhoz nagyobb terjedelmű linker előállítása céljából, amelyek már nemcsak a riboszóma kötő helyet, hanem a riboszóma kötő helytől felfelé lévő bázisokat is magukba foglalhatják. Azonban a linker viszonylag olyan kicsik is lehetnek, hogy a riboszóma kötő helyen belül, vagy ennek közelében kezdődnek, és az iniciációs kodontól egy lefelé eső helyig vagy a strukturális gén egy belső helyéig terjednek.

Bár a találmány szerinti szerkezetek előállítása érdekében a különbözőhöz fragmentumok összekapcsolásának speciális sorrendje rendszerint nem meghatározó jellegű, mégis előnyös, ha először a strukturális gént kapcsoljuk a linkerhez. Ez a DNS szerkezet nemcsak a strukturális gént fogja tartalmazni, hanem a riboszóma kötő helyet is, és minden olyan további nukleotidot, amelyek a riboszóma kötő helytől felfelé helyezkednek el. Ezenkívül a nukleotidok és a nukleotidok száma igen változó lesz a riboszóma kötő hely és az iniciációs kodon között. A találmány tárgyát képező DNS szerkezetet beépítjük egy megfelelő expressziós vektorba, amely a szóban forgó DNS szerkezet beépítésének helyétől felfelé a szükséges transzkripciót indító szabályozó szekvenciával, valamint a beépítés helyétől lefelé a transzkripciót leállító szabályozó szekvenciával rendelkezik. Így a linker a transzkripciót indító szabályozó szignál szekvenciával együtt az 5'-véget fogja határolni és a 3'-véget a kódoló régió legalább egy részével és a transzkripciót és transzlációt leállító szekvenciákkal együtt. (Az 5'- és 3'-a transzkripció irányára utal.)

Plazmidot vagy vírus DNS-t készítünk elő egy megfelelő gazdasejtbe történő bejuttatáshoz (ez rendszerint együtt történik a különböző túllógó régiók betöltését szolgáló manipulációkkal, annak egy megfelelő fázisában), majd a gazdasejtet transzformáljuk, illetve transzficiáljuk, klónozzuk, a klónokat szélesztjük és egyedi klónokat válogatunk a hatékony kifejeződés elérésére annak alapján, hogy megvizsgáljuk, vajon termeli-e a kívánt terméket, például a hSOD-t. A termék különböző előállítási szintjének meghatározása érdekében szűrendő klónok száma attól függ, hogy a szintetikus linker hossza milyen mértékben változatos és hogy milyen változtatásokat építettünk a szekvenciájába. A szűrendő klónok száma fenti tényezőkkel arányos. Ahogy a találmány ezen megvalósítási módja példázza, a 4 különböző hosszúságú linker mind a 6 nukleotidjában lévő négyszeres szekvencia változat következtében a lehetséges rekombináns szekvenciák száma 5440. Általában legalább néhány száz, előnyösen néhány ezer vagy ennél több klónt szűrünk. A szűrővizsgálatot eredményesen a Western szűrőpapír módszerrel (a termék antitest termelésének vizsgálata) végezzük úgy, hogy a gazdasejt telepeket vagy vírusplakkokat nitrocellulóz szűrőkre, vagy más megfelelő anyagra visszük fel. Vagy elektroforézist végzünk, és a sávok többségénél – minden sáv egy individuális klónnak felel meg – azonnali és közvetlen összehasonlítást tehetünk arra nézve, hogy melyik klónnál a leghatékonyabb az expresszió, mivel a termék sávjának festődési intenzitásából, vagy autoradiográfiás vizsgálattal, vagy a Western-féle szűrőpapír módszerrel ez megállapítható. Ez a szűrővizsgálat rendszerint elegendő, bár több kvantitatív immun-assayt vagy enzim-assayt is alkalmazhatunk, ahol ezek helyénvalók.

Ha kívánt, a szerkezetet átvihetjük egy másik olyan gazdasejtbe, amely az expressziós szerkezetet szabályozó szignáljait felismeri; vagy megváltoztatjuk az expressziós szerkezetet úgy, hogy megfelelő helyeire bevisszük a szükséges szabályozó szignálokat, s ezáltal egy másik gazdasejtben lehetővé tesszük a hatékony kifejeződését.

Ha kívánt, a hSOD gént hozzákapcsolhatjuk szekréciós vezér és processzor szignálokhoz, hogy biztosítsuk a hSOD szekretálódását és termelési folyamatát. Különböző szekréciós vezér és processzor szignálokat ír le a szakirodalom. Lásd például a 4336336, és a 4338397 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat, valamint a tárgygyal összefüggő 522909 (benyújtva 1983. augusztus 12-én) és 488857 (benyújtva 1983. április 26-án) sorszámu szabadalmi bejelentéseket, amelyek jelentős része itt referenciaként szerepel.

Különösen előnyös gazdasejtek az egysejtű mikroorganizmus gazdák, úgy a prokarióta, valamint az eukarióta sejtek, ilyenek a baktériumok, algák, gombák stb. Különösen az *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *Streptomyces* és *Neurospora* szolgálhatnak gazdasejtek gyanánt.

Egysejtű mikroorganizmusokban történő alkalmazásra a vektorok széles változata áll rendelkezésre. A vektorok plazmidokból és vírusokból származtathatók. A vektorok lehetnek egymásolatú, vagy többmásolatú

(kevés, vagy nagyszámú másolattal) vektorok. A vektorok klónozásra és/vagy kifejezésre használhatók. Mivel a vektorokra vonatkozó szakirodalom igen bőséges, sok vektor a kereskedelemből is beszerezhető, a kézikönyvek is foglalkoznak a vektorok leírásával, restrikciós térképeikkel és jellemzőikkel, kimerítő tárgyalásokat itt nem tartjuk szükségesnek. Jól ismert, hogy a vektorok rendszeren markereket tartalmaznak, amelyek a citotoxikus anyagokkal szembeni rezisztenciára, valamint prototrófiára, vagy immunológiai tulajdonságra utalnak, s ezek lehetővé teszik a szelekciójukat. Gyakran több marker van jelen, különböző jellemzőkkel.

A markerekon kívül a vektorok replikációs rendszerrel kell rendelkezzenek és expressziós vektorok esetén rendszerint a transzkripciót szabályozó és leállító szignálokat is tartalmazniuk kell, ilyenek a promoterek, amelyek egyszeres és többszörös tandem promoterek lehetnek. Tartalmazniuk kell továbbá egy mRNS capping szekvenciát, egy TATA boxot, serkentőket, terminátort, poliadenilációs szekvenciát és a terminátorhoz társulva egy vagy több stop kodont. A transzlációhoz gyakran alkalmaznak riboszóma kötő helyet és egy vagy több stop kodont, bár a stop kodonok rendszerint a strukturális génhez kapcsolódnak. Más esetben, ezek a szabályozó szekvenciák jelen lehetnek a strukturális gént tartalmazó egy fragmentumban, amelyet a vektorba beépítünk.

A vektorban rendszerint egy vagy több restrikciós hely van, a strukturális génnek az expressziós vektorba való beépítése szempontjából alkalmas helyzetben. Mielőtt a beépítés megtörtént, a strukturális gént tartalmazó vektort megfelelő gazdasejtbe vezethetjük be, és a klónozott gazda a hSOD hatékony kifejeződését fogja lehetővé tenni.

Bizonyos esetekben a vektorok speciális tulajdonságokkal vannak felruházva, ilyen az expresszió hőérzékenysége, a transzkripciót szabályozó operátorok és aktivátorok és ehhez hasonló. Különösen előnyös lehet, ha a transzkripció szabályozása külső behatásra történik, ilyen a hőmérséklet, induktorok, korepresszorok, stb., és amikor a transzkripciót gyorsítani vagy gátolni lehet oxigén – rendszerint szerves – vegyülettel.

Olyankor, amikor a hSOD intracellulárisan képződik, akkor ha a sejtenyészlet nagy sűrűséget ér el, a sejtek – alkalmas módon – centrifugálással különíthetők el. A sejteket ezután lizáljuk, és a hSOD-t különböző módszerekkel izolálhatjuk, például extrahálással, affinitás kromatográfiával, elektroforézissel, dialízissel, vagy ezek kombinációival. Az esetben, amikor a termék szekretálódik a táptalajba, hasonló módszereket alkalmazhatunk, de a kívánt termék a tápoldat össz-proteinjében lényegesen nagyobb arányban lesz jelen, mint a sejtlizátumban. A képződött hSOD-nak alapjában véve ugyanaz lesz az aminosav szekvenciája, mint a természetben előforduló szuperoxid-diszmutáznak, mégis általában 5-nél kevesebb aminosavban, de rendszerint 2-nél kevesebb aminosavban különböznek egymástól. A rekombináns hSOD („r-hSOD”) alapvetően ugyanazokkal a biológiai tulajdonságokkal rendelkezik, mint a természetben előforduló hSOD. A biológiai tulajdonságok közé tartoznak az im-

munológiai tulajdonságok; az autentikus hSOD-al szembeni antitestek keresztreakcióba lépnek az r-hSOD-al. Ezenkívül a hSOD meghatározására alkalmazott szokásos bioassayk-ben az rhSOD az autentikus hSOD enzim aktivitásával összehasonlításban, ezen aktivitás lényeges hányadának megfelelő (legalább 10%-ának, előnyösen legalább 50%-ának, még előnyösebben legalább kb. 80%-ának) aktivitást fejt ki, a protein tömegét véve alapul. Marklund és Marklund [Eur. J. Biochem., 47, 469–474. (1974)] egy ilyen meghatározási módszert írtak le. A találmány szerinti eljárás megvalósításának módját a következő példákkal szemléltetjük anélkül, hogy a találmány oltalmi körét a példákra korlátoznánk.

