(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 952801 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 952801

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 15/80 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **10.12.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **07.06.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **07.06.1995**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **10.12.1993 PCT/EP1993/003553**

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

10.12.1992 US 988778 P

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • DSM IP Assets B.V., Het Overloon 1, 6411 TE Heerlen, ALANKOMAAT, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Hintz, William E., Victoria British Columbia, V8P 1BC, KANADA, (CA)
2 • Lagosky, Peter A., Toronto, Ontario, M4C 1S3, KANADA, (CA)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Hetrologisten proteiinien tuotanto rihmasienissä
Odling av heterologiska proteiner i filamentsvampar

(57) Tiivistelmä - Sammandrag - Abstract

Proteiinien ilmentyminen rihmasieni-isännissä aikaansaadaan glukoosin läsnäollessa käyttämällä promoottorivariantteja, joissa creA-sitoutumiskohdat on toiminnallisesti hajotettu.
Uttryckning av proteiner i filamenta svampvärdar åstadkommas i närvaro av glukos genom att använda promotorvarian-ter, i vilka creA-bindningsställen har funktionellt brutits.

HETEROLOGISTEN PROTEIINIEN TUOTANTO RIHMASIENISSÄ

Keksinnössä sovelletaan yhdistelmä-DNA-tekniikkaa haluttujen proteiinien tuottamiseksi mikrobi-isännissä, erityisesti rihmasienissä *Aspergillus*-lajit mukaan lukien.

Monia eri geenin ilmentymisjärjestelmiä on kehitetty rihmasieni-isäntien kanssa käytettäväksi. Näiden joukossa ovat järjestelmät, joissa käytetään hiilen kataboliitti-repressoituja promoottoreita, esim. glukoosirepressoituja promoottoreita, jotka on valikoitu pääasiassa sen perusteella, että niiden kykyä käynnistää geenin ilmentyminen voidaan tarkasti säädellä yksinkertaisesti fermentaatio-olosuhteita muuttamalla. Yksi tämäntyyppinen järjestelmä käyttää *Aspergillus nidulansin* alcA-geenin promoottoria, jota glukoosin läsnäolo ehkäisee ja etanoli, treoniini tai vastaavat metaboliitit indusoivat glukoosinpuuteolosuhteissa (katso Gwynne *et al.*, Biochem. Soc. Trans., **17**: 338). Tämä kaksinkertainen säätely tarjoaa miellyttävän, vaiheistetun lähestymistavan fermentaatioon, jossa *Aspergillus*-isäntäkantaa viljellään ensin glukoosin läsnäollessa biomassan maksimoimiseksi ja sen jälkeen sitä viljellään glukoosinpuuteolosuhteissa induktorin läsnäollessa halutun proteiinin tuotannon esiinsaamiseksi. Samalla tavoin säädeltyjä järjestelmiä on myös kehitetty, ja niissä käytetään muita glukoosirepressoituja promoottoreita, kuten esimerkiksi *Aspergillus nidulansin* aldA-geenin promoottoria (katso Pickett *et al.*, Gene (1987) **51**: 217), *Aspergillus nidulansin* amdS-geenin promoottoria (katso Scazzocchio *et al.*, 1992, *infra*), *Aspergillus nigerin* gla-geenin promoottoria (katso Fowler *et al.*, Curr. Genet. (1990) **18**: 537), *Aspergillus nidulansin* ja *Cephalosporium chrysogenumin* acvA- ja ipnA-geenien promoottoreita (katso Brakhage *et al.*, (1992) **174**: 3789).

Vaikka glukoosirepressoitujen promoottorien suorittama geenin ilmentymisen säätely on monissa tapauksissa suota-

vaa, niiden käyttö saattaa tehdä fermentaation tuotantovaiheesta monimutkaisen. Geenituotteen muodostumiseksi isäntäkantaa on viljeltävä ei vain glukoosinpuuteolosuhteissa vaan myös elatusaineessa, jossa käytetään vaihtoehtoista hiilenlähdettä glukoosille, joka on edullisempi substraatti. Niinpä olisi suotavaa kehittää promoottoreita, joista niiden glukoosirepressiotoiminta on poistettu.

Hiilen kataboliittirepression glukoosivälitteisen mekanismin tutkimukset *Aspergilluksessa* ja muissa rihmasienissä ovat osoittaneet creA-geenin tuotteen olevan pääasiallinen repressori. Nykyisin on laajalti hyväksytty se (katso Scazzocchio, teoksessa *Aspergillus*; Biology and Industrial Applications, Butterworth-Heinemann, 1992, s. 43-63), että glukoosin läsnäollessa creA-geenituote ehkäisee sellaisten geenien ilmentymistä, jotka osallistuvat muiden hiilisubstraattien, kuten etanolin ja laktoosin, hyödyntämiseen ja siten estää näiden muiden reaktioteiden hyödyntämisen silloin, kun glukoosia on saatavissa. Dowzer ja Kelly ovat selostaneet äskettäin *Aspergillus nidulansin* creA-geenin kloonauksen ja analyysin artikkelissa Mol. Cell. Biol. (1991) 11: 5701.

