

3439/92

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



ETÁRI PROTEÁZHIÁNYOS BAKTÉRIUM GAZDASZERVEZET

ELŐHATÁRIKAT

62933

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION, Boston, MA

Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1991. 05. 02.

Elsőbbsége: 1990. 05. 02. (515 940)

Amerikai Egyesült Államok

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US91/03012

A nemzetközi korrekciók száma: WO 91/17247

KIVONAT

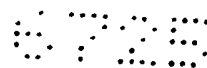
A találmány tárgyát olyan Escherichia coli mutáns törzsek képezik, amely törzsek a mutáció(k) következtében képesek a beléjük klónozott fehérjéket nagyon stabilan kifejezni. A mutációk a proteolitikus út inaktiválásával jönnek létre, és így az idegen fehérjék különösen magas szintű felhalmozódását teszik lehetővé. A mutáns törzsek modell-rendszerként is alkalmazhatók annak vizsgálatára, hogy jelen vannak-e olyan faktorok és más ágensek - beleértve további mutációkat - , amelyek visszafordítják vagy fokozzák e sejtek azon tulajdonságát, hogy a klónozott proteineket igen stabil módon fejezik ki.

Jelentés készült

Bácsi Zoltán

3435/92

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



A

Képviselő:

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA KFT.

Budapest

NSIO 5 C12N 15/09, 15/04

1/20, 1/24

15/40,

COTK 4/00, 15/00

62933

ELJÁRÁSI PROTEÁZHIÁNYOS BAKTÉRIUM GAZDASZERVEZET

EUROPEAN PATENT

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION, Boston, MA

Amerikai Egyesült Államok

Feltalálók:

HUALA Eva, Belmont, MA

AUSUBEL Fredrick M., Newton, MA

Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1991. 05. 02.

Elsőbbsége: 1990. 05. 02. (515 940)

Amerikai Egyesült Államok

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US91/03012

A nemzetközi közzététel száma: WO 91/17247

A találmány tárgyát olyan Escherichia coli mutánsok képezik, amelyek képesek heterológ fehérjét nagy mennyiségben expresszálni.

75824-7177-GI

1. Idegen fehérjék expressziója baktérium sejtekben

A rekombináns DNS-technikában fontos követelmény az, hogy egy klónozott homológ vagy heterológ génnek az expresszióját egy gazdasejtben szabályozni vagy irányítani tudjuk. Az ilyen gén expresszióját befolyásolni képes rekombináns molekulákat, valamint az ilyen molekulák alkalmazásának módszereit Cohen és munkatársai írták le [4 237 224 és 4 468 464 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás], valamint Maniatis és munkatársai [Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)].

Függetlenül attól, hogy a klónozott gén expressziója folytonos vagy befolyásolt, ha a gén expressziójára szükség van, akkor gyakran igen fontos, hogy a kódolt fehérjéből a lehető legtöbbet állítsuk elő.

Egy gazdasejtből kinyert klónozott fehérje mennyisége a gazdasejt fehérje-szintetizáló képessége és a fehérje-lebontó képessége közötti egyensúlyt tükrözi. A baktérium gazdasejtek gyakran lebontják az idegen, klónozott fehérjéket, és gyakran sokkal nagyobb sebességgel, mint amilyen sebességgel a homológ fehérjéket bontják le. Ezért nagyon fontos, hogy azonosítsuk azokat a mechanizmusokat, amelyek minimalizálni képesek ezt a lebontást.

2. Nitrogénáz enzimek Rhizobium meliloti-ban

A nitrogénkötés Rhizobium meliloti-ban és más diazotróf szervezetekben belső, oxigénérzékeny folyamat. A nitrogénáz az oxigén roncsoló hatásától a szimbiotikus csomó-

ban a leghemoglobin védi, amely a csomóban levő bakteroidokat oxigénnel látja el, miközben fenntartja a mikroaerob körülményeket. A nitrogenáz enzim termelődését a jelenlevő oxigén hatékonyan megakadályozza, hiszen a *nifA*-t, a nitrogenáz struktúrgének transzkripciósz aktivátorát az oxigén két szinten is szabályozza. A *Rhizobium meliloti* *NifA* génjének transzkripcióját a környezeti érzékelő/szabályozó pár, a *fixLJ* szabályozza, amely a *nifA* transzkripciót csak mikroaerob körülmények között serkenti. [Ditta, G. et al., *Journal of Bacteriology*, 169, 3217-3223 (1987); David M. et al., *Cell*, 54, 671-683 (1988)]. Emellett a *nifA* géntermék aerob körülmények között önmagában inaktív [Fischer, H.-M. et al., *Molecular and General Genetics*, 209, 621-626 (1987); Beynon, J.L. et al., *EMBO J.* 7, 7-14 (1988); Huala et al., *Journal of Bacteriology*, 171, 3354-3365 (1989)]. A *Rhizobium meliloti* *NifA* gén aerob körülmények közötti inaktiválódása akkor is megtörténik, ha a *NifA* gént *Escherichia coli*-ban expresszáljuk, ami arra utal, hogy vagy a *NifA* oxigénnel való inaktiválódásához nincs szükség a gazdasejtben jelenlevő faktorra, vagy ezek a faktorok mind a *Rhizobium meliloti*-ban, mind az *Escherichia coli*-ben megtalálhatók. Ezzel szemben a szabadon élő diazotróf *Klebsiella pneumoniae* csak akkor érzékeny oxigénre, ha a *nifL* jelen van, ami egyszerre íródik át a *nifA*-val *Klebsiella pneumoniae*-ben, de amelynek semmilyen homológja nem található meg semmilyen nitrogénkötő fajban. Az teljesen tisztázatlan, hogy a *nifL* termék miképpen módosítja a *NifA* aktivitását *Klebsiella pneumoniae*-ben az oxigénszintre adott válaszként.

A *Rhizobium meliloti* NifA-val végzett korábbi munkák igazolták, hogy az aminosav szekvenciában az N-terminális részen végzett kis változtatás drasztikus hatással lehet a NifA akkumulálódására, ha *Escherichia coli*-ban expresszáljuk [Huala et al., *Journal of Bacteriology*, 171, 3354-3365 (1989)]. Az első leolvasási fázisba eső AUG kodonról átíródó NifA (NifA-AUG1) nagyon alacsony szinten akkumulálódik, ha a sejteket aerob körülmények között növesztjük, és kicsit magasabb szintet ér el, ha 1 % oxigén jelenlétében növesztjük a sejteket. Ezzel szemben számos variáns NifA, amelyeknek megváltozott az N-terminális szekvenciája, magas szinten akkumulálódik *Escherichia coli*-ban aerob, illetve mikroaerob növesztési körülmények között, a legnagyobb valószínűséggel azért, mert különböző a stabilitásuk [Huala et al., *Journal of Bacteriology*, 171, 3354-3365 (1989)]. Valószínűnek tűnik, hogy ez a stabilitásbeli különbség egy, az *Escherichia coli*-ban jelen levő, de a *Rhizobium meliloti*-ból hiányzó faktor hatásának köszönhető, mivel a *Rhizobium meliloti*-ban az akkumulációban nem figyelhető meg különbség a NifA különböző formái között. Azonban az *Escherichia coli*-ban nem azonosították még azokat a faktorokat, amelyek a NifA-AUG1 transzkripció aktivitás gyors lebomlását okozzák oxigén jelenlétében. Ha ezeket a faktorokat azonosítani vagy inaktíválni lehetne, akkor az *Escherichia coli* gazdasejtek képesek lennének nagyon stabil módon fenntartani az expresszált fehérje megnövekedett szintjét.

Felismerve annak a nagy jelentőségét, hogy ha *Escherichia coli*-ban azonosítjuk azt a bioszintézis utat,

amely a NifA-AUG1 transzkripciós aktivitás gyors csökkenését okozza oxigén jelenlétében, elhatároztuk, hogy azonosítjuk azokat a *Escherichia coli* faktorokat, amelyek befolyásolják a NifA aktivitás csökkenését magas oxigén-koncentráció mellett, akár úgy, hogy csökkentjük a NifA akkumulációt, akár úgy hogy hozzájárulunk a NifA inaktiválódásához. Tn5 mutagenizist végeztünk *Escherichia coli*-ban, és olyan mutánsokat izoláltunk, amelyek aerob növesztési körülmények között meg-növekedett NifA-AUG1 aktivitást mutattak. Ezen vizsgálatok során olyan *Escherichia coli* mutáns gazdasejteket azonosítottunk, amelyeknek megvan az a képességük, hogy a klónozott fehérjéket nagyon stabil módon expresszálják.

A mellékelt 1. ábra a Tn5 inszerciók három csoportba sorolását mutatja. Az LC2-LC25 törzsekből izolált és EcoRI restriktációs enzimmel emésztett DNS-ek Southern blot-tal való vizsgálata, próbaként Tn5-öt használva. A molekulatömegeket kilobázisban adjuk meg a jobboldalon. A nyilak a snoA (A), snoB (B) és snoC (C) lókuszokba való inszerciót mutatják.

A 2. ábra az LC4, LC6, LC17, LC23 és LC25 törzsekből izolált és EcoRI (A), illetve EcoRV (B) restriktációs enzimmel emésztett DNS-ek Southern blot vizsgálatát mutatja, próbaként Tn5-öt használva. 1. sáv: LC4 (snoB); 2. sáv: LC6 (snoB); 3. sáv: LC17 (snoA); 4. sáv: LC23 (snoB); 5. sáv: LC25 (snoB). Az LC17-es törzset, amelyet eredetileg úgy osztályoztunk, hogy a snoB pozícióban tartalmazzon inszerciót (1. ábra), újra be kellett sorolni mint snoA inszerciót tartalmazó törzset, ennek a kísérletnek a következtében. A molekulatömegeket kilobázisban adjuk meg a jobboldalon.

A 3. ábra a snoB inszerciók pozícióját mutatja a SalI restrikciós hasítási helyhez viszonyítva az alaS-ben. LC4(1), LC6(2), LC23(3) és LC25(4) törzsekből izolált, SalI restrikciós enzimmel emésztett DNS elemzése Southern blot-tal, Tn5-öt használva próbaként. A molekulatömegeket a jobboldalon kilobázisban adjuk meg.

A 4. ábra a Tn5 pozícióját mutatja az LC24 fizikai térképén. BamHI(1), HindIII(2), EcoRI(3), EcoRV(4), BglIII(5), KpnI(6), PstI(7) és PvuII(8) restrikciós enzimmel emésztett MC1061 DNS Southern blot-tal való elemzése, az LC24-ből izolált, a Tn5 inszerciót határoló szekvenciát használva próbaként. Azt a csíkot választjuk mindegyik enzimnél, amelyik a legintenzívebb hibridizációs jelet adja, és ezeknek a fragmenteknek a méretét arra használjuk, hogy meghatározzuk a Tn5 inszerció helyét a snoC-ben a fizikai térképén [Kohara, Y. et al., Cell, 50, 495-508 (1987)]. A molekulatömegeket a jobboldalon adjuk meg kilobázisban.

Az 5. ábra a Rhizobium meliloti NifA-AUG1 immunológiai kimutatását mutatja MC1061-ben és a mutáns származékokban, amelyek 1 % vagy 21 % oxigén jelenlétében növekedtek.

(A) 1 % oxigén mellett nőtt sejtek.

C sáv: csak vektort tartalmazó MC1061 (nincs NifA);

1. sáv: MC1061 pEH32 (NifA-AUG1) vektorral;

2. sáv: HA62 (lon) pEH32-vel;

3. sáv: LC23 (snoB) pEH32 vektorral;

4. sáv: LC24 (snoC) pRH32 vektorral;

(B) 21 % oxigén mellett nőtt sejtek.

C sáv: csak vektort tartalmazó MC1061 (nincs NifA);

1. sáv: MC1061 pEH32 (NifA-AUG1) vektorral;
2. sáv: HA62 (lon) pEH32-vel;
3. sáv: LC23 (snoB) pEH32 vektorral;
4. sáv: LC24 (snoC) pRH32 vektorral.

A molekulatömeg markerek pozícióját a jobboldalon jelöltük (x 0,001).

A 6. ábra a Rhizobium meliloti NifA-deltaN immunológiai kimutatása MC1061-ben és a mutáns származékokban, amelyek 1 % vagy 21 % oxigén jelenlétében növekedtek.

(A) 1 % oxigén mellett nőtt sejtek.

C-sáv: csak vektort tartalmazó MC1061 (nincs NifA1 vektor);

1. sáv: MC1061 pEHdeltaRI (NifA-AUG1) vektorral;
2. sáv: HA62 (lon) pEH32-vel;
3. sáv: LC23 (snoB) pEHdeltaRI vektorral;
4. sáv: LC24 (snoC) pEHdeltaRI vektorral;

(B) 21 % oxigén mellett nőtt sejtek.

C sáv: csak vektort tartalmazó MC1061 (nincs NifA);

1. sáv: MC1061 pEHdeltaRI (NifA-deltaN) vektorral;
2. sáv: HA62 (lon) pEHdeltaRI-vel;
3. sáv: LC23 (snoB) pEHdeltaRI vektorral;
4. sáv: LC24 (snoC) pEHdeltaRI vektorral.

A molekulatömeg markerek pozícióját a jobboldalon jelöltük (x 0,001).

A 7. ábra a Rhizobium meliloti NifA-AUG1 immunológiai kimutatása lon, snoB lon, snoC lon mutánsokban, amelyek 1 % vagy 21 % oxigén jelenlétében nőttek.

(A) 1 % oxigén mellett nőtt sejtek.

1. sáv: HA62 (lon) pEH32 (NifA-AUG1) vektorral;
2. sáv: HA63 (snoB lon) pEH32 vektorral;
3. sáv: HA64 (snoC lon) pEH32 vektorral;

(B) 21 % oxigén mellett nőtt sejtek.