A példákban ismertetett klónozási technikák általánosan ismertek és alkalmazottak. A restriktió enzimekkel végzett emésztéseket az enzimgyártó instrukciói és/vagy Maniatis és munkatársai: Molecular Cloning: Cold Spring Harbor 1982 (a továbbiakban: Maniatis) utasításai szerint végeztük. A fragmensek tisztítását preparatív agaróz vagy poliakril-amid gél-elektroforézissel végeztük (Maniatis, 173–178.). Az izolált fragmensek ligálása kereskedelmi ligázokkal (New England Biolabs), a gyártó

instrukciói alapján történt. Ligálás előtt a fragmensek 5'-végeit T4 polinukleotid-kinázzal foszforiláltuk (Maniatis, 123. old.), DNS polimeráz I Klenow-fragmenssel tompa végűvé alakítottuk (Maniatis, 114. old.), vagy alkalikus foszfáttal kezeltük az 5'-foszfát lehasítására (Maniatis, 134. old.).

1. példa

A hSOD cDNS molekuláris klónozása

- 10 Felnőtt ember májából össz RNS-t izolálunk guanidinium-tiocianát/lítium-klorid módszerrel [Cathala és munkatársai, DNA, 2, 329–335 (1983)]. A poliA RNS-t használjuk fel a kétszálú cDNS szintetizálására (Maniatis és munkatársai, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982, p. 213–242), s ezt Sepharose CL4B oszlopon engedjük át, hogy az anyagot a 350 bp-nál (bp = bázispár) hosszabb láncú cDNS-ekben feldúsítsuk [Fiddes és Doodman, Nature, 281, 351–356 (1979)]. A cDNS-t a pBR322-ből származó pUC19 plazmid PstI helyére építjük be. A pUC19-ben a PstI-EcoRI helyet a következő szekvencia helyettesíti:

```

PstI      HinfI      AluI
          GGTGAATCCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTC
          ACGTCCACTTAGGCATTAGTACCAGTATCGACAAAGGACACACTTTAACAATAGGCGAG
HphI      HindIIAluI
          ACAATTCCACACATTATACGAGCCGATGATTAATTGTCAACAGCTCATTTCAGAATATTT
          TGTTAAGGTGTGTAATATGCTCGGCTACTAATTAACAGTTGTTCGAGTAAAGTCTTATAAA
          EcoRI
          GCCAGAACCGTTATGATGCGG
          CGGTCTTGGCAATACTACGCCTTTAA

```

A plazmid kereskedelmi forgalomban hozzáférhető, azt saját gyűjteményünkben fenntartjuk.

A cDNS beépítésénél az oligo-dG:dC farkakkal operáló módszert használjuk (Maniatis). A keverékkel E. coli D1210 törzset transzformálunk, és a transzformált sejteket 10 µg/ml tetraciklin tartalmú L-agaron [S. R. Kushner, a Genetic Engineering (1978) 17. oldalán, szerkesztők: H. B. Boyer és S. Nicosia (Elsevier/North Holland, Amsterdam)] választjuk el. A máj cDNS gyűjteményből való plazmid DNS-t közvetlenül állítjuk elő [Maniatis és munkatársai, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor (1982) 86–94 oldal] úgy, hogy mintegy 62 000 rekombináns telepet szélesztünk Petri-csészékre. A sűrűség kb. 3000 telep per 9 cm átmérőjű Petri-csésze.

2. példa

r-hSOD klónok izolálása

A D1210 törzset retranszformáljuk máj cDNS gyűjteménnyel és körülbelül 40 000 klónt tenyésztünk 9 db 14 cm átmérőjű Petri-csészében. Miután a telepeket nitrocellulóz lemezekre vittük, és a plazmid DNS-t klóramfenikollal együtt szaporítottuk (Maniatis 313. old.), a sejteket lizáljuk, és a szűrőket hibridizáláshoz készítjük elő [Ish-Horowitz és Burke, Nucleic Acids Research, 9, 2989–2998 (1981)]. Oligonukleotid próba-anyagokat használunk a hibridizációval történő szűréshez. A próba-anyagok enzim-izotóposan jelzett, kémiai úton szinteti-

zált DNS molekulák, amelyek a protein 19–24 aminosav csoportjait kódoló mRNS-ével komplementerek (Jabusch és munkatársai, lásd fent, Barra és munkatársai, lásd fent); a keverék szekvenciája a következő:

```

3' TTA AAA CTT GTT TTT CT 5'
   G G C C C

```

- 40 amelyben a peptid szekvencia kódolásához minden említett lehetőség (32-szeres változat) megvan. A próbaanyagokat $1-3 \times 10^8$ cpm/µg specifikus aktivitású ^{32}P -vel jelöljük, és felhasználás előtt Millipore szűrőn (0,45 µm) megsűrjük. A szűrőmembránokat 6 órán át 30 °C-on elő-hibridizáljuk 4×SSC, 2×Denhardt-oldatban, mely még 40 mM nátrium-foszfátot (pH = 7,5) és 300 µg/ml ultrahanggal feltárt lazacsperma DNS-t tartalmaz.

- 50 A 20×SSC törzsoldat összetétele: 175,3 g NaCl és 88,2 g nátrium-citrát 800 ml vízben oldva, majd néhány csepp 10 n NaOH-oldattal pH = 7 értékre történő állítás után vízzel 1 l-re töltve.

- Az 50×Denhardt-törzsoldat összetétele: 5 g Ficoll, 5 g polivinilpirrolidon és 5 g BSA (Peutax 5. frakció), 500 ml vízzel elegyítve.

- 55 A törzsoldatokból vízzel hígítva nyerjük a fenti oldatokat.

- A hibridizálást ugyanebben az oldatban 20 órán át 30 °C-on végezzük 2×10^6 cpm/ml aktivitású hSOD DNS próbaanyaggal (19–24 csoport). A szűrőlemezeket 4×SSC oldattal mossuk, először 15 percig szobahő-

mérsékleten, és kétszer 15 percig 30 °C-on, majd szárazra itatjuk, és ezután erősítő szűrővel 24 órán át – 70 °C-on autoradiográfiát végzünk.

Az eredeti lemezekon levő területeket, amelyek meg-
egyeznek a duplikátum pozitív szignálokkal, felszúrjuk és L-táplevesre visszük, majd a plazmid DNS-t mini-
screen módszerrel [Maniatis és munkatársai, Molecular
Cloning, 178, 368–369 (1982) Cold Spring Harbor] izo-
láljuk. A kapott DNS-t PstI-vel hasítjuk, majd a Southern-
féle szűrőpapír-analízisnek [Southern, J. Mól. Biol. m 98,
503–517 (1975)] vetjük alá, hogy először az előzőleg jel-
zett próbaanyagokkal (19–24 aminosav csoport) hibridi-
záljuk, majd ezután még olyan radioizotóppal jelzett pró-
baanyagokkal, amelyek a 109–114 aminosav csoportból
származnak, és amelyek a következő szekvenciákkal
vannak jelen (72-szeres változat) keverék alakban:

```

3' CTA GTA ACA TAA TAA CC 5'
   G  G  G  G  G
           T  T

```

Egy 520 bp cDNS inszertumot tartalmazó plazmid pool
(pSOD1) mindkét próbaanyaggal hibridizált. A telep meg-
tisztítása után a klónból előállítottuk a plazmid DNS-t
(Maniatis, 366–368), és ezt szekvencia analízissel – Ma-
xam és Gilbert módszere szerint [Proc. Nat. Acad. Sci.
USA, 74, 560–564 (1977)] – megvizsgáltuk. Az ered-
ményt a 4. ábrán mutatjuk be. A pSOD1 jelű hSOD cDNS
klónt a hSOD 10–153 aminosavát meghatározó régió,
egyetlen translációs stop kodon és egy 3' transzlátatlan

EcoRI

HindIII

```

5'      AATTCCTGGGATCCGTCGACCTGCAGATCTCTAGA
3'      GGGCCCTAGGCAGCTGGACGTCTAGAGATCTTCGA
           |  |
           Sall PstI

```

Ezeket a fragmentumokat a gélben tisztított EcoRI-
gyel emésztett pBR322-höz kapcsoljuk, mely végeit
előzőleg telítettük pol I K kezeléssel, majd PstI-
gyel emésztettük. Ezt a ligációs elegyet használjuk D1210
törzs transzformálására 10 µg/ml tetraciklin tartalmú
L-agar lemezekon szelektálva (Maniatis 250–251 old).