Domeeni, johon creA-geenituote glukoosirepressoitujen rihmasienigeenien promoottorialueissa sitoutuu, on nyt tunnistettu. Tätä löytöä käytetään tämän keksinnön mukaisesti glukoosirepressoiduissa promoottoreissa olevan creA-sitoutumisdomeenin hajottamiseen ja sillä tavalla sellaisten promoottorivarianttien tarjoamiseen, jotka pystyvät käynnistämään ilmentymisen glukoosin läsnäollessa.

Yksityiskohtaisemmin, ja keksinnön yhden näkökannan mukaan, tarjotaan yhdistelmä-DNA-ekspressiokasetti, joka on hyödyllinen proteiinia koodaavan DNA:n ilmentymisen aikaansaamiseksi rihmasieni-isännässä. Kasetti sisältää proteiinia koodaavan DNA:n ja siihen toiminnallisesti kytketyn promoottorivariantin, jolla on hajotettu creA-sitoutu-

miskohta proteiinia koodaavan DNA:n ilmentymisen mahdollistamiseksi glukoosin läsnäollessa.

Keksinnön suoritustavoissa promoottorivariantti saadaan etanolimetaboliaan osallistuvan *Aspergillus*-geenin promoottorista, joka on esimerkiksi *Aspergillus nidulansin* alcA-, aldA- tai alcR-geenistä.

Toinen keksinnön näkökanta koskee rihmasienikantaa, jonka sisään on viety yhdistelmä-DNA-ekspressiokasetti, joka sisältää heterologisen DNA:n ja siihen toiminnallisesti kytketyn promoottorivariantin, jolla on hajotettu creA-sitoutumiskohta.

Keksinnön toinen näkökanta koskee sellaista menetelmää halutun proteiinin tuottamiseksi, jossa viljellään glukoosin läsnäollessa rihmasienikantaa, johon on viety yhdistelmä-DNA-ekspressiokasetti, joka sisältää haluttua proteiinia koodaavan DNA:n ja siihen toiminnallisesti kytketyn promoottorivariantin, jolla on hajotettu ja avaruudellisesti säilynyt creA-sitoutumiskohta.

Keksintö ja sen edulliset suoritustavat kuvataan nyt yksityiskohtaisemmin liitteenä oleviin piirustuksiin viitaten.

Lyhyt viittaus piirustuksiin

Kuva 1 esittää *Aspergillus nidulansin* alcA-promoottorin alueen nukleotidisekvenssin. Katso myös sekvenssilistauksen SEKV. ID NO:3.
Kuva 2 esittää kaavakuvan alcA-promoottorivariantin konstruktiosta.

Yksityiskohtainen kuvaus ja edulliset suoritustavat

Keksintö koskee menetelmää niiden rihmasienigeenien promoottorien muuttamiseksi, jotka ovat normaalisti glukoosi-

repressoituja, niin että saadaan promoottorivariantteja, jotka toimivat glukoosin läsnäollessa käynnistäen sellaisen proteiinia koodaavan DNA:n ilmentymisen, joka on kytketty toiminnallisesti promoottorivarianttiin. Tämä aikaansaadaan eliminoimalla glukoosirepressoidun promoottorin creA-sitoutumiskohta joko deleetiolla tai mieluummin nukleotidisubstituutiolla. Näin ollen termi "promoottorivariantti" tarkoittaa tässä käytettynä glukoosirepressoitua promoottoria, jossa normaalisti sijaitseva creA-sitoutumiskohta on hajotettu, mikä mahdollistaa promoottorivariantin toiminnan sellaisen glukoosikonsentraation läsnäollessa, joka on riittävä ylläpitämään tietyn rihmasienikannan kasvua.

Keksinnön tarkoituksia varten promoottorivariantit voidaan periaatteessa kehittää minkä tahansa sellaisen glukoosirepressoidun rihmasienigeenin promoottorista, jonka promoottorisekvenssiin sisältyy creA-sitoutumisdomeeni. Luonteenomaista creA-sitoutumisdomeenille on GC-rikas kohta, ja se tunnistetaan yksityiskohtaisemmin nukleotidialueena, joka sisältää vähintään kuusi G- tai C-tähdettä 10 viereisen nukleotidin pätkässä. Spesifinen creA-sitoutumisdomeenin sekvenssi voi vaihdella laajalti tämän parametrin sisällä, ja se voi esimerkiksi koostua kokonaan vierekkäisistä G/C-tähteistä, esim. GCGGGGC tai G/C-tähteistä, jotka katkaisee yksi tai useampi A- ja T-tähde.