1. sáv: HA62 (lon) pEH32 (NifA-AUG1) vektorral;
2. sáv: HA63 (snoB lon) pEH32 vektorral;
3. sáv: HA64 (snoC lon) pEH32 vektorral.

A molekulatömeg markerek pozícióját a jobboldalon jelöltük (x 0,001).

A 8. ábra a Rhizobium meliloti NifA-deltaN immunológiai kimutatása lon, snoB lon, snoC lon mutánsokban, amelyek 1 % vagy 21 % oxigén jelenlétében nőttek.

(A) 1 % oxigén mellett nőtt sejtek.

1. sáv: HA62 (lon) pEHdeltaRI (NifA-deltaN) vektorral;
2. sáv: HA63 (snoB lon) pEHdeltaRI vektorral;
3. sáv: HA64 (snoC lon) pEHdeltaRI vektorral;

(B) 21 % oxigén mellett nőtt sejtek.

1. sáv: HA62 (lon) pEHdeltaRI (NifA-deltaN) vektorral;
2. sáv: HA63 (snoB lon) pEHdeltaRI vektorral;
3. sáv: HA64 (snoC lon) pEHdeltaRI vektorral.

A molekulatömeg markerek pozícióját a jobboldalon jelöltük (x 0,001).

A 9. ábra a β -galaktozidáz expresszióját mutatja a lacZ promoterről. Nátrium-dodecilszulfát (SDS) poli(akrilamid) gél az összfehérjéről.

- (A) 1 % oxigén mellett nőtt sejtek;
- (B) 21 % oxigén mellett nőtt sejtek.
- 1. sáv: MC1061 pMB210 vektorral;
- 2. sáv: MC1061 pLAC vektorral;
- 3. sáv: LC12 pLAC vektorral;
- 4. sáv: LC23 pLAC vektorral;
- 5. sáv: LC24 pLAC vektorral.

A β -galaktozidáz pozícióját nyíl jelzi. A molekula-tömeg markerek pozícióját a jobboldalon jelöltük ($\times 0,001$).

A 10. ábra a NifA stabilitását mutatja MC1061 törzs-ben és a mutáns származékokban: Nátrium-dodecilszulfát-poli-(akril-amid) gélelektroforézis (SDS-PAGE) az immunológiailag kicsapott NifA-vel. Előtte 2-perces jelölés [^{35}S]-metionin-nal, majd a jelzett metionin kiűzése 0-6 óra hosszat főlős-legben alkalmazott jelöletlen metioninnal. A kiűzés idejének hosszát az egyes sávok tetején órákban adjuk meg.

- C-sáv: MC1061 pEHdeltaRI nélkül (nincs NifA-deltaN);
- (I): MC1061 pEHdeltaRI vektorral;
- (II): HA62 (lon) pEHdeltaRI-vel;
- (III): LC23 (snoB) pEHdeltaRI-vel;
- (IV): LC24 pEHdeltaRI-vel;
- (V): HA63 (lon snoB) pEHdeltaRI-vel;
- (VI): HA64 (lon snoC) pEHdeltaRI-vel.

A molekulatömeg markerek pozícióját a jobboldalon jelöltük ($\times 0,001$).

A 11. ábra a NifA-deltaN felezési ideje a vad típusú és a mutáns törzsekben. A NifA mennyiségét a 10. ábrán lát-ható egyes NifA csíkoknál 1000 percenként megfigyelt bomlási

események számának természetes logaritmusával adjuk meg.

- (A): MC1061;
- (B): HA62 (lon);
- (C): LC23 (snoB);
- (D): HA63 (lon snoB);
- (E): LC24 (snoC);
- (F): HA64 (lon snoC).

I. Definíciók

Leírásunkban számos, a rekombináns DNS (rDNS) technikában használt szakkifejezést alkalmazunk. Abból a célból, hogy biztosítsuk a leírás és az igénypontok egyértelmű érthetőségét, beleértve ezeknek a szakkifejezéseknek az értelmezését is, az alábbi definíciókat adjuk meg.

Gén: DNS szekvencia, amely egy RNS polimeráz számára templatként szolgál. Egy génről átíródó RNS kódolhat vagy nem kódolhat fehérjét. Azt az RNS-t, amely egy fehérjét kódol, hírvivő RNS-nek (mRNS) nevezzük.

A "komplementer DNS" vagy "cDNS" gén szakkifejezés az mRNS-ről reverz transzkripcióval szintetizált rekombináns génekre vonatkozik.

Klónozó hordozó: plazmid vagy fág DNS, illetve egyéb DNS szekvencia, amely képes autonóm módon replikálódni egy gazdasejtben, és amelyet egy vagy egy kisszámú endonukleáz felismerési hely jellemez, amelyeknél ez a DNS szekvencia elhasítható meghatározott módon, anélkül hogy lényeges biológiai funkcióját elveszítené, és amelybe DNS építhető be, abból a célból, hogy ott replikálódjon és szaporodjon. A

klónozó hordozó tartalmazhat még egy olyan genetikai markert is, amely alkalmas arra, hogy a klónozó hordozóval transzformált sejtet azonosítani tudjuk. A marker lehet például tetraciklin, kanamicin vagy ampicillin rezisztencia. A "klónozó hordozó" szakkifejezés helyett néha a "vektor" szakkifejezést használjuk.

Expressziós hordozó: egy klónozó hordozóhoz hasonló hordozó vagy vektor, azzal a különbséggel, hogy képes egy bele klónozott gént expresszálni, megfelelő gazdaszervezetbe való transzformálás után. A klónozott gént általában bizonyos kontroll szekvenciák, azaz promoterek szabályozása alá helyezzük (azaz működés szempontjából hozzákapcsoljuk). Az expressziós kontroll szekvenciák változóak, attól függően, hogy a vektort arra tervezték, hogy a beépített gént folyamatosan vagy szabályozott módon expresszálja, és emellett tartalmazhat transzkripciós elemeket is, például terminációs szekvenciákat, azaz olyan szekvenciákat, amelyek fokozzák az mRNS transzkripcióját, és olyan szekvenciákat, amelyek elősegítik a fehérje szekrécióját.

II. A találmány szerinti mutánsok génsebészete

A találmány tárgyát stabil *Escherichia coli* gazdaszövet-vonalak képezik, amelyek képesek replikálódni és folyamatosan szaporodni megfelelő tenyésztő táptalajban és külső körülmények között. Emellett ezek a gazdasejtek olyan mutációkat tartalmaznak, amelyek inaktiválják a proteolitikus bioszintézis utakat, és lehetővé teszik, hogy az idegen fehérjék nem várt nagy mennyiségben akkumulálódjanak. Ezek a

sejtek emellett képesek arra is, hogy a mutált gének tisztításához és klónozásához szolgáltatassák a nyersanyagot, amely gének az inaktivált proteolitikus bioszintézis utakért felelősek. Emellett ezek a sejtek modell-rendszerként is működnek ahhoz, hogy vizsgáljuk faktorok és egyéb ágensek jelenlétét, beleértve a további mutációkat is, amelyek visszafordíthatják vagy fokozhatják ezeknek a sejteknek az öröklött képességét arra, hogy a klónozott fehérjéket nagyon stabil módon expresszálják.

A találmány szerinti sejtvonalat az American Type Culture Collection-nél helyeztük letétbe (12303 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA) 1990. május 1-jén. Az LC24 gazdasejt, amely a snoC mutációt tartalmazza, az ATCC 55040 letéti számot kapta.

A találmány tárgyát olyan baktérium gazdasejt képezi, amely a természetes snoC génben mutációt tartalmaz, illetve a génnek a szabályozó részeiben tartalmazza a mutációt. Ez a mutáció olyan gazdasejtet eredményez, amely defektív az idegen fehérjék lebontására használt proteolitikus bioszintézis utat illetően, és amely, ennek a mutációnak a következtében, meglepő mennyiségű ilyen idegen fehérjét halmoz fel.

A találmány tárgyát továbbá olyan baktérium gazdasejt képezi, amely egy kettős mutáns és a mutációt a természetes lon, valamint a természetes snoB génben tartalmazza. Ez a kettős mutáció szintén olyan gazdasejtet eredményez, amely az idegen fehérjék lebontására használt proteolitikus bioszintézis útban defektív, és amely, az ilyen mutációk kö-

vetkeztében, meglepő mennyiségű ilyen idegen fehérjét halmoz fel.

Két különböző *Escherichia coli* sno (a rövidítés jelentése: a NifA stabilitása oxigén jelenlétében) mutáns csoportot a találmány szerinti módszerrel lehet azonosítani, mint amelyek meglepő stabilitást biztosítanak az idegen fehérjéknek *Escherichia coli* gazdasejtekben. Az első csoportba az *Escherichia coli* lon lókuszában kettős mutációt tartalmazó mutánsok tartoznak. A második csoportba az *Escherichia coli* snoC lókuszában egyetlen mutációt tartalmazó mutáns tartozik. Mind a snoB lon dupla mutánsok mind a snoC szimpla mutánsok olyan gazdasejteket eredményeznek, amelyek kevésbé hajlamosak az idegen fehérjék lebontására.

A találmány szerinti mutánsok egy szelekciós séma alapján azonosíthatók, amely olyan rekombináns konstrukciót alkalmaz, amely egy NifA-szabályozott promotert tartalmaz (*Rhizobium meliloti* nifH), egy riporter génhez, a lacZ-hez fúzionáltatva. A gazdasejt, az *Escherichia coli* MC1061 törzs, amelyet ezzel a konstrukcióval transzformáltunk, nagyon gyengén nő laktóz minimál táptalajon, az aktív NifA távollétében. Ennélfogva, ha a NifA nem expresszálódik, vagy másképpen van inaktiválva, vagy nincs jelen a gazdasejtben, akkor a gazdasejt nagyon gyengén nő laktóz minimál táptalajon. A nagyon gyenge növekedés alatt azt értjük, hogy a vad típusú MC1061 alig látható telepeket eredményez 84 óra hosszúságú 28 °C-on növesztett sejteknél.

A találmány szerinti mutánsok előállításához az MC1061 *Escherichia coli* törzset, amely kanamicin rezisztens-

cia gént, a pEH32 lacZ-nifA expressziós plazmidot és a pMB210 nifH-lacZ riporter gént tartalmazza, mutagenizálhatjuk például Tn5-tel, majd laktóz minimál táptalajra szélesztjük. A megnövekedett NifA aktivitással rendelkező mutánsok, amelyek fokozottabban képesek aktiválni a nifH-lacZ fúziót, nagyobb telepekként jelennek meg a mikrotelepek hátterében. Nagy kanamicin rezisztens telepek izolálhatók oly módon, hogy laktóz minimál táptalajon újra szélesztjük őket, és a nagy méretüket úgy igazoljuk, hogy mindegyiket laktóz minimál táptalajra szélesztjük, és a vad típusú, a pEH32 és pMB210 vektorokat tartalmazó MC1061 törzshöz hasonlítjuk őket. Az MC1061 mutánsokban levő plazmidokon a Tn5 inszerció hiányát úgy lehet igazolni, hogy minden egyes mutánsból plazmidot izolálunk, és *Escherichia coli* MC1061 törzsbe transzformáljuk. Ha nem keletkeznek kanamicin rezisztens telepek, akkor a Tn5 inszerció a kromoszómán található.

A mutáció helyének (azaz a Tn5 mutáció helyének) azonosításához az egyes mutáns törzsekből a szakterületen jártas szakember számára ismert módszerekkel kivonjuk a kromoszomális DNS-t, restriktációs enzimmel emésztjük és Southern blot-tal elemezzük, megfelelő próba alkalmazásával. A Tn5 mutációval létrehozott mutánsokhoz Tn5 próbát használunk. Ha a gazdasejteket kémiai mutagenizáljuk, akkor a mutáció helyét kémiai szekvenálással lehet meghatározni.

A Tn5 mutációt a fentiek szerint alkalmazva olyan mutánsokat találtunk, amelyek a gazdasejt genomjában három különböző EcoRI fragmenszen helyezkednek el. Ezeket snoA mu-

tánsoknak (1. csoport), snoB mutánsoknak (2. csoport) vagy snoC mutánsoknak (3. csoport) nevezzük. Emellett, amint azt az alábbiakban ismertetjük, néhány esetben dupla mutánsokat is előállítottunk.

A mutációk hozzávetőleges genetikai pozícióját Hfr térképezéssel határozhatjuk meg. A találmány szerinti snoA mutáció 6 és 13 perc között, a találmány szerinti snoB mutáció 23 és 30 perc között, a találmány szerinti snoC mutáció pedig 51 és 61 perc között van a genetikai térképen [Bachman, B.J. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, F.C. Neidhardt, szerk., II 807-806, (1987), Am. Soc. Microbiology, Washington].

Az expresszált fehérje oxigénnel szemben mutatott stabilitásának vizsgálatára a sno mutánsokat, amelyek a pEH32 (NifA-AUG1) és pMB210 (nifH-lacZ) vektorokat tartalmazák, LB táptalajon növesztjük 16 órán át folyamatosan 1 % oxigént vagy 16 % oxigént áramoltatva át a tenyészetben, majd mérjük β -galaktozidáz aktivitást, amely a nifH-lacZ riporter fúzióról expresszálódik. Ha 21 % oxigén mellett növesztjük, akkor a találmány szerinti mutánsokban a β -galaktozidáz aktivitás körülbelül tízszer olyan magas, mint a vad típusú MC1061 törzsben, amely a pEH32 és pMB210 vektorokat tartalmazza. 1 % oxigén mellett a snoA és snoC mutánsokban az MC1061 törzshöz viszonyítva a β -galaktozidáz aktivitás valamivel magasabb, míg a snoB mutánsokban nincs relatív β -galaktozidáz aktivitás növekedés.