A plot5 plazmidot a következőképpen állítjuk elő:
először megszerkesztjük a πAN7 polilinkert – ez egy
EcoRI–PvuII szubsztitúció a pBR322-ben – tartalmazó
plazmidot. (New England Biolabs) a következőképpen:
a πAN7 plazmidot HindIII-mal emésztjük, végeit pol I
K (New England Biolabs) segítségével betöltjük, majd
önmagával komplementer, PvuII linker molekulát
[d(5'-CCAGCTGG-3')] kapcsolunk a fentiek szerint
módosított πAN7 plazmidhoz. ExoRI-
gyel és PvuII-vel való emésztés után a kapott 44 bp polilinker frag-
mentumot (4 túllógó bázissal) gélben izoláljuk és (Eco-
RI–PvuII-emésztett pBR322-be klónozzuk, mintegy
EcoRI–PvuII szubsztituensként.

A plot3 plazmidot ExoRI-
gyel emésztjük és fenol-
kloroformos extrahálás és etanolos kicsapás után a kiálló
5' végeket telt-végűvé alakítjuk S1 nukleázal való keze-
lés révén [Palmiter, Biochemistry, 13, 3606–3615
(1974)]; Hallewell és Emtage, Gene, 9, 27–47 (1980)]. A

régió alkotja. Ezért az expressziós vektor szerkezetben az
1–9 aminosavat kódoló régió alapszekvenciáját, melyet a
hSOD-ra közölt (Jabusch és munkatársai, lásd fent; Barra
és munkatársai, lásd fent) aminosav szekvenciából szár-
maztatunk, kémiai szintézissel állítjuk elő, mintegy a vari-
ábilis linker szegmentum (lásd lentebb) részeként.

3. példa

A plot5 plazmid szerkesztése (lásd a 2. és 3. ábrát)

A plot1 plazmidot, mely egy hibrid trp-lac („tac”)
promotert tartalmaz [DeBoer és munkatársai, Proc.
Nat. Acad. Sci. USA, 80 21–25 (1983)] úgy szerkeszt-
jük, hogy a ptrpL1 plazmid [Edman és munkatársai,
Nature, 291, 503–506 (1981)] 180 bp HgiA–TaqI frag-
mentumát és a pKB268 plazmid [Bockman és Ptashne,
Cell, 13, 65–71 (1978)] 58 bp HpaII–EcoRI fragmentu-
mát gélben izoláljuk, és ezeket a fragmentumokat a
PstI-
gyel és EcoRI-
gyel emésztett pBR322 plazmidhoz
kapcsoljuk. Az így keletkezett plazmidot alkalmazzuk
a D1210 törzs transzformálására és a tetraciklin rezisz-
tencia alapján választjuk ki a klónokat. A plot3 plazmi-
dot úgy szerkesztjük, hogy gélben izoláljuk a tac pro-
motert tartalmazó plot1 plazmid 155 bp Fnu4HI–Eco-
RI fragmentumát – ebben az Fnu4HI helyet DNS
polimeráz I Klenow fragmentumával („pol I K”) vagy
„pol. Klen”) telt végűvé (flushended) változtatjuk – és
az alábbi szekvenciájú πAN7-ből származó 18 bp Eco-
RI–PstI polilinker fragmentumot:

fenol-kloroformos kezelés és etanolos kicsapás után a
DNS-t ClaI-
gyel emésztjük, pol I K-
vel (New England
Biolabs) telt végűvé alakítjuk és a tac promotert tartalma-
zó 237 bp fragmentumot preparatív poliakrilamid gél
elektroforézissel izoláljuk. Ezt a telt végű tac promoter
fragmentumot építjük be a fent előállított, polilinkert tar-
talmazó pBR322 plazmid PvuII helyére (lásd a 3. ábrát)
és a kapott klónokban a tac promoter irányítja a transz-
kripciót a pBR322 β-laktamáz génje irányában.

4. példa

r-hSOD-t kifejező plot5 származékok szerkesztése

Az 1. ábrán bemutatott F(26), C(16), B(31), D(11),
E(13) és 4(24) szintetikus DNS-molekulákat foszfor-
amidit módszerrel szintetizáljuk. A szimpla szálú 4(24)-
et mind a 4 bázis felhasználásával – azokon a helyeken,
melyeket X-szel jelöltünk – készítjük. Ezen felül, a
24mer szintézisének elvonjuk a kovaföldet (silica), így a
24mer-en kívül szimpla szálú 21mer-ek, 22mer-ek és
23mer-ek keletkeznek. A kovaföld hordozó elvonása
után a négy keveréket megfelelő arányban úgy kombinál-
juk, hogy minden lehetséges egyszálú polimerből ekvi-
moláris mennyiségeket kapjunk. Ezt a keveréket egyet-
len terméként tekintjük a következő lépésekben.

Az F(26), C(16), B(31) és D(11) molekulák ekvimoláris mennyiségeiből keveréket készítünk és 10 µg-ját T4 polinukleotid kinázzal foszforiláljuk. Fenol-éteres extrahálás után nem foszforilált 4(24) és E(13) szintetikus DNS-molekulákat adunk a reakciókeverékhez úgy, hogy minden fragmentumból ekvimoláris mennyiségeket tartalmazzon. Az ekvimoláris keverék 13 µg DNS-t tartalmaz 133 µl 0,3×kináz pufferben. (50 mM trisz-HCl [pH 7,6], 10 mM MgCl₂, 5 mM ditiotritol, 0,1 mM spermidin, 0,1 mM EDTA.)

A szimpla szálat úgy kötjük egymáshoz, hogy 60 percen át fokozatosan lehűtjük őket 70 °C-ról 20 °C-ra, s az összekapcsolás T4 ligázzal történik 200 µl ligáz-reakciókeverékben (50 mM trisz [pH 7,4], 10 mM MgCl₂, 10 mM ditiotritol, 1 mM spermidin, 1 mM ATP, 0,1 mg/ml BSA) 14 °C-on 4 óra hosszát. Ezután fenol-kloroformos extrahálás és etanolos kicsapás következik, majd a 4(24) és E(13) 5'-végeit T4 polinukleotid kinázzal (Maniatis és munkatársai, lásd a fenti közleményt) foszforiláljuk. A teljesen összekapcsolódott 53 bp nagyságú anyagot, melynek 5'- és 3'-végein túllógó láncok vannak, preparatív poliakrilamid gél elektroforézissal izoláljuk.

A fentiek szerint tisztított fragmentum keveréket ezután a hSOD cDNS 460 bp TaqI–PstI szegmentumához kapcsoljuk, ahogy az 1. ábrán bemutatjuk. Magát a szegmentumot úgy állítjuk elő, hogy géllal végzett tisztítással (Maniatis, 174–178. old.) izoláljuk a pSOD1454 bp TaqI–AluI fragmentumát, pol I K-val telt végűvé alakítjuk és beépítjük a plot5 plazmidba az EcoRI és SalI helyek között (lásd a 3. ábrát), ahol a végeket szintén betöltöttük. A rekombináns plazmid DNS-t kipreparáljuk (Maniatis, 366–368. old.), majd a 460 bp TaqI–PstI hSOD fragmentumot preparatív poliakrilamid gél elektroforézissal izoláljuk. Extrahálás és precipitálás után a szintetikus fragmentumnak a 460 bp TaqI–PstI hSOD fragmentumhoz való csatolása révén keletkezett 515 bp fragmentumot pol I K-val betöltjük (525–528 bp), majd SalI-gyel emésztjük, és a kapott 519–522 bp nagyságú hSOD fragmentumot poliakrilamid gél elektroforézissal izoláljuk. Ezt a fragmentumot ezután beépítjük a plot5-be, melyet előzőleg PvuII-vel és SalI-gyel emésztettünk, majd alkalikus foszfáttal kezeltünk. A kapott plazmidokat használjuk a D1210 törzs transzformálására. A D1210 törzs transzformálása után kapott rekombináns telepeket 100 µg/ml ampicillin tartalmú L-agaron szelektáljuk, így egy változó SOD expresszióval rendelkező klón készletet kapunk (jele plot5/SOD).

5. példa

r-hSOD kifejeződés és plot5/SOD plazmid kiválasztás

Abból a célból, hogy az összes *E. coli* proteint megvizsgáljuk SDS-poliakrilamid gél elektroforézissal, egynapos tenyészeteket harmincszorosára hígítva 1 ml L-tápleveshez adunk és rázott tenyésztést végzünk 37 °C-on 90 percig körülbelül OD₆₅₀ = 0,2 értékig. A tenyészetekhez annyi izopropil-tio-galaktozidot (IPTG-t) adunk, hogy végső koncentrációja 2 mM legyen, és további 3 órán át inkubáljuk. Centrifugálás

után a sejtüledéket 50 µl Laemmli pufferben [Nature, 227, 680–685 (1970)] reszuszpendáljuk, s a sejt szuszpenziót a következő lépések háromszori ismétlésével lizáljuk: 1 perces fagyasztás, 2 perces forralás, 10 másodperc sejt-homogenizálás.