Promoottorissa oleva creA-sitoutumisdomeeni sijaitsee tyypillisesti ylävirtaan kutakin tarvittavaa säätelyelementtiä, so. translationaalisia ja transkriptionaalisia aloituskohtia. Niillä glukoosirepressoiduilla rihmasienigeeneillä, joiden sekvenssit on julkaistu, promoottorissa olevan creA-sitoutumisdomeenin tunnistaminen on tietenkin helppo tehtävä, jossa paikallistetaan sekvenssissä oleva GC-rikas sekvenssi. Niillä geeneillä, joita on kloonattu, mutta joiden sekvenssiä ei vielä tunneta, creA-sitoutumisdomeeni voidaan paikallistaa geenin 5'-ei-transloidun

alueen sekvensoinnin jälkeen käyttämällä alalla vakiintuneita tekniikoita. Muilla glukoosin säätelemillä geeneillä on tarpeellista kloonata ja sen jälkeen sekvensoida niiden 5'-ei-transloitu alue, mutta myös tämä voidaan aikaansaada molekyylibiologian alalla hyvin vakiintuneiden menetelmien mukaisesti.

Niistä glukoosirepressoiduista promoottoreista, jotka sisältävät creA-sitoutumisdomeenin, saadaan glukoosin läsnäollessa toiminnallisia promoottorivariantteja hajottamalla creA-sitoutumisdomeeni. Hajotus voidaan suorittaa joko poistamalla creA-sitoutumiskohta summittaisesti ja poistamalla alue siitä 5'-suuntaan valikoivasti creA-sitoutumisdomeenin promoottorin sisältä tai sen toiminnallisesta osasta, tai edullisemmin korvaamalla yksi tai useampi creA-sitoutumisdomeenissa olevista G/C-tähteistä. Korvaustähteet ovat mielellään adeniini ja tymiini. Summittaiseen ja valikoivaan poistamiseen verrattuna G/C-korvauksella on se etu, että muiden promoottorivariantissa olevien säätelydomeenien avaruudellinen suhde ja toiminta säilyvät. Tämä voi olla erityisen tärkeää tapauksessa, jossa ilmentymisen säätelyalueet sijaitsevat promoottorissa creA-sitoutumiskohdasta ylävirtaan.

Joissain tapauksissa promoottorit voivat sisältää useamman kuin yhden creA-sitoutumiskohdan, ja niiden glukoosirepression eliminoimiseksi on suotavaa hajottaa jokainen promoottorissa oleva creA-sitoutumiskohta. Tämä voidaan aikaansaada, kuten juuri mainittiin, joko näiden paikkojen poistamisella, näissä kohdissa olevien tähteiden korvaamisella tai käyttämällä näiden hajotustekniikoiden yhdistelmää.

Keksinnön spesifisten suoritustapojen mukaisesti promoottorivariantti on jäljempänä identifioidun *Aspergillus nidulansin* promoottorin variantti, jossa jäljempänä esitetty creA-sitoutumiskohta hajotetaan nukleotidikorvauksella:

Geeni	5'-reuna	creA-kohta	3'-reuna	sijainti
alcA[1]	GCACGAGG	GCGGGG	CGGAAATT	-302
	ACAAACGA	GCGGGG	CCCCGTAC	-167
aldA[2]	TATCGATC	GCGGGG	ATCCTCAA	-435
	TGGGCACC	GCGGCG	AAGGGGAC	-290
alcR[3]	GCGGAAAT	GCGGGG	GGCGGCCA	-359
amdS[4]	CCAATATA	GCCGGG	TTTTGTTA	-729
prnB[5]	AGCCGTTA	GCGGGA	GGGAATTT	-650

[1]= Gwynne *et al.*, Gene (1987) **51**: 205

[2]= Picket *et al.*, Gene (1987) **51**: 217

[3]= Felenbok *et al.*, Gene (1988) **73**: 385

[4]= Scazzocchio *et al.*, 1992, *supra*

[5]= Sophianopoulou *et al.*, Mol. Microbiol. (1989) **3**: 705

Glukoosin läsnäollessa toiminnallisten promoottorivarianttien muodostaminen voidaan aikaansaada käyttämällä näitä ja muita promoottoreita soveltaen nykyisin tavanomaisia geenimanipulaatiotekniikoita. Esimerkiksi valitun promoottorin creA-sitoutumiskohdan sisältävä alue voidaan poistaa käyttämällä reunustavia restriktiokohtia ja viedä se tämän jälkeen sisään monistamiseen ja sen jälkeiseen geenimanipulaatiotyöhön soveltuvaan vektoriin. Sitten voidaan käyttää kohdennetun mutageneesin tekniikkaa kohteena olevan creA-sitoutumiskohdan hajottamiseen. creA-sitoutumiskohdan ja siitä 5'-suuntaan olevien sekvenssien poistamiseksi voidaan esimerkiksi suunnitella oligonukleotidi, joka panee minkä tahansa halutun restriktiokohdan juuri creA-kohdan 3'-puo-lelle irrottamisen mahdollistamiseksi. Samaa tekniikkaa voidaan käyttää myös nukleotidisubstituution panemiseen creA-sitoutumiskohdan sisällä käyttämällä oligonukleotidia, joka ei sovi (mismatch) haluttuun asemaan, mutta joka on muuten komplementaarinen ja hybridisoituu hajotettavan alueen kanssa. Myös tavanomaista polymeraasiketjureaktion (PCR) tekniikkaa voidaan käyttää yhdes-