Az Mph82-ről származó lon::Tn10 inszerció transzdukálható szimpla mutáns gazdasejtekbe, például LC24-be és

LC23-ba, hogy dupla mutáns törzseket hozzunk létre [HA63 (lon snoB) és HA64 (lon snoC)]. Ezeket a dupla mutánsokat transzformálhatjuk pEH32 vagy pEHdeltaRI vektorokkal, és a NifA akkumulációja figyelhető meg.

A mutációk természetének és szekvenciájának meghatározásához a Tn5 inszerciót a környezetében levő DNS-sel együtt szubklónozzhatjuk az egyes mutánsokból. A mutáció, amely az LC12-ben a snoA fenotípust biztosítja, körülbelül 55 kb a proC-től, a lon génben, amely az La proteázt kódolja. A mutáció, amely az LC23 gazdasejtben a snoB fenotípust biztosítja, körülbelül 160 bázispár távolságban helyezkedik el az alaS terminációs kodonja után, amely az alanil tRNS szintetázt kódolja. A mutáció, amely az LC24 gazdasejtben a snoC fenotípust biztosítja, körülbelül 10 kb távolságban helyezkedik el a nirR lókusztól (29,4 perc), a rac irányában.

Egy mutánsnak az idegen fehérjét stabilan expresszáló képessége oly módon határozható meg, hogy mérjük a fehérje szintjét a gazdasejtekben, a fehérje elleni antitestekkel.

III. Az expresszálandó fehérjék génsebészete a találmány szerinti mutánsokban

Fehérje-szekvenciák génsebészeti úton való előállítására szolgáló eljárást, a találmány szerint megkönnyítjük, ha olyan genetikai szekvenciákat klónozzunk, amelyek képesek a kívánt fehérjét kódolni, és az ilyen genetikai szekvenciákat expresszáljuk. Amint az alábbiakban alkalmazzuk, a "genetikai szekvencia" szakkifejezés nukleinsav molekulára vo-

natkozik (előnyösen DNS-re). A kívánt fehérjét kódoló genetikai szekvenciák különböző forrásból származnak. Ezek közé tartozik a genomiális DNS, cDNS, szintetikus DNS, illetve az előbbiek kombinációja.

Ha genomiális DNS-t használunk a kódoló szekvencia forrásaként, akkor az vagy tartalmaz természetes intront, vagy nem. Továbbá, az ilyen genomiális DNS megkapható az 5' promoter régiójával együtt és/vagy a 3' transzkripció terminációs régióval együtt. Attól függően, hogy a gazdasejt mennyire képes felismerni a transzkripció és/vagy transzlációs szabályozó szekvenciákat, amelyek a kívánt mRNS és fehérje expressziójához kötődnek, a természetes gén 5' és/vagy a 3' nem-átírózó régióit és/vagy az mRNS 5' és/vagy 3' nem-transzlálódó régióit megtarthatjuk és a transzkripció, transzlációs szabályozásban alkalmazhatjuk.

A genomiális DNS-t bármely sejtéből ki lehet vonni a szakterületen jártas szakember számára ismert módszerekkel [például: Guide to Molecular Cloning Techniques, S.L. Berger et al., szerk., Academic Press (1987)].

Egy másik módszer szerint a kívánt fehérje mRNS-ét bármely olyan sejtéből előállíthatjuk, amely a fehérjét termeli vagy expresszálja, és cDNS előállítására használhatjuk, a szakterületen jártas szakember számára ismert módszerekkel [például: Guide to Molecular Cloning Techniques, S.L. Berger et al., szerk., Academic Press (1987)]. A használt mRNS preparátumban a kívánt fehérjét kódoló mRNS-t vagy természetes módszerekkel - azaz úgy, hogy olyan sejtekből izoláljuk, amelyek nagy mennyiségben termelik a fehérjét -, vagy in

vitro módszerekkel feldúsítjuk - például az mRNS preparátumokban specifikus szekvenciák mennyiségének feldúsítására általában használt technikával, például szacharóz gradiensen végzett centrifugálással -, illetve használhatjuk a két módszer kombinációját.

Egy vektorba való klónozáshoz az ilyen megfelelő DNS preparátumokat (akár genomiális DNS akár cDNS) véletlenszerűen törjük, vagy enzimatikusan hasítjuk, majd megfelelő vektorokba ligáljuk, hogy egy rekombináns gén (genomiális vagy cDNS) könyvtárat hozzunk létre.

A kívánt fehérjét kódoló DNS szekvenciát egy DNS vektorba építhetjük be szokványos módszerek alkalmazásával, beleértve a tompavég vagy tapadós vég ligálást, restriktációs enzimes emésztést a megfelelő végek előállítása céljából, a tapadós végek megfelelő feltöltését, az alkalikus foszfatázal való kezelést, hogy elkerüljük a nem-kívánt kapcsolódást, valamint a megfelelő ligázokkal való összekapcsolást. Ezeket a technikákat Maniatis és munkatársai írják le [Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982)] és jól ismertek a szakterületen.

A rekombináns könyvtárak átvizsgálhatók, és a kívánt fehérjét kódoló klón azonosítható bármely olyan eszközzel, amely specifikusan szelektálja az ilyen fehérjére specifikus nukleinsavat, úgymint például

a) megfelelő nukleinsav próbával (próbákkal) hibridizálva, amelyek erre a fehérjére specifikus szekvenciát tartalmaznak, vagy

b) hibridizálással szelektált transzlációs elemzéssel, amelyben a természetes mRNS-t, amely a kérdéses klónhoz hibridizál, in vitro transzlációba visszük, majd a transzlációs termékeket tovább jellemezzük, vagy

c) ha a klónozott genetikai szekvenciák önmagukban képesek mRNS expressziójára, a klónt tartalmazó gazdasejt által transzlálódott fehérje terméket immunprecipitációval kicsapva.

A fehérjére specifikus oligonukleotid próbák, amelyeket arra lehet használni, hogy ezt a fehérjét termelő klónt azonosítsuk, a fehérje aminosav szekvenciájáról szerzett ismeretek alapján szintetizálhatók meg. Mivel a genetikai kód degenerált, ezért több mint egy kodon használható egy bizonyos aminosav kódolására [Watson, J.D., Molecular Biology of the Gene, 3rd, Ed., W.A. Benjamin, Inc., Menlo Park, CA (1977) 356-357]. A peptid fragmenteket elemezzük, hogy azonosítsuk azokat az aminosav szekvenciákat, amelyek a legkisebb degenerációval rendelkező oligonukleotidokkal kódolhatók. Ezt előnyösen úgy érhetjük el, hogy azonosítjuk azokat a szekvenciákat, amelyekben az aminosavakat csak egyetlen kodon kódolja.

Jóllehet alkalmanként előfordulhat, hogy egy aminosav-szekvenciát egyetlen oligonukleotid szekvencia kódol, az a gyakori, ha az aminosav-szekvenciát egy sor hasonló oligonukleotid kódol. Lényeges, hogy annak ellenére, hogy ez a csoport olyan oligonukleotid szekvenciákat tartalmaz, amelyek ugyanazt a peptid fragmentet kódolják, és így potenciálisan ugyanazt az oligonukleotid szekvenciát tartalmaz-

zák, mint az a gén, amelyik a peptid fragmentet kódolja, mégis a csoportnak csak egyik tagja tartalmazza azt a nukleotid szekvenciát, amely azonos a gén exonjával, kódoló szekvenciájával. Mivel ez a tag megtalálható a csoportban, és képes a DNS-hez hibridizálódni még a csoport más tagjainak jelenlétében is, ezért lehetséges, hogy az oligonukleotidok frakcionálatlan csoportját ugyanúgy használjuk, mint ahogy egyetlen oligonukleotidot használnánk a peptidet kódoló gén klónozására.

A genetikai kód alkalmazásával [Watson, J.D., Molecular Biology of the Gene, 3rd, Ed., W.A. Benjamin, Inc., Menlo Park, CA (1977) 356-357] egy vagy több különböző oligonukleotid azonosítható az aminosav szekvencia alapján, amelyek közül mindegyik alkalmas lehet arra, hogy a kívánt fehérjét kódolja. Annak a valószínűségét, hogy egy adott oligonukleotid valójában az aktuális fehérje szekvenciáját kódolja, azon az alapon becsülhetjük meg, hogy figyelembe vesszük az abnormális bázispárosodásokat és annak a gyakoriságát, amellyel egy aktuális kodont a sejt használ (egy adott aminosav kódolására) prokarióta sejtekben. Az ilyen "kodonhasznosítási" szabályokat Lathe, R. és munkatársai írják le [Lathe, R. et al., Journal of Molecular Biology, 183, 1-12 (1985)]. A Lathe féle "kodonhasznosítási szabályok" alkalmazásával azonosíthatunk egyetlen oligonukleotid szekvenciát vagy egy oligonukleotid szekvencia csoportot, amelyek azokat az elvileg "legvalószínűbb" nukleotid szekvenciákat tartalmazzák, amelyek képesek a fehérje kódolására.

Az alkalmas oligonukleotidot vagy oligonukleotid keveréket, amely képes a fehérje egy részének kódolására (illetve amelyik komplementer az ilyen oligonukleotiddal, illetve oligonukleotid keverékkel) a szakterületen jártas szakember számára ismert módszerekkel szintetizálhatjuk [lásd például Synthesis and Application of DNA and RNA, S.A. Narang, ed., (1987), Academic Press, San Diego, CA], használhatjuk próbaként a kiválasztott fehérje génjének azonosítására és izolálására a szakterületen jártas szakember számára ismert módszerrel. A nukleinsavak hibridizálására és klónok azonosítására használt technikákat Maniatis és munkatársai írják le [Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)], valamint Hames, B.D. et al. [Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington DC (1985)]. A fentiekben ismertetett génkönyvtárnak azokat a tagjait, amelyek képesek erre a hibridizációra, ezután elemezzük, hogy meghatározzuk a bennük levő fehérjét kódoló szekvencia kiterjedését és természetét.

A keresett DNS-t kódoló szekvencia kimutatásának megkönnyítése céljából a fentiekben ismertetett DNS próbát egy kimutatható csoporttal jelezzük. Az ilyen kimutatható csoport lehet bármely olyan anyag, amely kimutatható fizikai vagy kémiai tulajdonságokkal rendelkezik. A nukleinsav hibridizálás területén ezek az anyagok jól ismertek, és a jelen találmány során bármelyik ilyen módszerben használatos jelölés alkalmazható. Különösen hasznosak a radioaktív jelölések, azaz például a ^{32}P , ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I vagy hasonló

jelölések. Bármelyik olyan radioaktív jelölés alkalmazható, amely megfelelő jelet szolgáltat és elegendő felezési idővel rendelkezik. Az oligonukleotidokat radioaktívan jelezhetjük például a "nick-transzláció" jól ismert módszerével [Rigby, P.J.W. et al., *Journal of Molecular Biology*, 113, 237 (1977)] vagy a T4 DNS polimeráz helyettesítő szintézissel [Deen, K.C. et al., *Analytical Biochemistry*, 135, 456 (1983)].

Egy másik módszer szerint, a polinukleotidok úgy is használhatók nukleinsav hibridizációs próbaként, ha nem-radioaktív jelzéssel látjuk el őket, például biotinnal, egy enzimmel vagy egy fluoreszcens csoporttal [Leary, J.J. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 80, 4045 (1983); Renz, M. et al., *Nucleic Acids Research*, 12, 3435 (1984); Renz, M., *EMBO J.*, 6, 817 (1983)].

Azaz összefoglalva, a fehérje-szekvenciák azonosítása lehetőséget ad arra, hogy azonosítsuk az elméletileg "legvalószínűbb" DNS szekvenciát, illetve egy csoportját ezeknek a szekvenciáknak, amelyek ezt a fehérjét kódolják. Az ezzel az elméleti szekvenciával komplementer oligonukleotid készítésével (illetve egy oligonukleotid csoport készítésével, amely komplementer a "legvalószínűbb" oligonukleotidokkal) egy olyan DNS molekulát (vagy DNS molekulákat) kapunk, amelyek próbaként képesek működni azoknak a klónoknak az azonosítása és izolálása során, amelyek a keresett fehérjét kódolják.

A fehérje klónozásának egy másik módszere, ha egy rekombináns könyvtárat készítünk egy expressziós vektor fel-

használásával, oly módon hogy DNS-t, előnyösebben a fehérje expressziójára képes sejtől izolált cDNS-t klónozzunk egy expressziós vektorba. Ezután átvizsgáljuk a könyvtárat, keressük azokat a tagokat, amelyek expresszálják a keresett fehérjét, például úgy, hogy a könyvtárat a fehérjére specifikus antitestekkel vizsgáljuk át.

Az előzőekben leírt módszerekkel lehetséges azoknak a genetikai szekvenciáknak az azonosítása, amelyek a keresett fehérjét vagy annak egy fragmentjét kódolják. Abból a célból, hogy tovább jellemezzük az ilyen genetikai szekvenciákat, és előállítsuk a rekombináns fehérjét, az szükséges, hogy expresszáljuk azokat a fehérjéket, amelyeket ezek a szekvenciák kódolnak. Az ilyen expresszióval azokat a klónokat lehet azonosítani, amelyek a keresett fehérjével azonos jellemzőket mutató fehérjéket expresszálják. Az ilyen jellemzők közé tartozhat egyebek között az a képesség, hogy specifikusan kötődnek a fehérje ellen készített antitestekhez, az a képesség, hogy olyan antitestek képződését indukálják, amelyek képesek az említett fehérjéhez kötődni, és az a képesség, hogy a befogadó sejtnél a fehérjére jellemző egyedi funkciót biztosítsák.