Elektroforézis után (Laemmli, lásd fenti közleményt) a protein sávokat Coomassie kékkel festjük, és az egyes klónok által termelt SOD mennyiségét mérjük; Coomassie módszerrel (Bradford, Analyt Biochem (1976) 72, 248 és Bio-Rad kit); ezeket az eredményeket ezután az autentikus humán SOD elleni nyúl poliklonális antitestet tartalmazó Western szűrőpapírok használatával ellenőrizzük. Több mint 300 klónt analizáltunk és a SOD kifejeződés szintje nulla vagy csekély értéktől az össz oldható sejt-protein 5–10%-ának megfelelő – becsült – mennyiségig változott. Fenti 300 klónból hat klón eredményeit az 1. táblázatban mutatjuk be, a 4(24) DNS-molekula szekvenciájával együtt. A szekvencia analízist Maxam és Gilbert (lásd fenti közleményt) módszerével végeztük.

1. táblázat

*E. coli*ban termelt SOD szekvenciája és mennyisége

Klón	Szekvencia:				Az össz protein körülbelüli tömegszázalékában
	5'-XXXX	ATG	GCG	ACX	
pSODx8	AACA		A	G	5%
pSOD11	GTAT		T	G	10%
pSODx16	ACAT		A	A	5%
pSOD5	AATC		A	A	10%
pSOD16	ATTT		T	T	10%
pSOD18	AACT		A	G	7,5%

6. példa

r-hSOD meghatározási módszerek

Az enzimvizsgálatokhoz 100 ml-es tenyészeteket készítünk a fent leírtak szerint.

Szolubilis sejt kivonatokat készítünk oly módon, hogy a sejtüledékeket sejt-homogenizátorban kezeljük (vortexing) 10×20 másodpercig 4 °C-on azonos mennyiségű 0,45–0,5 mm átmérőjű üvegyöngyökkel (Braun AG) és azonos mennyiségű assay-pufferrel [50 mM trisz-kakodilát (pH = 8,2), 1 mM dietilén-triamin-pentaecetsav] 1,5 ml-es mikro-centrifuga csőben. A sejtörmelékét mikro-centrifugában (Beckman) üleptjük úgy, hogy a csöveket 1 percig centrifugáljuk. A felülúszót 1–1 mM cink-szulfát és rész-szulfát tartalmú assay pufferrel szemben dializáljuk 4 órán át 4 °C-on.

A SOD meghatározásokat pirogallol módszerrel (Marklund és Marklund, lásd az előbbieken) végezzük. A reakciókeverékben 0,2 mM pirogallol tartalmú assay puffert használunk, és a reakció lefolyását 5 perces időtartam alatt, Hewlett–Packard 8450 spektrofotométerrel, 420 nm hullámhosszon követjük. Négy különböző vizsgálati mintát készítünk: szolubilis *E. coli* extraktumok; autentikus hSOD; mindkét előbbi mintát előinkubálva nyúlban termelt autentikus hSOD ellenanyaggal.

Minden vizsgálati mintát küvetében inkubáltunk 1 per-
cig 25 °C-on, mielőtt a pirogallolt hozzáadjuk. A vizsgá-
latot 25 °C-on végezzük. Az ellenanyag tartalmú mintá-
kat assay pufferben 5 µl antitesttel 10 percig szobahő-
mérsékleten előinkubáljuk. Ezeket a feltételeket
megfelelőnek találtuk 100 ng tiszta hSOD inaktívva téte-
léhez. A plot5-öt kontrollként használtuk. Ez a plazmid
nem tartalmaz SOD szekvenciát.

A II. táblázatban az egyik vizsgált klónnál
(pSODx8) kapott eredményeket mutatjuk be.

II. táblázat

*E. coliban [D1210 törzs-(pSODx8)] termelt humán
Cu-ZnSOD enzim aktivitása*

Enzim készítmény	SOD egység/mg protein
tiszta humán Cu-Zn SOD	15,384
pSODx8 protein kivonat	3,017
anti-humán SOD (nyúl) antitesttel preinkubált pSODx8 protein kivonat	685
plot5 protein kivonat	470
anti-humán SOD (nyúl) antitesttel preinkubált plot5 protein kivonat	485

Ezek az eredmények azt igazolják, hogy a teljes
szolubilis sejt-protein 15%-a hSOD (feltételezve, hogy
a referenciaként használt tiszta humán Cu-Zn SOD
teljesen aktív volt).

A protein extraktumok antitesttel történő inkubála-
sa antitest-antigén komplexet eredményez, mely inakti-
válja az enzimet. Így az antitesttel előinkubált enzim-
mintáknál az enzimaktivitás alacsony. A pSODx8-ből
és plot5-ből nyert protein-extraktumok enzimaktivitás-
különbsége a plazmidok SOD-kifejezésének különbsé-
géből adódik. A pSODx8 vektor riboszóma-kötődési
helyét az SOD kifejezés optimalizálására módosítottuk.
Az elektroforézissel kapott adatokkal (lásd fent)
összevetve, amikor is a szolubilis sejt protein 5–10%-
ra mint hSOD vándorol, úgy tűnik, hogy a képződött
hSOD tekintélyes része, talán a nagyobb része aktív.

A protein-extraktum és antitest inkubálása antitest-
antigén komplex képződéséhez vezet, mely az enzimet
inaktíválja. Ezért az antitesttel preinkubált enzimmin-
ták aktivitása alacsonyabb. A pSODx8 és plot5 protein
kivonat közötti aktivitáskülönbség a két plazmid kö-
zötti SOD kifejeződés különbségéből ered. A pSODx8
vektorban a riboszóma kötődési helyet a SOD kefeje-
zés optimalizálására módosítottuk.

A klónozott gén pontos szekvenciáját Maxam és
Gilbert módszerével határozzuk meg (lásd fent). Ezen-
kívül az N-terminális első 12 aminosavát automatizált
Edman degradációs vizsgálattal határozzuk meg. A ka-
pott aminosav szekvencia a következő:

ALA-THR-LYS-ALA-VAL-(CYS)-VAL-LEU-
LYS-GLY-ASP-GLY-

A kimutatott első ALA csoport körülbelül azonos
moláris koncentrációban volt jelen, mint a bevitt pep-
tidben, s ezt azt jelenti, hogy az amino-terminális vég

nincs blokkolva. A CYS csoportot nem mutatja ki az
aminosav analízisre alkalmazott módszer, de jelenléte
a nukleotid szekvenciából következik.

Fentiek alapján a bakteriális expressziós termék
nem tartalmaz (N-formil-) metionint, az anyagnak he-
lyes az aminosav szekvenciája, azaz a citoplazma
hSOD-ra kötött 1–10 csoporttal azonos, de az N-termi-
nális ALA nem acetilezett. Továbbá: az *E. coliban*
termelt polipeptid 1%-os agaróz gélben (pH = 8,6)
elektroforetizálva sokkal lassabban vándorol, mint a
természetes protein, ami a töltésbeli különbségre utal
(Corning Universal electrophoresis film, Clausen sze-
rint festve, Immunochemical Techniques, 530–531 ol-
dal), s ez szintén az acetilezettség hiányát mutatja.
Ezenkívül úgy a bakteriális hSOD polipeptid, mint az
autentikus (acetilezett) természetes protein tripszines
kezelésekor kapott peptidok azonosak, kivéve a bakte-
riális N-terminális peptid, amely várhatóan másképp
vándorol, azaz úgy, mint egy N-acetil csoportot nem
tartalmazó peptid.

7. példa

Kifejeződés élesztőben

Annak érdekében, hogy az r-hSOD gént élesztő
vektorba vigyük át, a plot5/SOD plazmid klónokat a
kódoló régió 5'-végén elhelyezkedő NcoI restrikciós
hely szempontjából szűrjük. Ugyanis azokban a plaz-
midokban, ahol a variábilis nukleotidok helyén – az
iniciációs kodontól 5' irányban – CC van, a CCATGG
szekvencia egy NcoI helyet szolgáltat. A klónok szűré-
se után egyet kiválasztunk és pHSD jellel látjuk el.

A pHSD plazmid NcoI-gyel és SalI-gyel történő
emésztése után egy 550 bp-os fragmentumot kapunk,
amely 5' végén transzlatálatlan nukleotidot és a hSOD
teljes régióját tartalmazza. pPGAP plazmidot (ez egy
élesztő expressziós vektor, mely GAP promotert hor-
doz; szerkesztését lásd a 8. példában) emésztünk NcoI-
gyel és SalI-gyel, majd alkalikus foszfáttal kezel-
jük. A pHSD 550 bp SalI-NcoI fragmentummal a
pPGAP-ban a GAP promotertől lefelé lévő NcoI-SalI
fragmentumot szubsztituáljuk, és így megkapjuk a
pPGAPSOD-ot. Ezt BamHI-gyel emésztjük, és ekkor
egy 2 kb (kilo bázis pár) nagyságú fragmentumhoz
jutunk, melyet géllal tisztítunk (Maniatis, 178. old.) és
ligálással beépítjük a pCI/1 és a pCI/1 GAL4/370 plaz-
mid egyedüli Bam I helyére, miáltal a pCI/1GAPSOD,
illetve a pCI/1GALGAPSOD plazmidokhoz jutunk.