sä kohdennetun lähestymistavan kanssa joko koko promoottorin tai sen halutun alueen mutagenisoimiseksi ja monistamiseksi sen jälkeen. Haluttu promoottorivariantti voidaan myös tietenkin syntetisoida *de novo* käyttämällä geenisynteesin alalla ny-kyisin yleisiä menetelmiä. Lyhyesti tämä pitää sisällään sopivasti suojattujen nukleotidireagenssien kytkemisen 3'→ 5' automaattisessa syntetisoijassa ja sen jälkeen polypeptidien, joiden suojaus on poistettu, talteenottamisen gee-lipuhdistuksella. Voidaan käyttää ryhmäligaatio (block li-gation) -lähestymistapaa, jolla "suuri määrä" oligonukleo-tidipareja, pituudeltaan noin 80 nukleotidiin saakka, syn-tetisoidaan ja liitetään oikeassa järjestyksessä ulokekomplementaarisuuden avulla, kuten esimerkiksi Wosnick *et al.*, kuvaavat artikkelissa Gene (1989) **76**: 153. Vaihtoehtoisessa lähestymistavassa haluttu DNA voidaan syntetisoida *in toto* ja sen jälkeen monistaa PCR-tekniikalla käyttämällä menetelmää, jonka ovat kuvanneet esimerkiksi Barnett *et al.*, Nucl. Acids Res. (1990) **18**: 3094.

Kun promoottorivariantti on kerran saatu, sitä voidaan käyttää mitä tahansa proteiinia koodaavan DNA:n ilmentymisen käynnistämiseen rihmasieni-isännässä sellaisten tekniikoiden mukaisesti, jotka ovat jo muutoin rihmasienille vakiintuneita (katso katsaus artikkelista Ballance, Yeast (1986) **2**: 229). Keksintö tarjoaa tähän tarkoitukseen yhdistelmä-DNA-rakenteet, joissa promoottorivariantti on toiminnallisesti kytketty proteiinia koodaavan DNA:n kanssa. Termi "toiminnallisesti kytketty" tarkoittaa sitä, että promoottori on kytketty proteiinia koodaavan DNA:n kanssa tavalla, joka mahdollistaa sen ilmentymisen rihmasieni-isännässä. Tämän selityksen tarkoituksiin proteiinia koodaavan DNA:n ymmärretään sisältävän translaation aloituskodonin ja translaation lopetuskodonin; ja muutoin se koodaa joko halutun proteiinin lopputuotetta *per se*; fuusioproteiinia, jossa haluttu proteiini tuotetaan ensin pilkottavassa yhdistelmässä sellaisen kantajaproteiinin

kanssa kuin esim. *Aspergillus nigerin* glukoamylaasi; eritettävää esiastetta, jossa halutun proteiinin lopputuote kytketään pilkottavaan signaalipeptidiin, kuten esimerkiksi sellaiseen signaalipeptidiin, joka liittyy normaalisti *Aspergillus*-proteiiniin, esim. glukoamylaasiin, tai mihin tahansa niiden toiminnalliseen ekvivalenttiin.

Promoottorin ja proteiinia koodaavan DNA:n lisäksi tämän keksinnön mukaiset rakenteet voivat sisältää myös transkription terminaattorin proteiinia koodaavan DNA:n 3'-asemassa, vaikkakin kokemus on osoittanut, että sellaiset terminaattorit eivät ole rakenteiden välttämättömiä komponentteja. Sellaisia transkription terminaattoreita voidaan saada 0,5-1,0 kb:n fragmentteina *Aspergillus*-geenien 3'-ei-koodaavasta alueesta, esim. *Aspergillus nigerin* glukoamylaasigeenistä.

Kun rakenne on kerran saatu, se voidaan panna joko lineaarisessa muodossa tai plasmidimuodossa, esim. pUC-pohjaisessa tai muussa vektorissa, valikoituun rihmasieni-isäntään käyttämällä sellaista tekniikkaa kuin esimerkiksi DNA-välitteistä transformaatiota, elektroporaatiota, partikkeliruiskupommitusta (particle gun bombardment), protoplastifuusiota ja vastaavaa. Tuloksena saatujen transformanttien valikoinnin mahdollistamiseksi transformaatioon osallistuu tyypillisesti myös valikoitava geenimarkkeri, joka viedään ekspressiokasettiin joko samalla vektorilla tai kotransformaatiolla isäntäkantaan, jossa geenimarkkeri on valikoitavissa. Monia eri markkeri/isäntä-järjestelmiä on saatavissa, mukaan lukien pyrG-, argB- ja niaD-geenit *Aspergillus nidulansin* auksotrofisissa kannoissa käytettäväksi; pyrG- ja argB-geenit *Aspergillus oryzaen* auksotrofeille; pyrG-, trpC- ja niaD-geenit *Penicillium chrysogenumin* auksotrofeille; ja argB-geeni *Trichoderma reesein* auksotrofeille. Vallitsevat valikointimarkkerit, joihin kuuluu amdS, oliC, hyg ja phleo, ovat nykyisin saatavissa

käytettäväksi myös sellaisten rihmasienten kanssa kuin *A. niger, A. oryzae, A. ficuum, P. chrysogenum, Cephalosporium acremonium, Cochliobolus heterostrophus, Glomerella cingulata, Fulvia fulva* ja *Leptosphaeria maculans* (katso Wardin katsaus teoksessa *Modern Microbial Genetics*, 1991, Wiley-Liss, Inc., sivut 455-495).