IV. Egy fehérje expressziója egy, a találmány szerinti gazdaszervezetben

Ha a találmány szerinti gazdasejt számára idegen (heterológ) vagy homológ klónozott fehérjét akarunk expresszálni, a gazdasejt által felismert transzkripció és transzlációs jelekre van szükség. A klónozott fehérjét kódo-

ló szekvenciákat, amelyeket az előzőekben leírt módszerekkel állítunk elő, és előnyösen kétszálú formában vannak, működés szempontjából olyan szekvenciákhoz kapcsoljuk, amelyek egy expressziós vektorban szabályozzák a transzkripciót, majd bejuttatjuk a gazdasejtbe, a rekombináns fehérje előállítására céljából.

Egy nukleinsav molekula, például DNS, akkor "képes expresszálni" egy polipeptidet, ha tartalmaz expressziós szabályozó szekvenciákat, amelyeknek tartalmazniuk kell transzkripciós szabályozó információt, és ezeket a szekvenciákat "működőképesen hozzákapcsoljuk" a fehérjét kódoló nukleotid szekvenciához.

A működőképes hozzákapcsolás egy olyan hozzákapcsolást jelent, melynek során egy szekvenciát egy szabályozó szekvenciához (vagy szekvenciákhoz) kapcsolunk oly módon, hogy a szekvencia expresszióját a szabályozó szekvencia befolyása vagy szabályozó hatása alá helyezzük. Két DNS szekvenciáról (azaz a fehérjét kódoló szekvenciáról és a kódoló szekvencia 5' végéhez kapcsolt promoter régióról) akkor mondjuk, hogy működőképesen vannak összekapcsolva, ha a promoter funkció indukciójának eredményeképpen a fehérjét kódoló szekvencia mRNS-sé íródik át, és ha a két DNS szekvencia kapcsolódásának olyan a természete, hogy

- (1) nem jön létre leolvasási-keret eltolódási mutáció,
- (2) nincs interferencia az expressziós szabályozó szekvenciának azzal a képességgel, hogy vezérelje a fehérje mRNS szintézisét, vagy

(3) nincs interferencia a DNS templátnak azzal a tulajdonságával, hogy a promoter régió szekvenciájáról íródjon át.

Így tehát egy promoter régió működés szempontjából hozzákapcsolódhat egy DNS szekvenciához, ha a promoter képes befolyásolni a DNS szekvencia transzkripcióját.

A génexpresszióhoz szükséges szabályozó régiók pontos természete változhat, de általában tartalmaznak 5'-nem átíródnó és nem-kódoló szekvenciákat, amelyek a transzkripció iniciálásában vesznek részt, például a TATA box, lezáró szekvencia, CAAT szekvencia és hasonlóak. Pontosabban, az ilyen nem-átíródnó kontroll szekvenciák olyan régiókat tartalmaznak, amelyek a működés szempontjából hozzákapcsolt gén transzkripciós szabályozásához szükséges promotert tartalmaznak.

A transzkripció iniciációs szabályozó jeleket úgy választhatjuk meg, hogy lehetővé tegyék a repressziót vagy aktivációt, és ezzel a működőképesen hozzákapcsolt gén expressziója befolyásolható legyen. Ahol a természetes expressziós szabályozó szekvenciák nem működnek kielégítően a gazdasejtben, ott megfelelő, a gazdasejtbe működő szekvenciákkal lehet lecserélni.

Egy előnyös megvalósítási mód szerint genetikailag stabil gazda-transzformánsok állíthatók elő olyan vektorrendszerekkel vagy transzformációs rendszerekkel, ahol a keresett fehérjét kódoló DNS-t a gazdasejt kromoszómájába integrálhatjuk. Az ilyen integráció előfordulhat de novo a sejtben, vagy - egy előnyösebb megvalósítási mód szerint -

olyan vektorra végzett transzformációval, amely beépíti saját magát a gazdasejt kromoszómájába, ilyenek például a transzpozonok vagy más olyan DNS elemek, amelyek elősegítik a DNS szekvenciák integrálódását a kromoszómákba.

A DNS-sel transzformált sejteket úgy választjuk ki, hogy egy vagy több olyan genetikai bélyeget is bejuttatunk, amelyek lehetővé teszik azoknak a gazdasejteknek a szelekcióját, amelyek az expressziós vektort a kromoszómán tartalmazzák, így például a genetikai bélyeg lehet egy biocid rezisztencia, azaz antibiotikum-, nehézfém- (például réz-) rezisztencia, vagy hasonló. A szelektálható genetikai bélyeget vagy közvetlenül az expresszálandó DNS szekvenciákhoz kapcsoljuk, vagy ko-transzsfekcióval juttatjuk be ugyanabba a sejtbe.

Egy másik megvalósítási mód szerint a bejuttatott szekvenciát egy olyan plazmidba vagy vírus vektorba építjük be, amely képes a befogadó gazdasejtben önálló replikációra. Erre a célra számos különböző vektor használható.

Egy adott plazmid vagy vírus-vektor megválasztásában fontos faktorok közé tartozik: milyen könnyen ismerhető fel és szelektálható a vektort tartalmazó gazdasejt a vektort nem tartalmazó gazdasejtek között; a vektor példányszáma, ami egy adott gazdasejtben szükséges; valamint az, hogy szükséges-e a vektort "ingáztatni" különböző fajhoz tartozó gazdasejtek között.

Ha egyszer a konstrukció(kat) tartalmazó vektort vagy DNS szekvenciát elkészítjük az expresszióhoz, akkor a DNS konstrukció(ka)t számos különböző módszer alkalmazásával

bejuttathatjuk egy megfelelő gazdasejtbe (amelyről ezután azt mondjuk, hogy "transzformált"). A vektor bejuttatása után a befogadó transzformált sejteket szelektív táptalajon növesztjük, amely a vektort tartalmazó sejteket szelektálja. A klónozott gén szekvenci(ák) expressziója a kívánt fehérje expresszióját eredményezi. Ez az expresszió lejátszódhat folytonosan a transzformált sejtekben, illetve szabályozott módon.

Az expresszált fehérjét a találmány szerinti gazdasejtből izoláljuk és tisztítjuk, szokásos módszerek alkalmazásával, így például extrakcióval, kicsapással, kromatográfiával, affinitás-kromatográfiával elektroforézissel vagy hasonlókkal.

Az alábbi példákban részletesen leírjuk a találmány végrehajtásához szükséges anyagokat és módszereket. A példák nem azt a célt szolgálják, hogy a találmány oltalmi körét bármilyen módon korlátozzák.

PÉLDÁK

Anyagok és módszerek

Radioaktív izotópok, baktériumtörzsek és táptalajok. Mindegyik radioaktív izotópot a New England Nuclear-től vásároltuk. Az eljárásban használt baktériumtörzseket és plazmidokat az 1. táblázatban soroljuk fel. Az LB táptalajt [Meade, H.M. et al., Journal of Bacteriology, 149, 144-122 (1982)], az M9 minimál táptalajt és az M63 minimál táptalajt [Miller, J.H., Experiments in Molecular Genetics, Cold

Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1972)] már korábban leírták.

Tn5 mutánsok izolálása. pEh32 és pMB210 plazmidokat tartalmazó MC1061 törzset fertőzünk lambda-b221 rex::Tn5 cI857 O_{am}8 P_{am}28 fággal [Berg, D., Insertion and excision of the transposable kanamycin resistance determinant Tn5, 205-212, in A.I. Bukhari, J.A. Shapiro and S.L. Adhya (ed.), DNA insertion elements plasmids and episomes, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1977); Ruvkun, G.B. et al., Nature, 289, 85-88 (1981)]. LB táptalajban 1×10^9 /ml sűrűségig növesztett 8 ml sejtet 0,1-es multiplicitással fertőzünk, 4 óra hosszat 32 °C-on inkubáljuk, majd M9 minimál táptalajra szélesztjük, amely egyedüli szénforrásként 0,4 % laktózt, valamint 25 µg/ml kanamicint tartalmaz. Rendkívül kisméretű kanamycin rezisztens telepek láthatók egy boncoló mikroszkóp alatt 84 órás, 28 °C-on végzett inkubálás után (ez a hőmérséklet teszi lehetővé a magas NifA aktivitást), mind a 16 lemezen körülbelül 12 000 telep sűrűségben. Emellett a számos mikrotelep mellett mindegyik telep tartalmazott egy - nyolc lényegesen nagyobb telepet. Az összesen körülbelül 90 nagyobb telepből huszonegyet megtisztítunk, oly módon hogy laktózt és kanamicint tartalmazó minimál lemezre szélesztjük őket. A kanamycin rezisztens mikrotelepek közül is megtisztítunk néhányat kontrollként.

Genetikai technikák és fizikai térképezés. A Tn5 inszerciók transzdukcióját Plvir segítségével az előzőekben leírt módon végezzük [Miller, J.H., Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring

Harbor, New York (1972)], azzal a különbséggel, hogy a befo-
gadó sejteket 1:20 arányban hígítjuk egy friss éjszakán át
növesztett tenyészetből, majd két óra hosszat 37 °C-on nö-
vesztjük mielőtt a transzdukáló lizátumot hozzáadjuk. A Hfr
térképezést az előzőekben leírt módon végezzük [Wanner, B.L.
Journal of Molecular Biology, 191, 39-58 (1986)], egy
sorozat Hfr::Tn10 törzs felhasználásával (1. táblázat). Az
LC24 Tn5 inszerció fizikai elhelyezkedését Southern blot
elemzéssel határozzuk meg [Chomczynski, P. et al., Biochemi-
cal and Biophysical Research Communications, 122, 340-344
(1984)]. BamHI, HindIII, EcoRI, EcoRV, BglIII, KpnI, PstI
vagy PvuII restrikciós enzimmal emésztett MC1061 DNS-t vizs-
gálunk az LC24 inszercióból származó határoló DNS-sel, és a
kapott restrikciós mintázatokat az Escherichia coli genom
fizikai térképével hasonlítjuk össze [Kohara, Y. et al.,
Cell, 50, 495-508 (1987)], a nirR régió környékén.

1. táblázat

Baktériumtörzsek és plazmidok

Törzs	Releváns jellemzők	Forrás vagy referencia
E. coli:		
MC1061	araDI39 delta(ara leu)7697 127lacX74 galU galK hsr hsm strA	Casadaban, Cohen 1980
Mph82	lon::Tn10 (SW7J2B)	Boyd, 1987
HA62	MC1061, Mph82-ből származó lon::Tn10-zel	Ez a leírás
HA63	LC23, Mph82-ből származó lon::Tn10-zel	Ez a leírás
HA64	LC24, Mph82-ből származó lon::Tn10-zel	Ez a leírás
LC12	MC1061 Tn5 mutánsa (snoA)	Ez a leírás
LC4	MC1061 Tn5 mutánsa (snoB)	Ez a leírás

1. táblázat (folyt.)

Törzs	Releváns jellemzők	Forrás vagy referencia
LC6	MC1061 Tn5 mutánsa (snoB)	Ez a leírás
LC23	MC1061 Tn5 mutánsa (snoB)	Ez a leírás
LC25	MC1061 Tn5 mutánsa (snoB)	Ez a leírás
LC24	MC1061 Tn5 mutánsa (snoC)	Ez a leírás
C-1A	prototróf	Sasaki et al., 1965
LC241A	LC24 Tn5-öt tart. C-1A	Ez a leírás
BW6160	Hfr::Tn10	Wanner, 1986
BW7620	Hfr::Tn10	Wanner, 1986
BW5660	Hfr::Tn10	Wanner, 1986
BW6175	Hfr::Tn10	Wanner, 1986
BW6164	Hfr::Tn10	Wanner, 1986
BW6051	Hfr::Tn10	Wanner, 1986
BW6165	Hfr::Tn10	Wanner, 1986
BW6156	Hfr::Tn10	Wanner, 1986
BW7261	Hfr::Tn10	Wanner, 1986
BW7623	Hfr::Tn10	Wanner, 1986
BW7622	Hfr::Tn10	Wanner, 1986
BW5659	Hfr::Tn10	Wanner, 1986
BW6163	Hfr::Tn10	Wanner, 1986
BW6169	Hfr::Tn10	Wanner, 1986
BW6166	Hfr::Tn10	Wanner, 1986
CAG12169	zch-506::Tn10	Singer et al., 1989
CAG12028	zci-233::Tn10	Singer et al., 1989
CAG12081	zcj-3061::Tn10	Singer et al., 1989
CAG12026	trg-2::Tn10	Singer et al., 1989
<u>Plazmidok:</u>		
pSDC13	M13 ori, ColE1 ori, Cm-r	Levinson et al., 1984
pEH32	pSDC13 lacZ-nifA (NifA-AUG1)	Huala & Ausubel, 1989
pEHdeltaRI	pSDC13 lacZ-nifA(NifA-deltaN)	Huala & Ausubel, 1989
pMB210	nifH-lacZ, RK2 origó, Tc-r	Better et al., 1985
pLAC	lacZ, RK2 origó, Tc-r	Huala & Ausubel, 1989

Referenciák:

- Better et al., EMBO J., 4, 2419-2424 (1985)
Boyd, D. et al., in Phosphate Metabolism and Cellular Regulation in Microorganisms, A. Torriani-Gorini et al., eds., Am. Soc. Microbiol., Washington, 89-93 (1987)
Casadaban et al., Journal of Molecular Biology, 138, 179-297 (1980)
Huala et al., Journal of Bacteriology, 171, 3354-3365 (1989)
Levinson et al., Journal of Molecular and Applied Genetics, 2, 507-517 (1984)
Sasaski et al., Can. J. Gen. Microb. 40 365-376 (1965)
Singer et al., Microbiological Reviews, 53, 1-24 (1989)
Wanner, B.L. et al., Journal of Molecular Biology, 191, 39-58 (1986)
-

β -galaktozidáz vizsgálatok. Egy lacZ-nifA expressziós plazmidot (pEH32 vagy pEHdeltaR1) és egy nifH-lacZ riporter plazmidot (pMB210) tartalmazó baktériumtörzseket antibiotikumokkal kiegészített LB táptalajon növesztünk 28 °C-on folyamatosan 1 % vagy 21 % oxigénáramot biztosítva, az előzőekben leírt módon [Huala et al., Journal of Bacteriology, 171, 3354-3365 (1989)]. Az aktív nifA 16 óra növekedés elteltével jelenlevő mennyiségét úgy vizsgáljuk meg, hogy mérjük a tenyészetek β -galaktozidáz aktivitását [Miller, J.H., Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1972)].