A pCI/1 plazmid egy élesztő ingázó vektor, melyet
úgy állítunk elő, hogy a pJDB219 plazmid pMB9
régiójának BamHI-SalI részét a pBR322 plazmid 4 kb
BamHI-SalI fragmensével helyettesítjük. [Beggs, Na-
ture, 275, 104 (1978)]. Szekréciós és processzor szig-
nállal ellátott expressziós vektor szerkesztése a
4870 008 számú USA szabadalmi leírásban található: a
GAI1/GAL10 szabályozó régiót tartalmazó szabályoz-
ható élesztő expressziós vektor (a GAL4 gén expresz-
ziós terméke által szabályozva) szerkesztésének leírá-
sát lásd a 9. példában.

A pCI/1GAPSOD és a pCI/1GALGAPSOD plaz-
middal a 2150–2–3 élesztő törzset [Lee Harwelltől

(University of Washington) kaptuk] transzformáljuk [Hinnen és munkatársai, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 75, 1929–1933. (1987)], és az expresszió eredményeit a III. táblázatban ismertetjük.

III. táblázat

Humán SOD kifejeződése a 2150 élesztő törzsben

Plazmid	Szénforrás	SOD ² µg/mg protein
pC1/1	g, L ¹	0
pC1/IGAPSOD	g, L	148
pC1/IGALGAPSOD	g, L gal	0,4 68

¹ Minden tenyésztéshez Minus Leucine táptalajt (Promega Biolabs, Inc.) használtunk 2% tejsavval (L), 3% glicerinrel (g) és/vagy 2% galaktózzal (gal) vagy anélkül. A tenyésztést a késői log vagy a korai stationer fázisig folytattuk.

² A meghatározás RIA-val (radio-immuno-assay) történt.

A hSOD értékeket standard radio-immun-assay-vel határozzuk meg, standardként jódozott autentikus hSOD-t használunk. A GAP promotertől eredő konstitutív szintézis igen magas szintű, a teljes sejt protein 10–30%-ának megfelelő hSOD termelést eredményez. A galaktózzal való indukció csaknem ilyen jól működik: a sejt protein körülbelül 7%-a hSOD.

Ha a hSOD képződése ilyen magas szinten történik, a teljes enzimatikus, azaz katalitikus aktivitás kifejtéséhez rendszerint gondoskodnunk kell a protein termék proszketikus csoportját alkotó cink- és rézionok utánpótlásáról, amit például cink-szulfát és réz-szulfát 1 millimólos oldatával szembeni dialízissel biztosíthatunk. Másképpen úgy járhatunk el, hogy a tenyészléhez cink- és/vagy rézionokat adunk; ez a módszer a hSOD-t magas szinten termelő törzsek szelekciójára is felhasználható és/vagy arra is, hogy elkerüljük a hSOD-t kifejező vektorok elvesztését az egyébként nem szelektív táptalajon.

8. példa

A pPGAP szerkesztése

A pBR322 plazmid HindIII helyére a GAP49 GAPDH-gént tartalmazó HindIII restrikciós fragmenst [Holland és Holland, J. Biol. Chem. 254, 5466–5474. (1979)] építjük be, és így a pGAP1 plazmidot állítjuk elő. A pGAP1-et HinfI-gyel emésztjük, és a kapott 500 bp fragmentumot gélelektroforézissel izoláljuk. E fragmentumot Bal31-gyel (New England Biolabs) hasítjuk, hogy 50 vagy 90 bázispárt eltávolítsunk, ezután HindIII linkerekkel (New England Biolabs) kapcsoljuk össze, majd HindIII-mal emésztünk. A pBR322-t HindIII-mal emésztjük, ezután alkalikus foszfatázzal kezeljük, és a kapott mintegy 450 vagy 410 bp hosszú fragmentum beépítése révén kapjuk a pGAP128-at.

A pGAP128-at HindIII-mal emésztjük, a fragmentum végeit Klenow fragment és a dNTP-k segítségével betöltjük (blunt end), majd a kapott 450 bp fragmentu-

mot gélelektroforézissel izoláljuk. Ezt a fragmentumot az előzőleg alkalikus foszfatázzal kezelt, majd Smal-gyel emésztett plot5-be építjük be, miáltal a plot5pGAP128 plazmidhoz jutunk, amely a GAPDH promoter és kódoló régió –400-tól +27-ig terjedő bázispárjait tartalmazza.

A pPGAP élesztő expressziós vektort – amely egy polirestrikciós linkert tartalmaz a GAPDH terminátor és a rövid promoter között – a következőképpen szerkesztjük meg. A plot5pGAP128 plazmidot BamHI-gyel és TaqI-gyel emésztjük, így egy közelítőleg 390 bp BamHI–TaqI fragmentumot kapunk, amely a GAPDH promoter –400-tól –26-ig terjedő fragmentumát tartalmazza. Ezt a fragmentumot a GAPDH gén –25-től –1 bp-ig terjedő promoterét és számos restrikciós helyet, beleértve az NcoI-et is tartalmazó, alábbi szekvenciájú:

CGA₂TA₃(CA)₃TA₃CA₃CACCATG₃A₂TCGT₂AG₂
T₂AT₃(GT)₃AT₃GT₃GTGGTAC₃T₂A₂GCA₂TC₂AGCT

Ezzel egy BamHI–SalI fragmentumot kapunk, amelyet BamHI-gyel és SalI-gyel emésztünk és arra használjuk, hogy az alkalikus foszfatázzal kezelt és BamHI–SalI-gyel emésztett pBR322 plazmid BamHI–SalI fragmentumát helyettesítsük. Ligálás után a pGAPNRS plazmidhoz jutunk, amelyet BamHI-gyel és SalI-gyel emésztünk, s ekkor egy 400 bp hosszú BamHI–SalI fragmentumot kapunk, melyet izolálunk. Ezt a fragmentumot egy körülbelül 900 bp hosszú olyan GAPDH SalI–BamHI fragmentumhoz kapcsoljuk, amely a GAPDH terminátor régióját és a 3' kódoló régió egy rövid szegmentumát tartalmazza. Így egy 1,4 bp hosszú BamHI–BamHI fragmentum keletkezik. A SalI–BamHI GAPDH terminátor fragmentumot úgy kapjuk, hogy a pGAP2-t SalI-gyel és BamHI-gyel emésztjük. A pGAP2 egy plazmid, mely úgy készül, hogy a pBR322 plazmid BamHI helyére beépítünk egy GAP49 GAPDH gént (Holland és Holland, lásd fenti közleményt) tartalmazó mintegy 3,3 kb hosszú BamHI fragmentumot. A pGAP2 és PGAP1 plazmidokat a következőképpen szerkesztjük: élesztő gén gyűjteményt állítunk elő, hogy a Charon 28 lambda fágba egy – a teljes élesztő DNS Sau3A restrikciós endonukleázzal történő parciális emésztése révén kapott – fragmentumot építünk be [Blattner és munkatársai, Science, 196, 161–169. (1977)]. A fág gyűjteményt élesztő GAPDH mRNS-sel komplementer DNS-sel szűrjük, és e klónok egyikéből származó élesztő GAPDH gént beklónozzuk vagy mintegy körülbelül 3,3 kb BamHI fragmentumként a pBR322 plazmid BamHI helyére (pGAP-2) vagy mintegy körülbelül 2,1 HindIII fragmentumként a pBR322 plazmid HindIII helyére (pGAP-1).

A pBR322 plazmidot EcoRI-gyel és SalI-gyel emésztjük, a végeket betöltjük és hozzákapcsoljuk BamHI linkerekhez, ezután BamHI-gyel való emésztés következik, majd a 3,8 kb BamHI–BamHI fragmentumot gélből izoláljuk, recirkularizáljuk ön-ligáz reakcióval, klónozzuk és a pBRΔRI-Sal jellel látjuk el. A fentiek szerint izolált 1,4 kb BamHI–BamHI fragmentumot be-

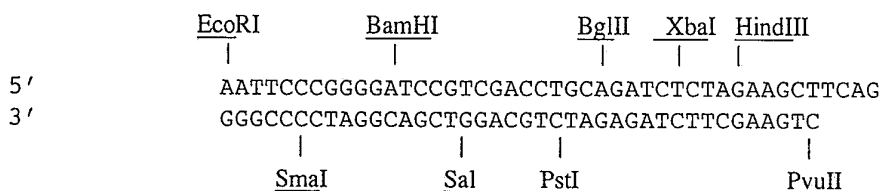
építjük a BamHI-gyel emésztett, alkalikus foszfatázzal kezelt pBRAR1-Sal vektorba, miáltal az amp^r génnel ellenkező orientációjú fragmentumot tartalmazó 5,3 kb pPGAP plazmidhoz jutunk.