Transformaation tuloksena saatuja rihmasienikantoja viljellään vielä yhden keksinnön näkökannan mukaisesti kasvua ylläpitävän glukoosikonsentraation läsnäollessa halutun proteiinituotteen saamiseksi. Kannan viljely voidaan suorittaa ilman glukoosinpuuteolosuhteiden perustamistarvetta, koska halutun geenituotteen ilmentymisen aloittavaa promoottorivarianttia ei enää toiminnallisesti ehkäise glukoosin läsnäolo. Niillä promoottoreilla, joiden toimintaa ei muutoin säädellä, halutun proteiinin tuotanto voidaan aikaansaada koko fermentaation ajan. Siitä huolimatta myös vaiheistettu tuotanto voidaan aikaansaada käyttämällä promoottorivariantteja, joita säätelevät muut mekanismit kuin glukoosirepressio. Kuten jäljempänä esimerkein selvitetään, alcA-promoottoria voidaan toiminnallisesti säädellä jopa sen creA-sitoutumiskohdan hajotuksen jälkeen käyttämällä indusointiainetta rajoittamaan proteiinin tuotannon tiettyyn fermentaatiojakson aikaväliin.

Esimerkki 1
alcA-promoottorivariantin muodostaminen

A. nidulansin alcA-geenin promoottoria ehkäisee creA-geenituotteen ja glukoosin yhdistelmä; sitä indusoi myös glukoosinpuuteolosuhteissa alcR-geenituotteen ja indusointiaineen, kuten etanolin, yhdistelmä. Sellaisen alcA-promoottorivariantin konstruoimiseksi, joka toimii *Aspergilluksen* kasvuun riittävissä glukoosikonsentraatioissa, alcA-promoottori saatiin tavalla, jonka ovat selostaneet Gwynne *et al.*, Bio/Technology (1987) 5: 713, ja käsiteltiin kuten jäljempänä on kuvattu.

Kaksi oletettua creA-sitoutumiskohtaa (molemmat GCGGGGC) tunnistettiin ensin sekvenssiskannauksella. Kuten kuvassa 1 esitetään, nämä kohdat sijaitsevat alcA-geenin ATG-aloituskodonista ylävirtaan asemissa -302 ja -167, ja molemmat sijaitsevat sopivasti promoottorin SphI/SplI-alueella. Sellaisen alcA-promoottorin saamiseksi, joka on näissä kohdissa hajotettu nukleotidikorvauksella, promoottorin 160 bp:n fragmentti monistettiin käyttämällä alla mainittuja alukkeita, joille on tehty häntä (tailed):

(Eteenpäin)HindIII SphI -302
5'GACTGACTAAGCTTGCATGCGGAACCGCACGAGGGTACTACGGAAATTGAC 3'
(SEKV. ID NO: 1)

(Käänteinen) EcoRI SplI -167
5'GACTGACTGAATTCCGTACGGGGTAGTACTCGTTTGTGGCTCTCCGTGCG 3'
(SEKV. ID NO: 2)

Ajettiin 25 PCR-monistussykliä menetelmän mukaan, jonka on kuvannut Scharf, 1990, teoksessa "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications". M.A. Innis *et al.*, (toim.), Academic Press. HindIII/EcoRI-hännin varustettu monistettu tuote alakloonattiin sitten pTZ18R-kiinnitysvektoriin ja oikea, vaihteleva sekvenssi varmistettiin DNA-sekvenssianalyysillä. Kiinnitysvektori ja täysipituinen alcA-geeni (pUC8-pohja) pilkottiin sitten kukin restriktioentsyymeillä SphI ja SplI ja liitettiin sitten valikoivasti sellaisen plasmidin palcA^{var}-2EB muodostamiseksi, jossa villityypin alcA-promoottorin SphI/SplI-alue on korvattu varianttialueella, joka sisältää mutaatiot kahdessa oletetussa creA-sitoutumiskohdassa. Tällä lähestymistavalla säilytettiin myös alcA-promoottorissa olevien nukleotidien avaruudellinen järjestys. Koska ilmentyminen alcA-promoottorivariantin perusteella vaatii sellaisen alcR-geenin tuotteen aiheuttaman induktion, joka on itse glukoosirepressoitu creA-välitteisellä mekanismilla, käytettiin alcR-tuotetta konstitutiivisesti tuottavaa *Aspergillus nidulans* -kantaa

alcA-geenin ilmentämiseen varianttipromoottorin perusteella. Valikoitu isäntäkanta konstruoitiin Glasgown kaksois-auksotrofista FGSC4 (argB-; ura-) transformoimalla se plasmidilla, joka kantaa *A. nidulansin* argB-geeniä, valikointimarkkeria ja ekspressiokasettia, jossa alcR-tuotetta koodaava DNA (katso Felenbok *et al.*, Gene (1989) **73**: 385) pantiin *A. nidulansin* glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasigeenin konstitutiivisen promoottorin ilmentymissäätelyn alaiseksi (katso Punt et al., Gene (1988) **69**: 49). Sellaisten kasettien monikopiointegraation varustamiseksi, jotka kantoivat alcA-promoottorivarianttia, valittiin monia kopioita konstitutiivisesta alcR-geenistä sisältävä kanta, joka nimettiin T2625:ksi (ura$^-$, moninkertainen alcR^c).