Immunológiai technikák. A Rhizobium meliloti NifA fehérje utolsó 14 aminosavát tartalmazó (NH₂-Gly-Tyr-Ala-Leu-Arg-Arg-His-Gly-Val-Asp-Val-Arg-Lys-Leu-COOH) peptid, amelyet a szakterületen jártas szakember számára ismert módon szintetizálunk [Bodanszky, M., Peptide Chemistry: A Practical Textbook, Springer-Verlag, New York (1988)] ellenantitesteket készítünk. A peptidet m-maleimidobenzoil-N-hid-

roxiszukcinimid-észterrel konjugáljuk (MBS; Pierce) egy hordozó fehérjéhez, például kürtőscsiga hemocianinhoz (Sigma), egy külön, a peptid N-terminális végéhez hozzáadott ciszteinen keresztül. A hordozó fehérjét (10 mg) 0,7 ml 1 mol/l kálium-foszfát pufferben oldjuk (pH=7,3), majd 7 ml ionmentesített vízzel hígítjuk. 6 mg MBS-t oldunk 100 μ l 50 % DMF és 50 % THF összetételű elegyben, majd cseppenként, folyamatos kevertetés közben a hordozó fehérjéhez adjuk. A 6 mg peptid hozzáadását követően a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertetjük éjszakán át, majd 24 óra hosszat dializáljuk 4 liter foszfáttal pufferelt sóoldattal szemben. Két New Zealand Red nyulat immunizálunk, oly módon, hogy bőr alá beadunk 0,67 ml konjugált peptidet, amelyet 0,33 ml Freund féle komplett adjuvánssal (Calbiochem) emulgeáltunk, majd két megerősítő kezelést adunk 0,5 ml konjugált peptiddel és 0,4 ml Freund féle konjugált adjuvánssal, az indító injekciók után 16 és 31 nappal.

Western blot elemzéseket a korábban már leírt módon végezzük [Blake, M.S. et al., Analytical Biochemistry, 136, 175-179 (1984)], alkalikus foszfatázzal konjugált kecske anti-nyúl IgG-vel (Calbiochem) mint második antitesttel. Az alkalikus foszfatáz reakcióhoz a nitro-blue-tetrazóliumot és az 5-bróm-4-klór-3-indolil-foszfátot a Sigma-tól vásároltuk.

Impulzus-jelölés és immunkicsapás. A pEHdeltaRI plazmidot tartalmazó tenyészeteket éjszakán át növesztjük LB táptalajban, majd 1:100 arányban hígítjuk M9 táptalajban, amely 0,5 % glicerint, 40 μ g/ml L-aminosavakat (metionin és cisztein kivételével), 0,5 mg/l tiamint és antibiotikumokat

tartalmaz, majd aerob körülmények között növesztjük néhány óra hosszat 37 °C-on rázatva. Amikor a tenyészet optikai sűrűsége (600 nm-en mérve) eléri a 0,1-0,5 közötti értéket, akkor a tenyészeteket ugyanebben a táptalajban 0,1 optikai sűrűsége hígítjuk, majd 28 °C-on két óra hosszat rázatjuk. A tenyészeteket impulzus-jelöljük, 37,5 μ Ci/ml L-[³⁵S]metioninnal (1245 Ci/mmol), majd két perc elteltével főlésslegben hozzáadunk jelzetlen L-metionint 1,4 mg/ml koncentrációban [Parsell, D.A. et al., Journal of Biological Chemistry, 264, 7590-7595 (1989)], majd a kiűzési periódus alatt 28 °C-on tartjuk. Időközönként 0,5 ml-es alikvot részeket adunk 35 μ l 60 mmol/l fenilmetil-szulfonil-fluoridhoz (PMSF) és 80 mmol/l nátrium-azidhoz (90 %-os etanolban), jégbehűtve. A jelzett sejteket centrifugálással összegyűjtjük, 30 μ l SDS mintafelvivő pufferben szuszpendáljuk (125 mmol/l TRIS-HCl pH=6,8, 5 mmol/l EDTA, 10 % glicerín, 5 % β -merkapto-etanol, 2 % nátrium-dodecil-szulfát), és 5 percig forraljuk.

Az impulzus-jelzett minták immunkicsapását úgy hajtjuk végre, hogy 10-30 μ l forralt lizátumhoz 970 μ l foszfáttal pufferelt sóoldatot és 5 μ l antiszérumot adunk, éjszakán át 22 °C-on kevertetjük, majd a megkötött antitesteket protein A-Sepharose (Pharmacia) felhasználásával kicsapjuk [Storz, G. et al., Journal of Bacteriology, 171, 2049-2055 (1989)]. A NifA fehérjét a mosott protein A-Sepharose csapadékról úgy távolítjuk el, hogy SDS mintafelvivő pufferben forraljuk (az előzőekben leírt módon) 5 percig, majd a mintákat 10 %-os poli(akril-amid) SDS gélen elektroforetizáljuk.

Tn5 klónozás és szekvencia elemzés. A mutáns LC12, LC23 és LC24 törzsekből származó kromoszomális DNS-t EcoRI, SalI vagy restriktációs enzimmel emésztjük, majd pMLC28-ba ligáljuk. A kapott kanamicin rezisztens telepek olyan plazmidokat tartalmaznak, amelyek a teljes Tn5 inszerciót és a háróroló DNS-t vagy annak egy részét hordozzák. A Tn5 inszercióval szomszédos DNS-t a didezoxi módszerrel szekvenáljuk [Sanger, F. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 74, 5463-5567 (1977), egy Sequenase kit (U.S. Biochemicals) és Tn4 specifikus indító molekula [3'-GTTCAT CGCAGGACTTG-5'; Ronson, C.W. et al., Journal of Bacteriology, 169, 2424-2431 (1987b)] alkalmazásával. Az indító molekulát a szakterületen jártas szakember számára ismert módszerrel állítjuk elő [Gait, M.J. et al., Oligonucleotide Synthesis, A Practical Approach, IRS Press, Washington DC (1984)].

Növekedési görbék. Azt már korábban közölték, hogy a dcp mutánsok képtelenek elhasítani az N-acetil-Ala-Ala-Ala peptidet, és ennél fogva nem képesek ezen a vegyületen, mint kizárólagos szénforráson növekedni [Deutch, C.E. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 75, 5998-6001 (1978)]. Annak ellenőrzésére, hogy vajon az LC24 Tn5 inszerciója a dcp-ben helyezkedik-e el, az LC24 Tn5 inszercióját egy prototróf Escherichia coli törzsbe, a C-1A-ba transzdukáljuk. A kapott törzset, az LC241A-t éjszakán át növesztjük 37 °C-on M63 minimál táptalajon, 1:10 arányban hígítjuk M63 táptalajjal, néhány óra hosszat növesztjük, amíg a tenyészet 600 nm-en mért optikai sűrűsége meg nem ha-

ladja a 0,05-öt. Mindegyik tenyészetet M63 táptalajban 0,05-ös OD-ra állítjuk be, majd 1:100 arányban hígítjuk vagy M63 táptalajjal (10 mg/ml ammónium-szulfát) vagy ammónium-szulfátot nem tartalmazó, viszont N-acetil-Ala-Ala-Ala peptidet (Sigma) tartalmazó M63 táptalajjal, mint kizárólagos nitrogénforrással, majd a tenyészetek növekedését úgy követjük, hogy 24 óra alatt időnként megmérjük a 600 nm-es optikai sűrűségüket.

1. példa

Tn5 mutagenesis és a mutások szelekciója

A pEH32 *lacZ*-*nifA* expressziós plazmidot és a PMB210 *nifH-lacZ* riporter plazmidot hordozó MC1061 *Escherichia coli* törzset Tn5 transzpozonnal mutagenizáljuk, majd laktózt tartalmazó minimál táptalajra szélesztjük, ahol a vad típusú MC1061 nagyon gyengén nő, alig látható telepek nőnek csak ki, 84 óra hosszat 28 °C-on inkubálva a sejteket. A megnövekedett NifA aktivitással rendelkező mutánsoktól, amelyek jobban képesek aktiválni a *nifH-lacZ* fúzió expresszióját, az várható, hogy nagyobb telepekként jelennek meg a mikrotelepek háttere előtt. 21 nagy kanamicin rezisztens telepet izoláltunk, oly módon hogy újra szélesztettük őket laktóz minimál táptalajon, és a nagyobb méretüket úgy igazoltuk, hogy mindegyiket laktóz minimál táptalajra szélesztettük, és a méretüket összehasonlítottuk a pEH32 és pMB210 plazmidokat hordozó vad típusú MC1061 *Escherichia coli* telepekkel. A mutások által hordozott plazmidokon a Tn5 transzpozon hiányát úgy igazoljuk, hogy az egyes mutánsokból plazmid DNS-t

izolálunk, és *Escherichia coli* MC1061 törzsbe transzformáljuk. Így nem keletkeznek kanamicin rezisztens telepek, jelezve, hogy a Tn5 inszerció a kromoszómán történt meg.

Az egyes mutáns törzsekből kromoszomális DNS-t izolálunk, EcoRI restrikciós enzimmel emésztjük, majd Southern blot elemzésnek vetjük alá, Tn5 transzpozont használva próbaként. Négy mutánst (LC9, LC11, LC21, LC22), amelyek egynél több Tn5 inszerciót tartalmaztak, és két másikat (LC5, LC18), amelyek gyenge fenotípusúak voltak, nem jellemeztünk tovább. A többi Tn5 inszerciókról kiderült, hogy három különböző EcoRI fragmensen fordulnak elő. Az 1-es csoport (snoA, a NifA stabilitása oxigénben) 10 tagból áll (LC2, LC3, LC7, LC8, LC10, LC12, LC13, LC14, LC15, LC16; 1. ábra). A 2-es csoport (snoB) 4 tagból áll (LC4, LC6, LC23, LC25; 2. ábra), a 3-as csoport (snoC) egy tagból áll (LC24; 2. ábra). Minden egyes csoportnak egy képviselőjét (LC12, LC23 és LC24) kiválasztjuk további jellemzés céljából. A snoA, snoB és snoC hozzávetőleges genetikai elhelyezkedését meghatározzuk Hfr térképezéssel és ez a snoA esetében 6 és 13 perc közé esik, a snoB esetében 23 és 30 perc közé esik, a snoC esetében 50 és 61 perc közé esik.

2. példa

A mutáns fenotípusok jellemzése

A pEH32 (NifA-AUG1) és pMB210 (nifH-lacZ) plazmidokat tartalmazó LC12, LC23 és LC24 mutánsokat LB táptalajban növesztjük 1 vagy 21 %-os folyamatos oxigénáramban 16 óra hosszat, majd vizsgáljuk a a nifH-lacZ riporter fúzió ered-

ményeképpen létrejövő β -galaktozidáz aktivitásukat. Ha 21 % oxigén jelenlétében növesztjük, akkor mindhárom mutánsban tízszer magasabb a β -galaktozidáz aktivitás, mint a pEH32 és pMB210 plazmidokat hordozó vad típusú MC1061 *Escherichia coli* törzsben. 1 % oxigén mellett az LC12 és LC24 enyhén magasabb β -galaktozidáz aktivitást mutatott az MC1061-hez viszonyítva, míg az LC23 nem mutatott megnövekedett β -galaktozidáz aktivitást. Annak igazolására, hogy a mutánsok fenotípusát a Tn5 inszerció okozza, és nem nem-kapcsolódó pontmutációk, az LC12, LC23 és LC24 törzsek Tn5 inszercióit P1 fág segítségével MC1061 *Escherichia coli* törzsbe transzdukáljuk. A transzduktánsokat pEH32 és pMB210 plazmidokkal transzformáljuk, és mérjük a 21 % oxigén mellett termelt β -galaktozidáz aktivitást. A transzdukált törzsek, az eredeti mutánsokhoz hasonlóan tízszer magasabb β -galaktozidáz aktivitást mutattak az MC1061-hez viszonyítva (2. táblázat). A mutáns törzsekben mért megnövekedett β -galaktozidáz aktivitás teljesen a NifA jelenlététől függött. Nem volt megfigyelhető az aktivitás alapszintjének megnövekedése a nifH promoter konstitutív működésének következtében, a NifA távollétében, egyik mutánsnál sem (2. táblázat).

2. táblázat

**NifA aktivitás a vad típusú és a mutáns
Escherichia coli törzsekben**

<u>Törzs</u>	<u>β-galaktozidáz aktivitás</u>	
	1 % oxigén	21 % oxigén
MC1061	7,6	7,9
MC1061+pMB210	144	169
LC12+pMB210	99	164
LC23+pMB210	135	129
LC24+pMB210	133	183
MC1061+pMB210, pEH32	46,128	1367
LC12+pMB210, pEH32	67,902	12,650
LC23+pMB210, pEH32	48,789	13,859
LC24+pMB210, pEH32	60,341	15,153
MC1061+pMB210, pEdeltaRI	53,189	35,836
LC12+pMB210, pEHdeltaRI	60,017	42,847
LC23+pMB210, pEHdeltaRI	54,584	28,660
LC24+pMB210, pEHdeltaRI	57,398	45,205
MC1061+pLAC	41,420	32,901
LC12+pLAC	37,615	30,452
LC23+pLAC	31,538	25,882
LC24+pLAC	34,133	29,388

A β-galaktozidáz aktivitást Miller egységekben adjuk meg. A pEH32 a NifA-AUG1-et a lacZ promoterről expresszálja. A pEHdeltaRI a NifA-deltaN-t a lacZ promoterről expresszálja. A pMB210 egy nifH-lacZ riporter fúziót tartalmaz. A pLAC a lacZ gént expresszálja a természetes promoterről.