9. példa

GAL szabályozással rendelkező plazmidok szerkesztése

A pLGSD5 plazmidot a Guarente és munkatársai által leírt [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 7410–7414. (1982)] módszerrel állítjuk elő. A plazmiddal a következő manipulációkat végezzük:

először XhoI enzimmel hasítjuk, a túllógó végeket a DNS polimeráz I Klenow fragmentjének („Klenow fragment”) segítségével betöltjük, összekapcsoljuk EcoRI linkerekkel (GGAATTCC), majd teljesen emésztjük ExoRI-gyel és Sau3A-val. Ekkor egy 370 bp fragmentumot is kapunk, melyet gélelektroforézissel izolálunk, s ez a fragmentum az élesztő GAL1 és GAL10 génjei közti szekvenciát tartalmazza, mely a



a pBR322 plazmidba építjük be, EcoRI-PvuII szubsztituensként, majd a PvuII helyre a trp-lac promotor [Russell és Bennett, Gene, 20, 231–245 (1982)] beépítése következik a polilinker szekvencia felé orientált transzkripcióval. A plot5 plazmidot teljesen megemésztjük SalI-gyel, ezután alkalikus foszfatázzal kezeljük, majd az előbb kapott 370 bp fragmentumot beépítjük a plot5-be, s így kapjuk a plot5GAL4/370 plazmidot. Ezt a plazmidot teljesen megemésztjük BamHI-gyel és SalI-gyel, hogy újra megkapjuk a polilinker fragmentum 6 bázispárra terjedő individuális fragmentumát. Ezt a fragmentumot a pC1/1 plazmidhoz kapcsoljuk, miután azt teljesen megemésztettük BamHI-gyel és SalI-gyel, majd alkalikus foszfatázzal kezeljük, hogy megakadályozzuk a gyűrűbe záródást. A keletkező plazmidot a pC1/1GAL4/370 jelzéssel látjuk el. A BamHI–SalI fragmentum a pC1/1 vektor pBR322-ből álló részében helyezkedik el.

Az élesztőben termelt phSOD polipeptid azonos a természetes humán proteinnel. Az élesztőben előállított hSOD a proteinnel azonos módon vándorol úgy poliakrilamid gél elektroforézissel (SDS-sel és SDS nélkül is), mint agaróz gél elektroforézissel vizsgálva (lásd fent). Ezenkívül, ha az igen tiszta élesztő polipeptidet tizenkét Edman degradációs ciklusnak vetjük alá, ugyanazt a szekvenciát kapjuk, mint amit az E. coliban termelt humán proteinre leközltek (1–10 csoport) és fent bemutattunk. Azonban a bevitt proteinhez viszonyítva – moláris alapon – a kimutatott érték a vártaknak csak 5–10%-a. Ez az alacsony kimutathatósági szint azt mutatja, hogy az N-terminális aminosav blokkolva van, feltehetően aceti-

GAL1 és GAL10 gének GAL4 szabályozó szekvenciáját reprezentálja.

A kapott fragmentumot beépítjük a pBR322 plazmidba, melyet EcoRI-gyel és BamHI-gyel teljesen megemésztettünk, majd alkalikus foszfatázzal kezeljük, hogy megakadályozzuk az oligomerizációt, s így a pBRGAL4 plazmidhoz jutunk.

A pBRGAL4 plazmidot teljesen megemésztjük Sau3A-val, a túllógó végeket Klenow-fragment segítségével betöltjük, a keletkező telt-végű (blunt-ended) fragmentumot SalI linkerekhez (CGTCGACG) kapcsoljuk, majd SalI-gyel és XhoI-gyel emésztünk. A kapott 370 bp fragmentumot gélelektroforézissel izoláljuk. Ez a fragmentum az eredeti 370 bp nagyságú élesztő GAL4 szabályozó szekvencia XhoI és SalI végekkel.

E fragmentumot ezután a plot5 plazmidba klónozzuk (lásd 4. példa). A plot5 plazmid szerkesztése a következőképpen történik: az alábbi szekvenciájú 40 bp polilinker fragmentumot

lezve. Ezt az eredményt az élesztőben termelt hSOD és az autentikus acetilezett humán anyag tripszines kezelése révén kapott peptidek összehasonlító vizsgálata is igazolja, azaz mindkét mintában azonosak voltak a tripszinnel kezelt proteinek, beleértve az N-terminálisokat is, ami az élesztőben kifejeződött termékben az acetilezett N-terminális ALA-csoport jelenlétére utal.

11. példa

A humán SOD-gén izolálása

A humán SOD-gén izolálása céljából humán genomot reprezentáló lambda bakteriofág gyűjteményt [R. Lawn és munkatársai, C₁₁, 15, 1157–1174 (1978)] szűrünk radioizotóppal jelzett DNS próbanyaggal, melyet humán SOD cDNA-ból készítünk. Egy millió fág plakkot szűrünk és 13 pozitívan hibridizáló plakkot tisztítottunk. A fág DNS restrikciós endonukleázzal való vizsgálata azt mutatta, hogy legalább 5 különböző gén van jelen, mely szerint feltételezhető, hogy másféle SOD-t meghatározó gének és géntermékek is léteznek. Egy ilyen gén-jelölt a legutóbb felfedezett extracelluláris Cu/Zn SOD [S. Marklund, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 79, 7634–7638 (1982)]. Hogy az autentikus citoplazma Cu/Zn SOD-gént a rokon génektől megkülönböztethessük, az alábbi szintetikus DNS-anyagokat alkalmaztuk:

5'-AATGCTTCCCCACACC-3' és 5'-CTCAGT-TAAAATGTCTGTTTG-3', melyek a 19–26 aminosavnak, illetve a 3' transzlátatlan régióban lévő 3' terminátor kodonból való 193–213 nukleotidoknak felelnek meg. A tizenhárom genom DNS közül csak egy hibridizált ezekkel a próba-anyagokkal, jelez-

vén, hogy ez az autentikus humán citoplazma SOD-gén. Ezt az N-terminális régió DNS szekvencia analízise is bizonyítja. Az 5. ábrán bemutatjuk az analízis eredményét, azaz a protein szekvencia analízissel bizonyított aminosav szekvenciát. Ez azt is jelenti, hogy a SOD-nak nincs preproteinje, minthogy az iniciátor metionin kodontól 5' felé kilenc nukleotiddal egy in-frame terminátor kodon létezik. Az 5. ábrán látható, hogy a humán Cu/Zn SOD-gén közbeeső szekvenciákat tartalmaz. A SOD-gén térképe, melyet a 6. ábra mutat, azt mutatja, hogy több közbeeső szekvencia is létezik.

Bár a találmány szerinti eljárást a jobb megértés érdekében példákkal és ábrákkal megvilágítva a fentiekben részletesen leírtuk, mégis magától értetődik, hogy bizonyos változtatások és módosítások végrehaj-

thatók a csatolt szabadalmi igénypontokban megfogalmazott körön belül.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás acetilezett humán réz-cink szuperoxid-dismutáz előállítására, melynek során

- szuperoxid-dismutázt kódoló DNS szekvenciát tartalmazó kifejező vektort készítenek,
- az élesztő gazdasejtet transzformáljuk a vektorral,
- a transzformált gazdasejtet tenyésztjük, és
- a keletkezett acetilezett humán szuperoxid-dismutázt kinyerjük,

55 *azzal jellemezve*, hogy az alábbi humán szuperoxid-dismutázt kódoló DNS-szekvenciát:

```
GCG ACG AAG GCC GTG TGC GTG CTG AAG GGC GAC GGC CCA GTG CAG
GGC ATC ATC AAT TTC GAG CAG AAG GAA AGT AAT GGA CCA GTG AAG
GTG TGG GGA AGC ATT AAA GGA CTG ACT GAA GGC CTG CAT GGA TTC
CAT GTT CAT GAG TTT GGA GAT AAT ACA GCA GGC TGT ACC AGT GCA
GGT CCT CAC TTT AAT CCT CTA TCC AGA AAA CAC GGT GGG CCA AAG
GAT GAA GAG AGG CAT GTT GGA GAC TTG GGC AAT GTG ACT GCT GAC
AAA GAT GGT GTG GCC GAT GTG TCT ATT GAA GAT TCT GTG ATC TCA
CTC TCA GGA GAC CAT TGC ATC ATT GGC CGC ACA CTG GTG GTC CAT
GAA AAA GCA GAT GAC TTG GGC AAA GGT GGA AAT GAA GAA AGT ACA
AAG ACA GGA AAC GCT GGC AGT CGT TTG GCT TGT GGT GTA ATT GGG
ATC GCC CAA TAA
```

vagy az ugyanezen polipeptidet kódoló variánsát, melyek 5'-végén olyan acetilező szignál helyezkedik el, amelynek első kodon-helyzetében glicin vagy alanin, és a második kodonhelyzetben poláris aminosav van, 30 tartalmazó kifejező vektort készítenek.

(Elsőbbsége: 1984. 05. 11.)