Sen jälkeen plasmidi palcA^{var}-2EB pantiin valittuun *A. nidulans* -isäntäkantaan yhdessä markkeriplasmidin pFB94, joka kantaa *Neurospora crassan* pyr4-geeniä (katso Buxton ja Radford, Mol. Gen. Genet. (1983) **190**: 403), kanssa. Transformaatio suoritettiin käyttämällä PEG/$CaCl_2$-välitteistä tekniikkaa Royerin ym., Mol. Gen. Genet. (1991) **225**: 168, selostaman menetelmän mukaan. Oletetut transformantit, jotka sisälsivät pFB94-rakenteen, valikoitiin ensin ilman uridiinia minimialustalla. Sekalaiset itiöt, jotka oli kerätty noin 80 ura$^+$-transformantista (3 mm:n pesäkkeet) yhdellä maljalla, siirrostettiin 50 ml:aan valikoivaa elatusainetta (0,4 % 2-deoksiglukoosia (2-DOG), 1,0 % etanolia, 0,67 % hiivan ravintolientä). Viljelmää inkuboitiin 30 °C:ssa ravistelemalla (200 rpm) 3 päivän ajan. Flokkuloituneet pesäkkeet otettiin talteen nesteviljelmistä ja kus-takin 2-DOG-resistentistä pesäkkeestä valmistettiin yksittäisistä itiöistä saadut isolaatit myöhempää analyysiä varten.

Isäntäkantaa ja transformantteja viljeltiin seuraavaksi 48 tunnin ajan 30 °C:ssa nestemäisessä elatusaineessa, joka sisälsi monia eri täydennysaineita, jotka oli valittu hii-

lenlähteen kasvuvaikutusten tutkimiseksi. Tulokset esitetään jäljempänä taulukossa 1:

Taulukko 1

KANTA	etanoli	glukoosi/ etanoli	2-DOG	2-DOG/ etanoli
Isäntä	++	++++	-	-
transformoitu	++	++++	-	++

Itiösuspensiot siirrostettiin 50 ml:aan nestemäistä elatusainetta, jota oli täydennetty 0,67 % hiiva-typpi-perusalustaa (YNB) ja 1mM uridiinia; sekä valinnaisesti etanolilla (1,0 %), glukoosilla (0,4 %) tai ei-metaboloidulla analogilla, 2-deoksiglukoosilla (2-DOG) (0,4 %).

Kuten taulukko osoittaa, isäntäkanta pystyi kasvamaan joko etanolin tai glukoosin tai näiden yhdistelmän läsnäollessa. Kasvu oli mahdotonta vain ei-metaboloidun glukoosianalogin 2-DOG läsnäollessa, eikä se (isäntäkanta) pystynyt myöskään käyttämään etanolia 2-DOG:n läsnäollessa. Selvästi 2-DOG ehkäisi tehokkaasti villityypin alcA-geenin ilmenemisen, joka on etanolin hyödyntämisessä tarvittava tuote. Toisaalta palcA^{var}-2EB-transformantit pystyivät kasvamaan etanolin läsnäollessa kun sitä oli läsnä joko yhdistelmässä glukoosin kanssa tai kun sitä oli ainoana hiilenlähteenä läsnä (jopa silloin kun glukoosi tai sen 2-DOG-ekvivalentti olivat läsnä), mikä osoittaa ratkaisevasti sen, että etanolin hyödyntämiseen tarvittavan alcA-geenituotteen ilmentyminen välitettiin alcA-promoottorivariantin avulla.

SEKVENSSILISTAUS

(1) YLEISET TIEDOT:

(i) HAKIJA:
(A) NIMI: GIST-BROCADES N.V.
(B) KATU: P.O. Box 1
(C) KAUPUNKI: Delft
(E) MAA: Alankomaat
(F) POSTINUMERO (ZIP): NL-2600 MA
(G) PUHELIN: 31.15.799111
(H) TELEFAX: 31.15.793957

(ii) KEKSINNÖN NIMITYS: Heterologisten proteiinien tuotanto rihmasienissä

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 3

(iv) KONEKOODIMUOTO:
(A) VÄLINETYYPPI: Levyke
(B) TIETOKONE: IBM PC-yhteensopiva
(C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS
(D) OHJELMISTO: PatentIn julkaisulupa #1.0, versio #1.25 (EPO)

(vi) ETUOIKEUSHAKEMUKSEN TIEDOT:
(A) HAKEMUSNUMERO: US 07/988,778
(B) JÄTTÖPÄIVÄ: 10. joulukuuta 1992

(2) SEKVENSSIN ID NO:1 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 51 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleotidi
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: cDNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Kyllä