A sno mutációk hatását a NifA-nek egy sokkal stabi-

labbb mutáns formáján is kipróbáltuk, amely a pEHdeltaRI plazmidon található. A pEHdeltaRI és pMB210 plazmidokat hordozó LC12, LC23 és LC24 törzsekben is megmérjük a β -galaktozidáz aktivitás 1 % és 21 % oxigén mellett (2. táblázat). A NifA-deltaN aktivitásnak csak kismértékű emelkedése figyelhető meg.

3. példa

Annak igazolása, hogy a snoA mutáció a lon-ben található

Az LC12-ben levő snoA inszerció Hfr térképezése azt mutatja, hogy a snoA helye az Escherichia coli genetikai térképén 6 és 13 perc között található. Az inszerció helyét a fizikai térképen [Kohara et al., Cell, 50, 495-508 (1987)] Southern blot elemzéssel határozzuk meg, és ez azt mutatja, hogy a proC-től körülbelül 55 kb távolságban található [ez a legközelebbi genetikai bélyeg a Kohara féle térképen; Kohara et al., Cell, 50, 495-508 (1987)], a lon szomszédságában. A Tn5 inszerciót és az LC12-ből származó határoló szakaszokat klónozzuk, és a Tn5 inszerció két oldaláról körülbelül 300 bp-t szekvenálunk. Az 1-es szekvencia, az alábbiakban, a rekonstruált szekvenciát jelenti (a Tn5 szekvenciát és az inszerció pont duplikációját eltávolítottuk), amely a Tn5 inszerció előtt a gazdasejtben volt található. A Tn5 inszerció a 305-ös nukleotid után következett be.

1. szekvencia

```

1   CTTTTCTGCG AAGGXGGAGT ATCTGGAGTC GCCGACCATT GATGAGCGGG
51  AACAGGAAGT GCTGGTGCCT ACTGCAATCA GCCAGTTCGA AGGCTACATC
101 AAGCTGAACA AAAAAATCCC ACCAGAAGTG CTGACGTCGC TGAATAGCAT
151 CGACGATCCG GCGCGTCTGG CGGATACCAT TGCTGCACAT ATGCCGCTGA
201 AACTGGCTGA CAAACAGTCT GTTCTGTTCT GGAGATCTCC GACGTTAACG
251 AACGTCTGGA ATATCTGATG GCAATGATGG AATCGGAAAT CGATCTGCTG
301 CAGGTTGAGA AACGCATTCG CAACCGCGTT AAAAAGCAGA TGGAGAAATC
351 CCAGCXTGAG TACTATCTGT CTGAACGAGC AAATGAAAGC TATTCAGAAA
401 GAACTCGGTG AAATGGACGA CGCGCCGGAC GAAAXGAAGC CCTGAAGCGC
451 AAAATCGACG CGGCGAAGAT GCCGAAAGAG GCAAAGAGA AAGCGGAAXX
501 AGAGTTGCAG AAGCTGAAAA TGATGTCTCC GATGTCGGCA GAAGCGACCG
551 TAGTGCGTGG TTATATCGAC TGGATGGTAC AGGTGCCGTG GAATGCGCGT
601 CAAGAGGTCA AAAAAGXCCT GCGTCXGGCG CAGGAAATCC TTGATACCGA
651 CCATTATGGT CTGGAGCGCG TGAAAGATCG AATCCTTGAT TATCTTGCGG
701 TTCAAAGCCG TGTCAACAAA ATCAAGGGAC CGATCCTCTG CCTGGTAGGG
751 CCGCCGGGGG TAGGTAAAC CTCTCTTGGT CAGTCCATTG CCAAAGCCAC
801 CGGGCGTAAA TATGTCCGTA TGGCGCTGGG CGGGCGTGAT GAAGCGGAAA
851 TCCGTGGTCA

```

Ez a szekvencia tette lehetővé számunkra annak meghatározását, hogy az LC12 inszerció a lon génben található, amely az La proteázt kódolja. Az LC12-ben levő Tn5 inszerció a Chin és munkatársai által közölt lon szekvencia [Chin et al., Journal of Biological Chemistry, 263, 11718-11728 (1988)] 1038-as nukleotidját követi, és a PstI hasítási hely megduplázódását eredményezte, amely a lon kódoló régiónak

körülbelül az egynegyedénél található.

4. példa

A snoB pozíciója

Az LC23 Tn5 inszercióját (snoB) klónozzuk, majd a határoló DNS-nek egy 236 bázispár méretű szakaszának szekvenciáját meghatározzuk. Az LC23-ban a Tn5 inszerciós helynél található genetikai szekvenciának az egyik végén levő szekvenciát mutatjuk be az alábbi 2. szekvenciában.

2. szekvencia

```

1  TAGCGATATA CACAACTTCA ACCTGACTTT ATCGTTGTCG ATAGCGTTAA
51  TGCGAATGCC GTGAAGCGAG TCCACGGCAT TGCCTGACGC TTATATTATT
101 GCAATTTTCGC GCTGACCCAG CCTTTCACAC TGGCTAACGC TGCAGGTAAG
151 GCCGCAGCAT CCGTACCACC GGCTTGCGCC ATGTCAGGAG CTCCACCACC
201 CTTGCCGCCC ACCTGCTGAG CGACCATACC AATCAG

```

A Genbank szekvencia adatbázist a határoló szekvencia szempontjából átvizsgálva kiderült, hogy a Tn5 inszerció ebben a mutánsban körülbelül 160 bázispárral az alaS terminációs kodon után található, amely az alanil tRNS szintetáz enzimet kódolja [Putney, S.D. et al., Science, 213, 1497-1501 (1981)]. Annak igazolására, hogy az LC4, LC6 és LC25 mutánsokban a Tn5 inszerció frekvenciája közel volt ahhoz, amit az sr1C300::Tn10 inszercióval kotranszdukált Tn5 inszerciókkal kaptunk a BW5660 törzsnél [Wanner, B.L., Journal of Molecular Biology, 191, 39-58 (1986)]. Felfedeztük, hogy

mind a négy snoB Tn5 inszerció együtt transzdukálódik, magas frekvenciával, az srlC-vel (3. Táblázat). Az LC4, LC6, LC23 és LC25 mutánsokból származó DNS-t Sali restrikciós enzimmel emésztjük, majd Southern blot elemzéssel ki lehet mutatni, hogy két inszerció (az LC23-ban és az LC6-ban) az alaS 3' végéhez közel eső Sali restrikciós hasítási helytől körülbelül 400 bp távolságban van 3' irányban, és a másik két inszerció (LC4 és LC25) körülbelül 750 bp távolságban van ettől a Sali helytől.

3. táblázat

snoB ko-transzdukció srlC::tn10-zel

<u>Törzs*</u>	<u>Vizsgált</u>	<u>Tc^r</u>	<u>%-os</u>
	<u>telepek</u>	<u>telepek</u>	<u>ko-transzdukció</u>
LC4 (snoB)	8	0	100
LC6 (snoB)	9	0	100
LC23 (snoB)	7	1	86
LC25 (snoB)	10	1	90
LC24 (snoC)	6	6	0

* Donor törzsek a P1 transzdukcióban. A kanamicin rezisztens, transzdukált Tn5 inszerciót hordozó befogadó telepeket vizsgáltuk át tetraciklin rezisztencia szempontjából, jelezve az srlC::Tn10 inszerció jelenlétét.

5. példa

A snoC lokalizálása

Az LC24 (snoC) inszerció határoló DNS szakaszából 221 bázis sorrendjét meghatároztuk. Az LC24 gazdaszervezet genetikai szekvenciájának a Tn5 inszerció pontjánál levő szekvencia egyik végét mutatjuk be az alábbi, 3-as szekvencián.

3. szekvencia

```

1  AAAAAAGGAA GTAAGACAAT ATGGAGCGCA ACGCCCATCG CTTGACGTTG
51  CATTACCTG CAAGAGAGAT ATTGCCCTGA ATGGGTAGAG AGTTTATTGA
101 CTTGCTCAA ACTTTGCGGC GTTTTGTAT ACAGACAGCC GGAAAAATTG
151 CTTTGTAC AACCATTAC TACGATGCAA CCATCCCGCA ACACCACCAA
201 TAATAACAAC TAACAGAATA C

```

A Genbank szekvencia adatbázist átvizsgálva nem találtunk hasonló szekvenciát. Mivel ennek az inszerciónak a hozzávetőleges elhelyezkedését meghatároztuk már Hfr térképezéssel, és úgy találtuk, hogy az *Escherichia coli* genetikai térképén 23 és 31 perc között helyezkedik el, a P1 transzdukciót vizsgáltuk ebben a régióban, egy sorozat Tn10 inszercióval. Egy 29,3 percnél levő Tn10 inszercióról (zcj-3061::Tn10) meghatároztuk, hogy 84 %-osan együtt transzdukálódik az LC24 Tn5 inszercióval (4. táblázat). A Kohara féle fizikai térképen [Kohara, Y. et al., Cell, 50, 495-508 (1987)] az inszerció helyét Southern blot elemzéssel határoztuk meg, a fizikai térkép készítéséhez használt nyolc en-

zimmel emésztve az MC1061 DNS-t, az LC24 inszerció klónozott határoló DNS szakaszát használva próbaként (4. ábra).

4. táblázat

A snoC lokalizálása P1 transzdukcióval

%-os ko-transzdukció

Befogadó			
<u>törzs</u>	<u>1. Kísérlet</u>	<u>2. Kísérlet</u>	<u>3. Kísérlet</u>
CAG 12169	0 %* (190)**		
CAG 12028	7,1 % (112)	4 % (482)	11 % (200)
CAG 12081	81 % (170)	84 % (804)	
CAG 12026	0 % (98)	0,2 % (579)	

* Azoknak a kanamicin rezisztens telepeknek a száma, amelyek nem tetraciklin rezisztensek is egyúttal.

** Az összes átvizsgált telep száma.

A fizikai és genetikai térképezés eredménye azt mutatja, hogy az LC24 inszerció körülbelül 10 kb távolságban található a nirI-től (29,4 perc) a rac irányában. A dcp gén, amely a dipeptidil-karboxipeptidázt kódolja, ennek a szomszédságában található [Deutch, C.E. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 75, 5998-6001 (1978)]. Annak meghatározására, hogy a Tn5 inszerció az LC24-ben a dcp-be esik-e, az LC24 Tn5 inszercióját a C-1A prototróf törzsbe transzdukáljuk, így állítjuk elő az LC241A törzset, majd az inszerció hatását azon mérjük le, hogy ez a

törzs mennyire képes olyan minimál táptalajon növekedni, amely kizárólagos nitrogén-forrásként N-acetil-Ala-Ala-Ala peptidet tartalmaz. Míg a vad típusú *Escherichia coli* képes növekedni ezen a szubsztráton, addig egy dcp mutáns nem képes növekedni, nem képes elhasítani ezt a tripeptidet, ennélfogva nem képes szénforrásként hasznosítani [Deutch, C. E. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 75, 5998-6001 (1978)]. A C-1A és az LC241A növekedési sebességének összehasonlításából kiderül, hogy ezek a törzsek egyforma gyorsan nőnek N-acetil-Ala-Ala-Ala peptiden, mint kizárólagos szénforráson, jelezve ezzel, hogy a Tn5 inszerció az LC24-ben nem a dcp-ben fordul elő.

6. példa

A NifA fehérje felhalmozódása

Annak meghatározására, hogy a NifA-AUG1 felhalmozódása fokozódik-e a mutánsokban megnövekedett β -galaktozidáz aktivitás hatására, az MC1061, HA62 (az MC1061-nek egy lon::10 származéka), az LC23 (snoB) és az LC24 (snoC) törzsekben mérhető NifA-AUG1 akkumulációt Western blot segítségével összehasonlítjuk. Az 1 % oxigén mellett mért NifA-AUG1 felhalmozódás mértéke mind a négy törzsnél körülbelül egyforma volt (5A ábra), de 21 % oxigén mellett már változott. Míg a NifA-AUG1 mennyisége kimutathatatlan szintre csökkent az MC1061-ben 21 % oxigén mellett (5B ábra, 1-es sáv), HA62-ben a NifA-AUG1 mennyisége ugyanilyen körülmények között nem csökkent (5B ábra, 2-es sáv). A HA62-höz hasonlóan (lon) az LC24 (snoC) megnövekedett NifA-AUG1 felhalmozó-

dást mutatott 21 % oxigén mellett (5B ábra, 4-es sáv). A NifA-AUG1 felhalmozódásában azonban nem volt megfigyelhető növekedés az LC23 (snoB) törzsnél, ha 21 % oxigén mellett növesztettük (5B ábra, 3-as sáv). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a lon és snoC mutációk, a HA62 illetve LC24 törzsekben a NifA lebomlási sebességének csökkenését okozhatják, illetve a NifA szintézis növekedését okozhatják magas oxigén nyomás mellett. Ezzel szemben, az LC23 (snoB) mutáció esetében a NifA-AUG1 felhalmozódás mértéke 21 % oxigén mellett, jelezve ezzel, hogy a snoB mutáció hatása az lehet, hogy a NifA-AUG1 fehérjének az aktivitását fokozza 21 % oxigén mellett, és nem a felhalmozódás sebességének változását, valószínűleg a NifA-AUG1 oxigén hatására való inaktiválódási sebességének csökkentésével.