2. Eljárás humán réz-cink szuperoxid-dismutáz kifejezésére alkalmas vektor előállítására, melynek során

- iniciációs kodonnal és stop kodonnal rendelkező, 35

```
GCG ACG AAG GCC GTG TGC GTG CTG AAG GGC GAC GGC CCA GTG CAG
GGC ATC ATC AAT TTC GAG CAG AAG GAA AGT AAT GGA CCA GTG AAG
GTG TGG GGA AGC ATT AAA GGA CTG ACT GAA GGC CTG CAT GGA TTC
CAT GTT CAT GAG TTT GGA GAT AAT ACA GCA GGC TGT ACC AGT GCA
GGT CCT CAC TTT AAT CCT CTA TCC AGA AAA CAC GGT GGG CCA AAG
GAT GAA GAG AGG CAT GTT GGA GAC TTG GGC AAT GTG ACT GCT GAC
AAA GAT GGT GTG GCC GAT GTG TCT ATT GAA GAT TCT GTG ATC TCA
CTC TCA GGA GAC CAT TGC ATC ATT GGC CGC ACA CTG GTG GTC CAT
GAA AAA GCA GAT GAC TTG GGC AAA GGT GGA AAT GAA GAA AGT ACA
AAG ACA GGA AAC GCT GGC AGT CGT TTG GCT TGT GGT GTA ATT GGG
ATC GCC CAA TAA
```

vagy az ugyanezen polipeptidet kódoló variánsát alkalmazzuk.

(Elsőbbsége: 1983. 10. 03.)

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy promoterként egy élesztőpromotert vagy egy bakteriális promotert alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1983. 10. 03.)

4. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, 55 hogy olyan struktúrgént készítenek, mely a DNS-szekvencia 5'-helyzetében acetilező szignált tartalmaz.

humán réz-cink szuperoxid-dismutázt kódoló struktúrgént készítenek,

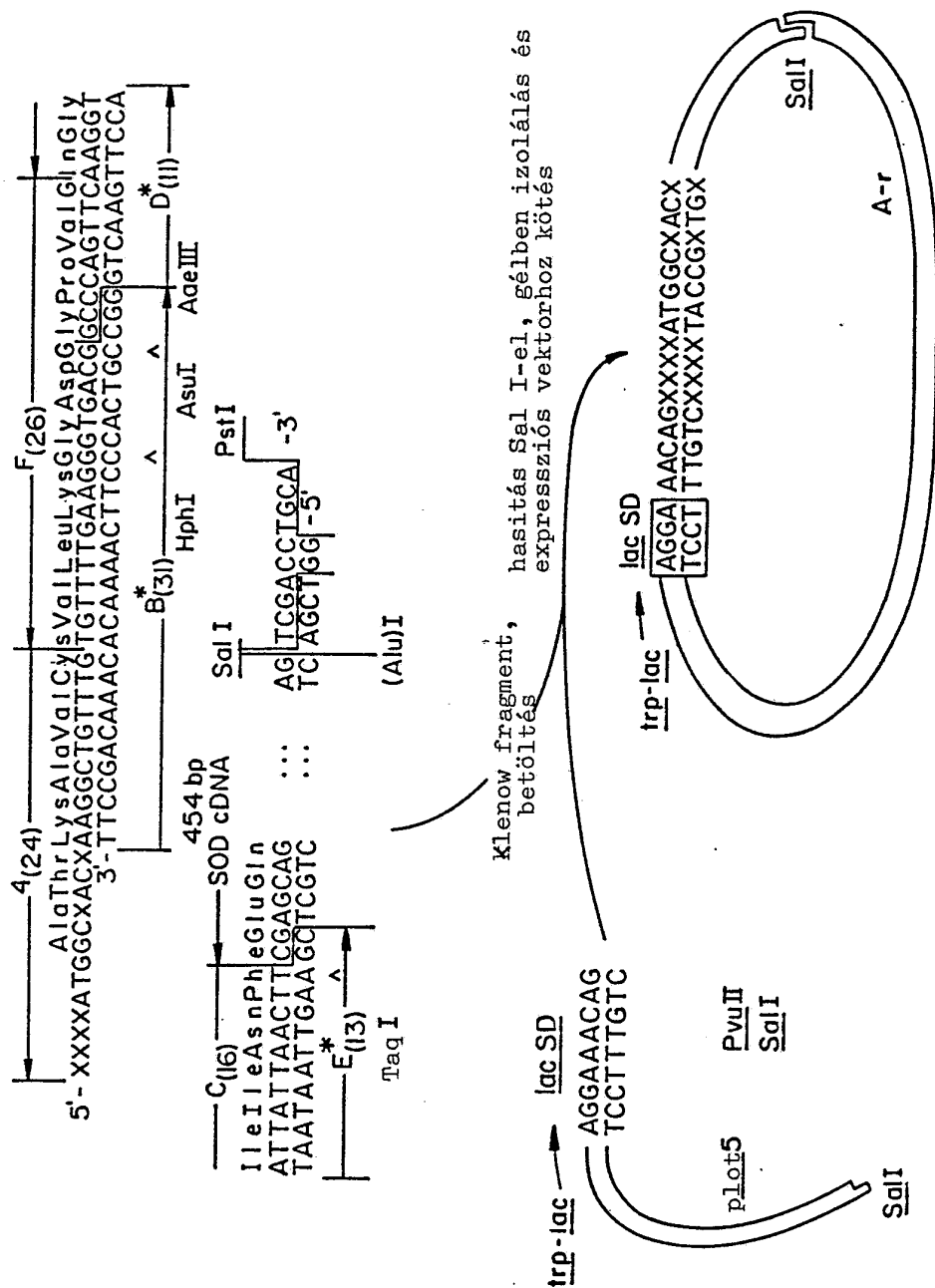
- a kapott struktúrgént transzkripció és transláció fázisban a promotor és riboszóma kötőhely után beépítjük, és

iii) az előállított kifejező egységet egy vektorral kombináljuk,

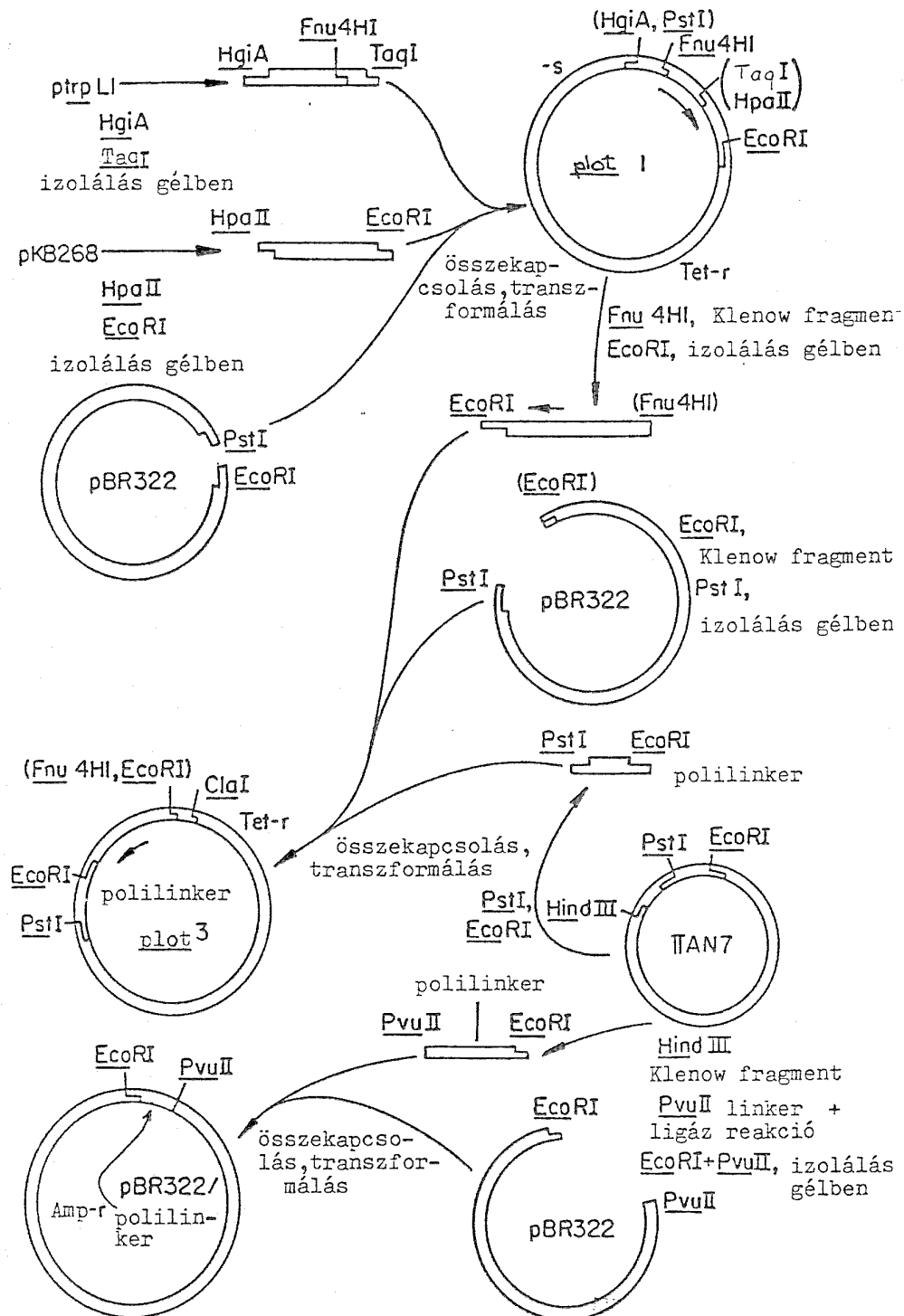
azzal jellemezve, hogy struktúrgénként az alábbi humán szuperoxid-dismutázt kódoló DNS-szekvenciát:

(Elsőbbsége: 1983. 10. 03.)