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:1:

GACTGACTAA GCTTGCATGC GGAACCGCAC GAGGGTACTA CGGAAATTGA C 51

(2) SEKVENSSIN ID NO:2 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 50 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleotidi
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: cDNA

(iii) HYPOTEETTINEN: Kyllä

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:2:

GACTGACTGA ATTCCGTACG GGGTAGTACT CGTTTGTGGC TCTCCGTGCG 50

(2) SEKVENSSIN ID NO:3 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 360 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleotidi
(C) JUOSTEISUUS: kaksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (perimän)

(iii) HYPOTEETTINEN: Ei

(vi) ALKUPERÄ:
(A) ORGANISMI: *Aspergillus nidulans*

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:3:

CGCAGCTCGG GATAGTTCCG ACCTAGGATT GGATGCATGC GGAACCGCAC GAGGGCGGGG 60

CGGAAATTGA CACACCACTC CTCTCCACGC AGCCGTTCCA AGAGGTACGC GTATAGAGCC 120

GTATAGAGCA GAGACGGAGC ACTTTCTGGT ACTGTCCGCA CGGGATGTCC GCACGGAGAG 180

CCACAAACGA GCGGGGCCCC GTACGTGCTC TCCTACCCCA GGATCGCATC CTCGCATAGC 240

TGAACATCTA TATAAAGACC CCCAAGGTTC TCAGTCTCAC CAACATCATC AACCAACAAT 300

CAACAGTTCT CTACTCAGTT AATTAGAACA CTTCCAATCC TATCACCTCG CATCAAAATG 360

PATENTTIVAATIMUKSET:

1. Yhdistelmä-DNA-konstruktio, jossa proteiinia koodaava DNA on kytketty toiminnallisesti sellaisen rihmasienen promoottorivarianttiin, jolla on hajotettu creA-sitoutumiskohta, jolloin mainittu promoottorivariantti välittää mainitun proteiinia koodaavan DNA:n ilmentymisen glukoosin läsnäollessa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdistelmä-DNA-konstruktio, **tunnettu** siitä, että mainittu creA-sitoutumiskohta on hajotettu ja avaruudellisesti säilytetty nukleotiditähteiden korvauksella tässä paikassa.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen yhdistelmä-DNA-konstruktio, **tunnettu** siitä, että nukleotidikorvaukset ovat A:ta tai T:tä.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdistelmä-DNA-konstruktio, **tunnettu** siitä, että mainittu promoottorivariantti on *Aspergillus*-promoottorin variantti.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen yhdistelmä-DNA-konstruktio, **tunnettu** siitä, että mainittu promoottorivariantti on *Aspergillus*-promoottorin alcA, aldA tai alcR variantti.

6. Rihmasienikanta, johon on sisällytetty patenttivaatimuksessa 1 määritelty yhdistelmä-DNA-konstruktio.

7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen rihmasienikanta *Aspergillus*-suvusta.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen rihmasienikanta lajista *Aspergillus nidulans*.

9. Menetelmä halutun proteiinin tuottamiseksi, **tunnettu** siitä, että viljellään patenttivaatimuksessa 5 määriteltyä rihmasienikantaa glukoosin läsnäollessa.

10. *Aspergillus nidulans* -kanta, joka ilmentää alcR-geenituotetta glukoosin läsnäollessa ja joka on sisällyttänyt itseensä yhdistelmä-DNA-konstruktion, jossa proteiinia koodaava DNA on kytketty toiminnallisesti alcA-promoottorin varianttiin, jossa kaikki creA-sitoutumiskohdat on toiminnallisesti hajotettu, jolloin proteiinia koodaavaa DNA:ta ilmennetään silloin, kun mainittua kantaa viljellään glukoosin ja induktorin läsnäollessa.

11. Menetelmä halutun proteiinin tuottamiseksi, **tunnettu** siitä, että viljellään patenttivaatimuksessa 9 määriteltyä *Aspergillus nidulans* -kantaa glukoosin ja induktorin läsnäollessa.