Jóllehet a sno mutációknak nincs látható hatásuk a NifA-deltaN aktivitásra, ennek a mutáns nifA formának a felhalmozódása figyelhető meg MC1061-ben, és a három sno mutánst (HA62, lon; LC23, snoB; és LC24, snoC) is összehasonlítottuk. A NifA-AUG1-nél kapott eredményekkel ellentétben a NifA-deltaN felhalmozódási sebességében különbségek figyelhetők meg 1 % oxigén, illetve 21 % oxigén mellett (6. ábra). A NifA-deltaN felhalmozódása MC1061-ben sokkal magasabb 1 % oxigén és 21 % oxigén mellett, mint a NifA-AUG1 felhalmozódása, valószínűleg a fehérje stabilitása következtében, de a felhalmozódás kisebb 21 % oxigén mellett [6A és 6B ábra, 1-es sáv; Huala et al., *Journal of Bacteriology*, 171, 3354-3365 (1989). A lon mutáció (HA62; 6A ábra, 2-es sáv) látható növekedést okozott a NifA-deltaN felhalmozódásban, még 1 %

oxigén mellett is, és ismételten megakadályozott mindenféle csökkenést az akkumulációban 21 % oxigén mellett (6B ábra, 2-es sáv). A snoC mutáció (LC24) szintén a NifA-deltaN felhalmozódás növekedését okozza mind 1 %, mind 21 % oxigén mellett (6A és 6B ábrák, 4-es sáv), míg az LC23 (snoB) nem mutatott megnövekedett NifA-deltaN felhalmozódást az MC1061-hez viszonyítva (6A és 6B ábra, 3-as sáv). Összegezve, a mutációknak a 21 % oxigén melletti felhalmozódásra gyakorolt hatása hasonló volt mint a NifA-AUG1 mind a NifA-deltaN esetében.

Az Mph82-ből származó lon::Tn10 inszerciót LC23-ba és LC24-be transzdukáljuk, így állítjuk elő a HA63 (lon snoB) és a HA64 (lon snoC) törzseket. Ezeket a dupla mutánsokat pEH32-vel vagy pEHdeltaRI-vel transzformáljuk, majd a NifA felhalmozódását Western blot-tal figyeljük meg. (7. és 8. ábra). A HA64 (lon snoC; 7. ábra, 3-as sáv) ugyanolyan mértékben halmozza fel a NifA-AUG1-et mint a HA62 (lon; 7. ábra, 1-es sáv), jelezve hogy a snoC és a lon mutációk hatása nem additív. A HA63 (lon snoB; 7. ábra 2-es sáv) azonban nagyobb felhalmozásra képes, ha a HA62-vel (lon) hasonlítjuk össze. Ez váratlan eredmény, mivel a snoB inszercióról úgy tűnik, hogy önmagában nincs hatása a NifA-AUG1 felhalmozódásra (4. ábra).

A lon snoB és lon snoC dupla mutációknak a NifA-deltaN felhalmozódására gyakorolt hatását is vizsgáltuk (8. ábra). Még egyszer, a HA64 (lon snoC; 8. ábra, 3-as sáv) ugyanolyan mértékben halmozza fel a NifA-deltaN-t, mint a HA62 (lon, 8. ábra, 1-es sáv), míg a HA63 (lon snoB; 8. áb-

ra, 2-es sáv) a HA62-höz (lon) viszonyítva megnövekedett felhalmozódást mutatott. A lon snoC dupla mutációnak mind a NifA-AUG1, mind a NifA-deltaN felhalmozódására gyakorolt hatása azt sugallja, hogy a snoC géntermék a lon géntermékkel együtt hat, abban az irányban, hogy csökkentse a NifA felhalmozódását, mivel a NifA szintje csak akkor csökken le, ha a sejt mindkét génből vad típusút tartalmaz. Ezzel szemben, a snoB mutációnak valamiképpen az a hatása, hogy megnöveli a lon géntermék lebontó hatásával szembeni érzékenységet anélkül, hogy a NifA felhalmozódásban változást hozna létre.

7. példa

A sno mutációknak nincs hatásuk a lac promoterre

Számos magyarázat adható arra a megfigyelésre, hogy a NifA felhalmozódása megnő LC12-ben és LC24-ben, beleértve a nifA megnövekedett transzkripcióját a lac promoterről, a transzlációs hatékonyság növekedését, illetve a NifA lebomlási sebességének csökkenését. Annak vizsgálatára, hogy vajon a lac promoterről való transzkripció növekedett-e meg ezekben a mutánsokban, a lacZ gén plazmidon található másolatának (pLAC) a természetes promoteréről való expressziója során keletkező β -galaktozidáz mennyiségét hasonlítjuk össze Escherichia coli MC1061-ben, LC12-ben (snoA), LC23-ban (snoB) és LC24-ben (snoC) (2. táblázat). A mutánsokban nincs megfigyelhető különbség a β -galaktozidáz aktivitásban, jelezve ezzel, hogy a lac promotert és a lac riboszóma kötési helyet nem érintik a mutációk. A pLAC-ból MC1061-ben, LC12-

ben, LC24-ben keletkező β -galaktozidáz mennyiségét is összehasonlítottuk SDS-poli(akril-amid) gélelektroforézissel. Az MC1061-ben és a sno mutánsokban nincs megfigyelhető különbség a β -galaktozidáz aktivitás mértékében, ha 1 %, illetve 21 % oxigén mellett növesztjük a tenyészeteket (9. ábra). Mivel a lacZ riboszómális kötődési hely és az 5'-nem transzlálódó szekvenciák jelen vannak mind a lacZ teszt plazmidon, mind a pEH32-ön található lacZ-NifA fúzión, ez az eredmény azt sugallja, hogy a NifA transzkripcióját és transzlációját semmi nem érinti az LC12-ben és az LC24-ben, hacsak az nem, hogy a lacZ szekvenciák helyett nifA található a transzlációs starthely után, és ez növekedést okoz a mutánsokban a transzláció vagy transzkripció mértékében.

8. példa

A NifA fehérje felezési ideje

Abból a célból, hogy összehasonlítsuk a NifA szintézis és lebomlás sebességét az MC1061-ben és a sno mutánsokban, levegőztetett log-fázisú sejteket impulzus-jelzünk két percig, majd a jelzett NifA eltűnésének sebességét követjük. Mivel a NifA-AUG1 felezési ideje két percnél rövidebbnek bizonyult, ez nehezé tette a megbízható mérések elvégzését, ezért a sokkal stabilabb NifA-deltaN felezési idejét mértük (10. és 11. ábra; 5. táblázat). Jóllehet a NifA-deltaN aktivitása csak enyhén nőtt meg a lon, snoB vagy snoC mutációk hatására, ezek a mutációk hasonlóképpen érintették a NifA-deltaN és a NifA-AUG1 felhalmozódását 1 %, illetve 21 % oxigén mellett. A NifA-deltaN felezési ideje megnőtt a

HA62 lon mutánsban, 3,5 órától körülbelül 7 órára (5. táblázat). A snoB inszerció önmagában nincs jelentős hatással a NifA-deltaN felezési idejére, ami egyezik azzal, hogy ez a mutáns nem képes megnövelni a NifA-deltaN vagy a NifA-AUG1 felhalmozódását. A Western blot elemzés eredményei alapján is, a NifA-deltaN expressziója a snoB lon dupla mutációban megnövekedett felezési időt mutatott (körülbelül 21 óra), ami nagyobb volt annál, mint amit egyedül a lon mutáció okoz (5. táblázat). A NifA-deltaN felezési ideje LC24-ben (snoC) és HA64-ben (lon snoC) nem becsülhető meg pontosan, mivel az adatok sokkal jobban szórtak ezekben a törzsekben (11. ábra; 5. táblázat).

5. táblázat

A NifA-deltaN fél-életideje MC1061-ben és a sno
mutánsokban 28°C-on

<u>Törzs</u>	<u>Felezési idő (óra)*</u>	<u>Tartomány**</u>
MC1061	3,5	2,7-5,0
HA62 (lon)	7,0	5,4-10,0
LC23 (snoB)	5,3	4,8-5,9
LC24 (snoC)	5,0	2,8-24,5*
HA63 (lon snoB)	21,4	12,6-70,2
HA64 (lon snoC)	3,8	2,3-10,3*

* Az adatok az 5. ábrán látható impulzus-jelölési kísérletből származnak.

** Az adott tartomány a 95 %-os konfidencia szintre vonatkozik (két standard deviáció).

A felezési idő értékeket a legkisebb négyzetek módszerével határozzuk meg, egyetlen kísérletből származó exponenciálisan csökkenő görbére alkalmazva. A tartomány egy standard deviációt jelent az átlagos iránytangensből. Más kísérletekkel hasonló eredményeket kaptunk (nem közölt eredmények).

Az előző eredmények azt mutatták, hogy a NifA inaktiválódása magas oxigénszint mellett *Escherichia coli*-ban és *Rhizobium meliloti*-ban nemcsak a proteolízis következménye, mivel a NifA néhány mutáns formája esetében a NifA szintje csak enyhén csökken a sejtekben az oxigén növelésének hatására, míg a NifA aktivitás sokkal gyorsabban csökken [Huala et al., *Journal of Bacteriology*, 171, 3354-3365 (1989)]. Az a megfigyelés, hogy a lon és snoC mutációk a NifA aktivitás csökkenését okozhatják, azáltal hogy csökkentik a sejtben található NifA mennyiségét, kétféleképpen magyarázható. Egy lehetséges magyarázat az, hogy a lon és snoC géntermékek csak az aktív NifA-t bontják le, illetve mind az aktív, mind az inaktív NifA-t lebontják. Egy másik lehetőség, hogy a lon és a snoC géntermék csak az inaktív NifA-t bontja le, és az aktív NifA szintjét csak indirekt módon érinti, azáltal, hogy az inaktív NifA pool-t eliminálja, és ennek következtében megakadályozza, hogy a NifA inaktiváció visszaforduljon. Ez akkor fordulhat elő, ha a NifA inaktivációja egy megfordítható folyamat. Mivel azonban a *Bradyrhizobium japonicum*-ból származó NifA inaktivációja irreverzibilis folyamat [Kullik, I. et al., *Arch. Microbiol.*, 151, 191-197 (1989)],

ezért valószínű, hogy ez a feltevés nem igaz.

Mind a lon, mind a snoC mutációkat tartalmazó *Escherichia coli*-ban nem mutatható ki a NifA felhalmozódás növekedése vagy a felezési idő növekedése, ha a csak lon mutációt tartalmazó törzzsel hasonlítjuk össze. Ha a lon és a snoC gének termékei független proteázok lennének, akkor mindegyik képes lenne arra, hogy a NifA-t lebontsa, a másik jelenlététől függetlenül, és a két mutáció hatása additív lenne. Mivel nem ez figyelhető meg, ezért a lon és a snoC gének termékeinek együtt kell működniük ahhoz, hogy lebontsák a NifA-t. Az az elképzelés, hogy a lon génterméknek egy másik *Escherichia coli* faktorra is szüksége van ahhoz, hogy néhány fehérjét lebontson, már korábban felmerült [Schoemaker, J.M. et al., *Journal of Bacteriology*, 158, 551-561 (1984)]. A Sula, a sejtosztódás egy instabil szabályozója nagymértékben megnövekedett stabilitást mutat egy lon mutánsban. A lon géntermék önmagában azonban nem lehet elegendő a Sula proteolíziséhez. A lon nem képes a Sula-t in vitro lebontani, jóllehet azonos körülmények között a protein A-t és a kazeint lebontja, arra a következtetésre juttatva a kutatót, hogy más faktorok is szükségesek a Sula lon-nal való lebontásához.

Az valószínűtlen, hogy a snoB gén egy proteázt kódol, mivel a snoB-ben egy mutáció tízszeresre növeli a NifA aktivitását anélkül, hogy látható növekedést okozna a NifA felhalmozódásában, miközben a lon vagy snoC mutáció, hogy hasonló növekedést okozzon a NifA aktivitásban, a NifA felhalmozódását néhányszorosra növeli. Ennélfogva, a snoB mu-

táció hatása a NifA specifikus aktivitásában nyilvánul meg, és nem a felhalmozódásában. A NifA aktivitás csökkenése a NifA felhalmozódás ezzel együttjáró csökkenésével növekvő oxigénkoncentráció mellett [Huala, E. et al., Journal of Bacteriology, 171, 3354-3365 B1989); lásd még a 3. táblázatot] megerősíti azt, hogy a NifA inaktiválódása a degradációtól eltérő mechanizmussal játszódhat le. A NifA oxigénnel való inaktiválásáról azt javasolták, hogy egy hozzákötődő fémion oxidációs állapotának oxidációs állapotában beálló változáson keresztül játszódik le [Fischer, H. M. et al., Nucleic Acids Research, 16, 2207-2224 (1988)]. A NifA oxigén következtében beálló inaktiválódásának ez a modellje nem sugallja azonnal azt, hogy a gazdaszervezet faktorai is szerepet játszanak benne. Az azonban lehetséges, hogy a snoB-be való inszerciók közvetve megvédik a NifA-t az oxidatív károsodástól, például úgy, hogy bizonyos enzimeknek, például a szuperoxid-diszmutáznak és kataláznak a szintjében okoznak növekedést, ami megvédi a sejteket az oxidatív károsodásoktól. Egy másik elképzelés szerint a snoB termék közvetlenül hathat a NifA aktivitásra oxigén jelenlétében, ezzel azt sugallva, hogy a Klebsiella pneumoniae NifL funkcionális analógjaként működik.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Gazdaszervezet, **azzal jellemezve**, hogy a snoC-ben mutációt tartalmaz, és az említett mutáció eredménye a rekombináns úton előállított fehérjék lebomlásának csökkent sebessége.