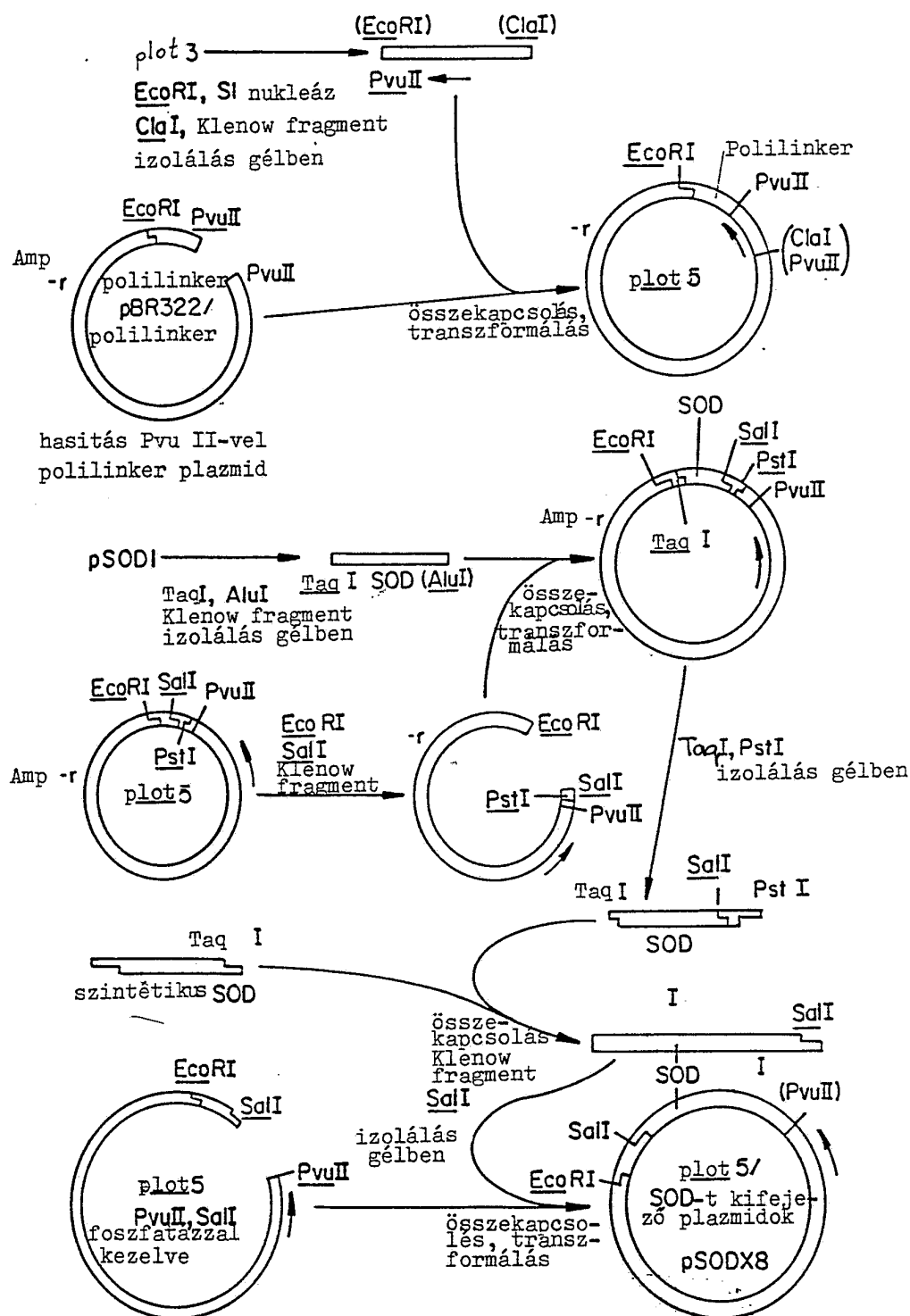
- 50 Eljárás baktériumtenyészetek humán réz-cink szuperoxid-dismutáz termelőképességének fokozására, *azzal jellemezve*, hogy a 2. igénypont szerinti eljárással előállított vektor riboszóma kötőhelye és az iniciációs kodon között 1-4 nukleotid-számú DNS-hidakat alakítunk ki, és a kapott vektorokkal gazda mikroorganizmust transzformálunk, és azt tenyésztjük, és a legnagyobb termelőképességet biztosító telepeket szelektáljuk. (Elsőbbsége: 1983. 10. 03.)



1. ábra



2. ábra



3. ábra

A hSOD transzlációja

```

10                                20
gly asp gly pro val gln gly ile ile asn phe glu gln lys glu
GGC GAC GGC CCA GTG CAG GGC ATC ATC AAT TTC GAG CAG AAG GAA
      *Sau 96 I                                *TaqI

30
ser asn gly pro val lys val trp gly ser ile lys gly leu thr
AGT AAT GGA CCA GTG AAG GTG TGG GGA AGC ATT AAA GGA CTG ACT
      *Sau 96 I

40                                50
glu gly leu his gly phe his val his glu phe gly asp asn thr
GAA GGC CTG CAT GGA TTC CAT GTT CAT GAG TTT GGA GAT AAT ACA

60
ala gly cys thr ser ala gly pro his phe asn pro leu ser arg
GCA GGC TGT ACC AGT GCA GGT CCT CAC TTT AAT CCT CTA TCC AGA

70                                80
lys his gly gly pro lys asp glu glu arg his val gly asp leu
AAA CAC GGT GGG CCA AAG GAT GAA GAG AGG CAT GTT GGA GAC TTG

90
gly asn val thr ala asp lys asp gly val ala asp val ser ile
GGC AAT GTG ACT GCT GAC AAA GAT GGT GTG GCC GAT GTG TCT ATT

100                                110
glu asp ser val ile ser leu ser gly asp his cys ile ile gly
GAA GAT TCT GTG ATC TCA CTC TCA GGA GAC CAT TGC ATC ATT GGC

120
arg thr leu val val his glu lys ala asp asp leu gly lys gly
CGC ACA CTG GTG GTC CAT GAA AAA GCA GAT GAC TTG GGC AAA GGT

130                                140
gly asn glu glu ser thr lys thr gly asn ala gly ser arg leu
GGA AAT GAA GAA AGT ACA AAG ACA GGA AAC GCT GGC AGT CGT TTG

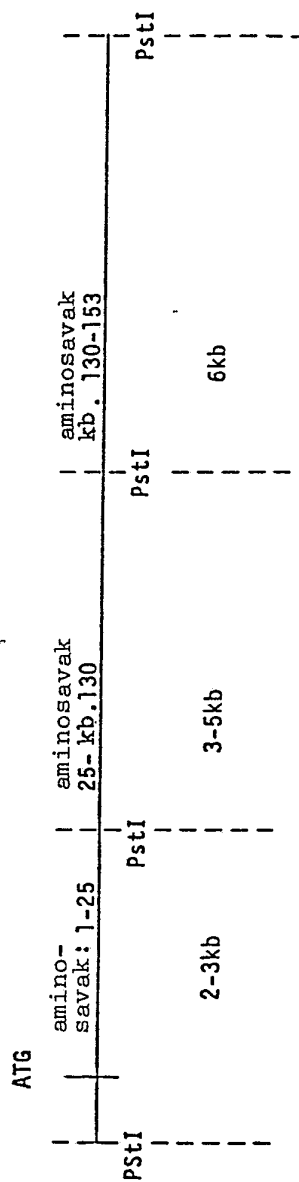
150                                153
ala cys gly val ile gly ile ala gln OC
GCT TGT GGT GTA ATT GGG ATC GCC CAA TAA ACATTCCCTTGCTGTAGTCT
GAGGCCCTTAACATCATCTGTTATCCTGCTAGCTC-
      *AluI
```

A transzlátalt hSOD molekulatömege = 14893.03

4. ábra

CTGCAGCGTCTGGGGTTTCGGTTGCAGTCCCTCGGAACCAAGGACCTCGGCGTGGCCTAGCGAGTT Met
 ATG
 Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Phe Val Gln Gly Ile Ile
 GCG ACG AAG GCC GTG TGC GTG AAG GGC GAG GGC CCA GTG CAG GGC ATC ATC
 Asp Phe Glu Gln Lys
 AAT TTC GAG CAG AAG GCAAGGGCTGGGACGGAGGGCTTG

5. ábra



6. ábra