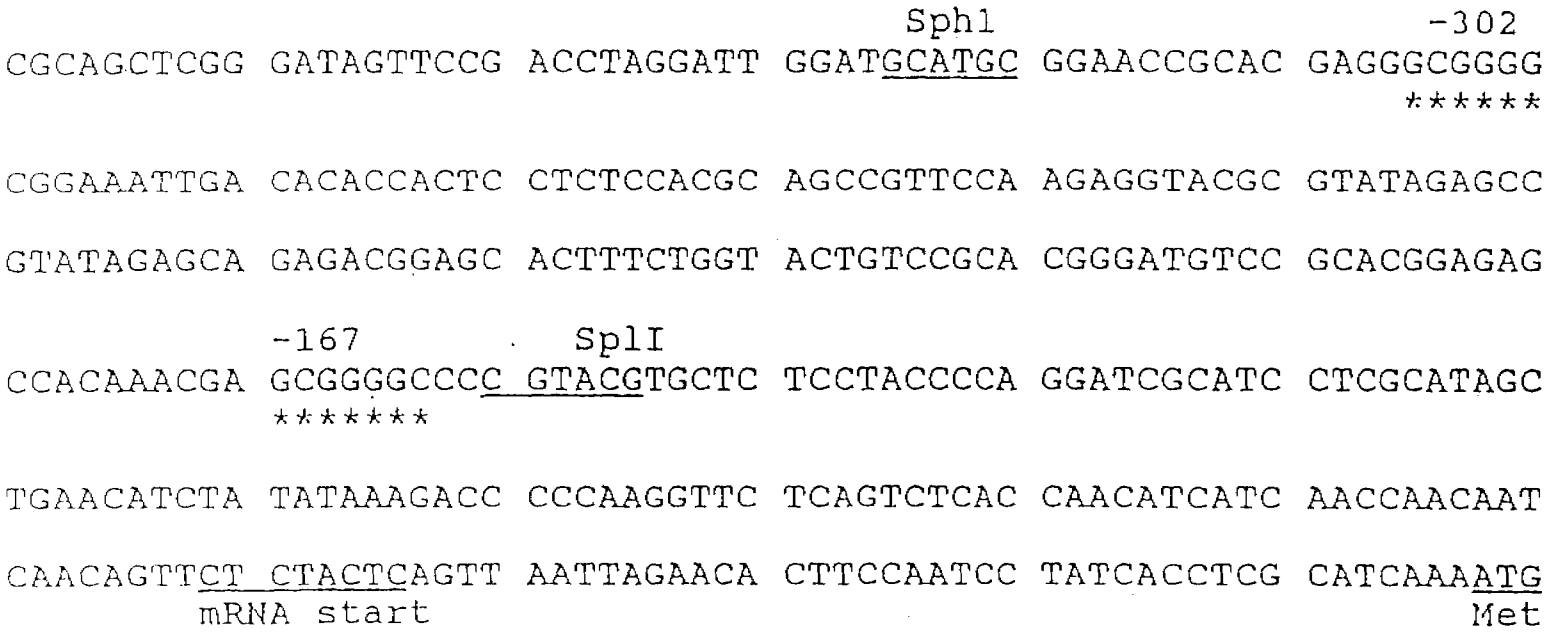

Sph1
-302
CGCAGCTCGG GATAGTTCCG ACCTAGGATT GGATGCATGC GGAACCGCAC GAGGGCGGGG
******
CGGAAATTGA CACACCACTC CTCTCCACGC AGCCGTTCCA AGAGGTACGC GTATAGAGCC
GTATAGAGCA GAGACGGAGC ACTTTCTGGT ACTGTCCGCA CGGGATGTCC GCACGGAGAG
-167
SplI
CCACAAACGA GCGGGGCCCC GTACGTGCTC TCCTACCCCA GGATCGCATC CTCGCATAGC
****
TGAACATCTA TATAAAGACC CCCAAGGTTC TCAGTCTCAC CAACATCATC AACCAACAAT
CAACAGTTCT CTACTCAGTT AATTAGAACA CTTCCAATCC TATCACCTCG CATCAAAATG
mRNA start
Met

FIG. 1

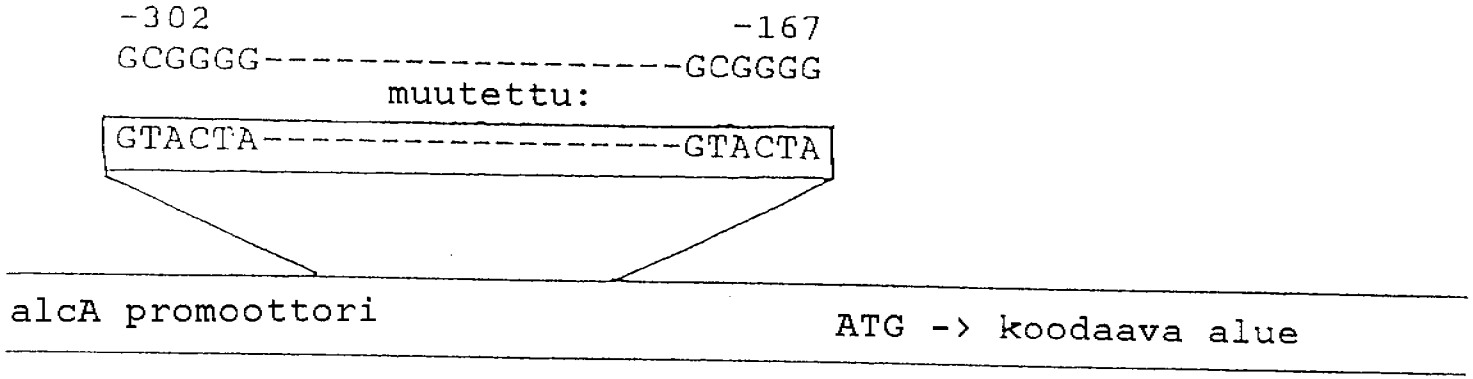

-302
-167
GCGGGG----------GCGGGG
muutettu:
GTACTA----------GTACTA
alcA promoottori
ATG -> koodaava alue

FIG. 2