2. Az 1. igénypont szerinti gazdaszervezet, **azzal jellemezve**, hogy az említett snoC mutáció az Escherichia coli genetikai térképén a 23-31 perces régióban található, és az említett mutáció körülbelül 10 kb távolságban van a nirR-től a rac irányában.

3. Az 1. igénypont szerinti gazdaszervezet, **azzal jellemezve**, hogy az említett gazdaszervezet az ATCC 55040 letéti számmal rendelkezik.

4. Gazdaszervezet, **azzal jellemezve**, hogy a lon-ban és a snoB-ben mutációt tartalmaz, és az említett mutációk eredménye a rekombináns úton előállított fehérjék lebomlásának csökkent sebessége.

5. A 4. igénypont szerinti gazdaszervezet, **azzal jellemezve**, hogy az említett mutáció körülbelül 160 bp távolságra van az alaS terminációs kodonja után.

6. A 4. igénypont szerinti gazdaszervezet, **azzal jellemezve**, hogy az ATCC 55039 letéti számmal rendelkezik.

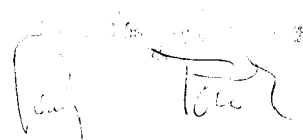
7. Rekombináns fehérje, **azzal jellemezve**, hogy az említett rekombináns fehérjét az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti baktérium gazdaszervezettel állítjuk elő.

8. Tisztított snoC DNS, **azzal jellemezve**, hogy az

említett snoC DNS-t az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti gazdaszervezetből izoláljuk.

9. Tisztított snoB DNS, **azzal jellemezve**, hogy az említett snoB DNS-t a 4-6. igénypontok bármelyike szerinti gazdaszervezetből izoláljuk.

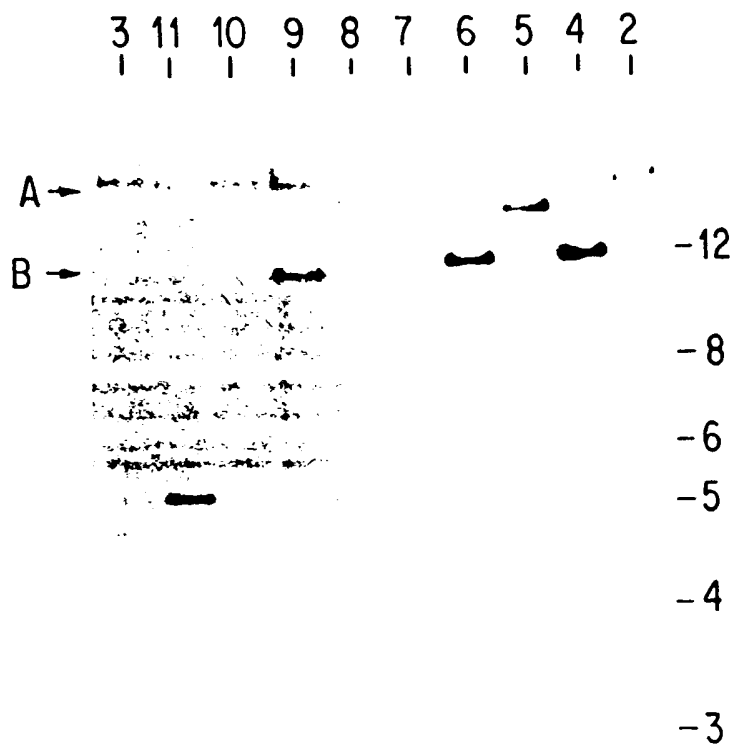
A meghatalmazott:



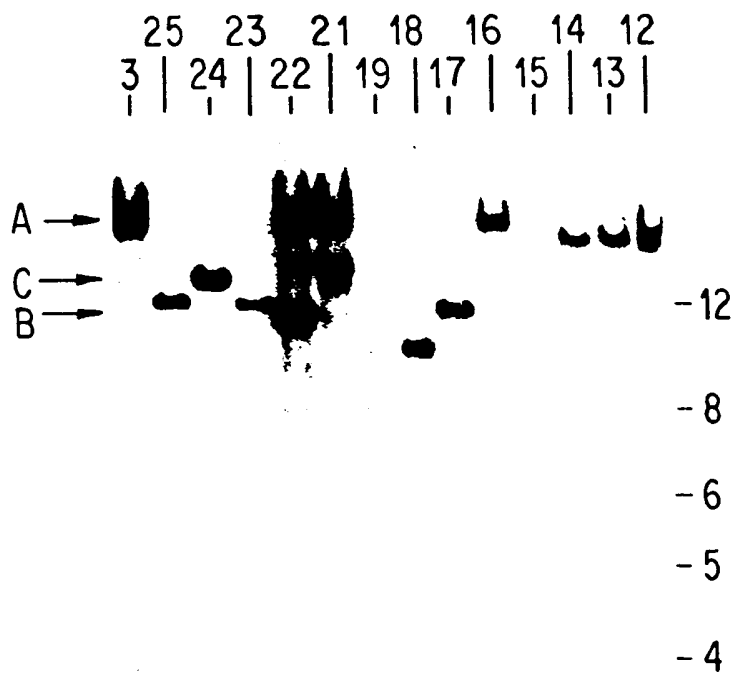
55 oldal
+ 11 kiegészítő

69 oldal - 14 oldal min.

Bácsi Zolt



1A ábra



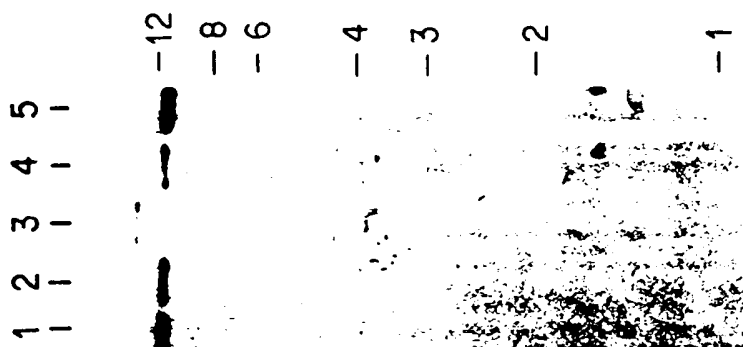
1B ábra

fügy 1802

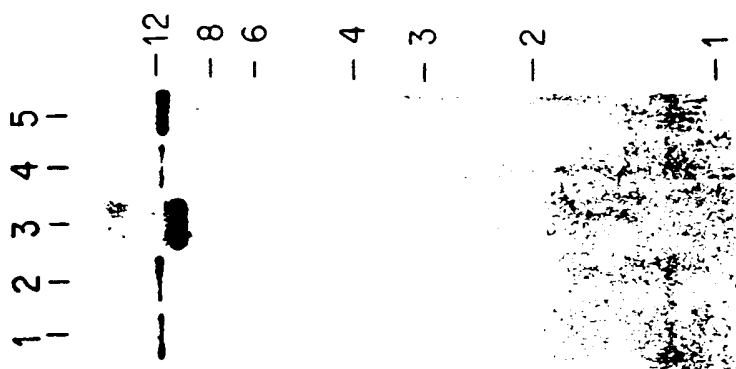
P9203439

0705

14/2



2B abra



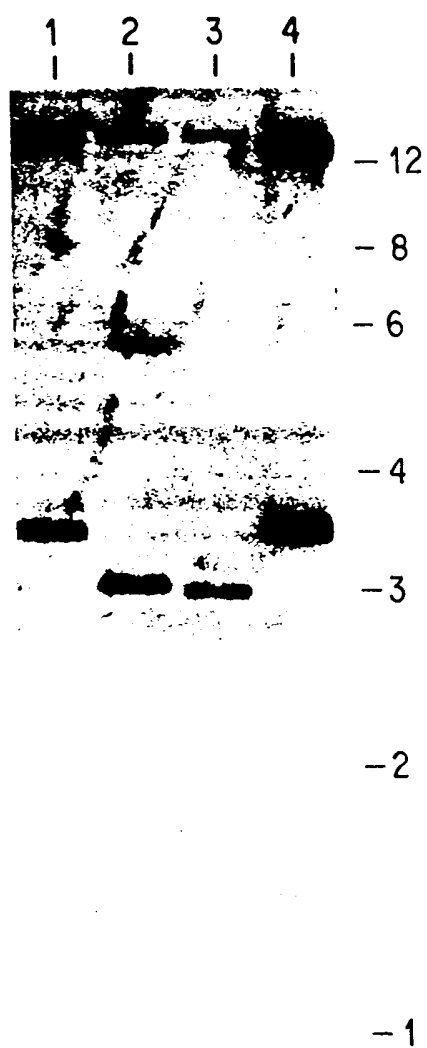
2A abra

Jim Towle

P8203430

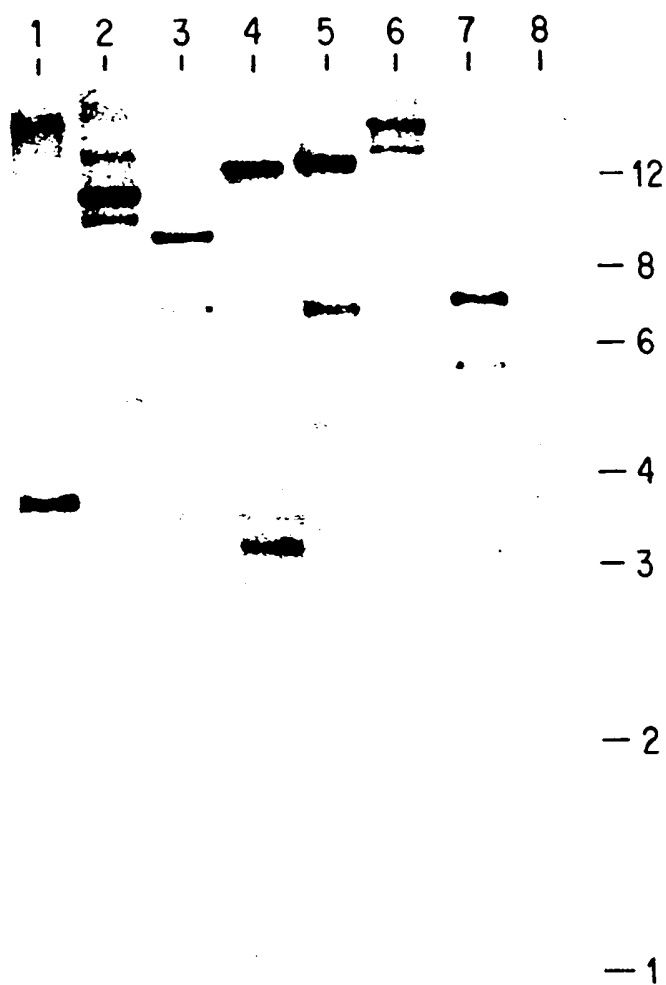
6725

14/3



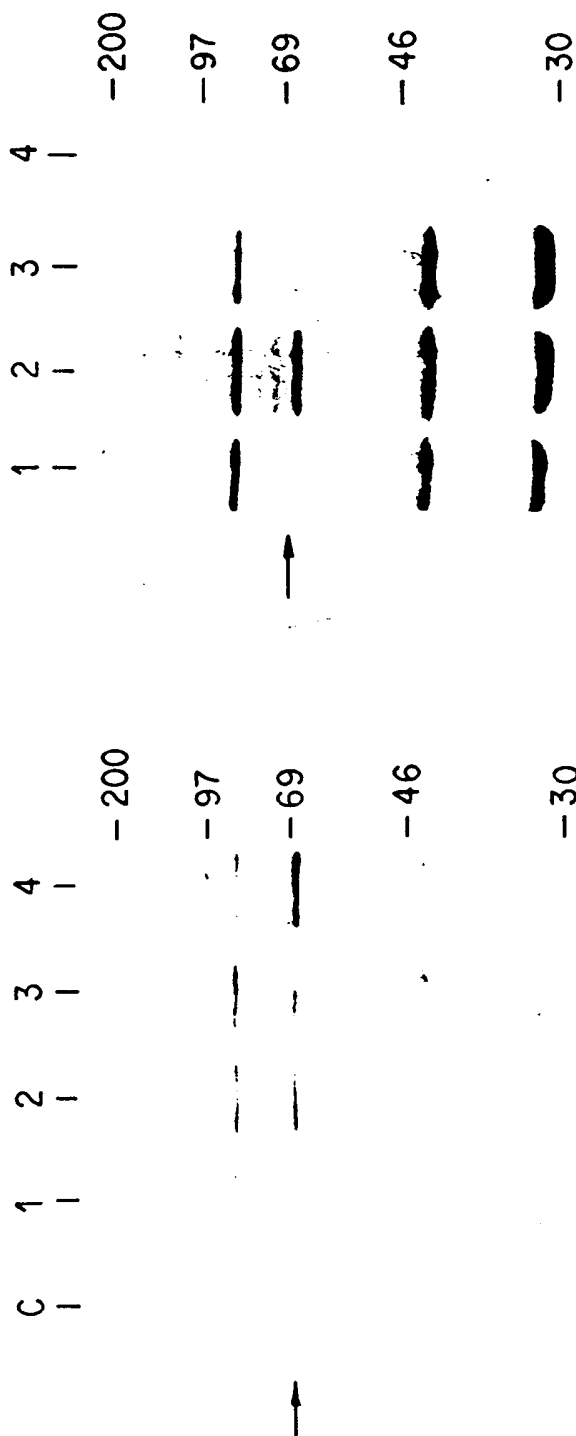
3. abra

Jimmy Towh



4. abra

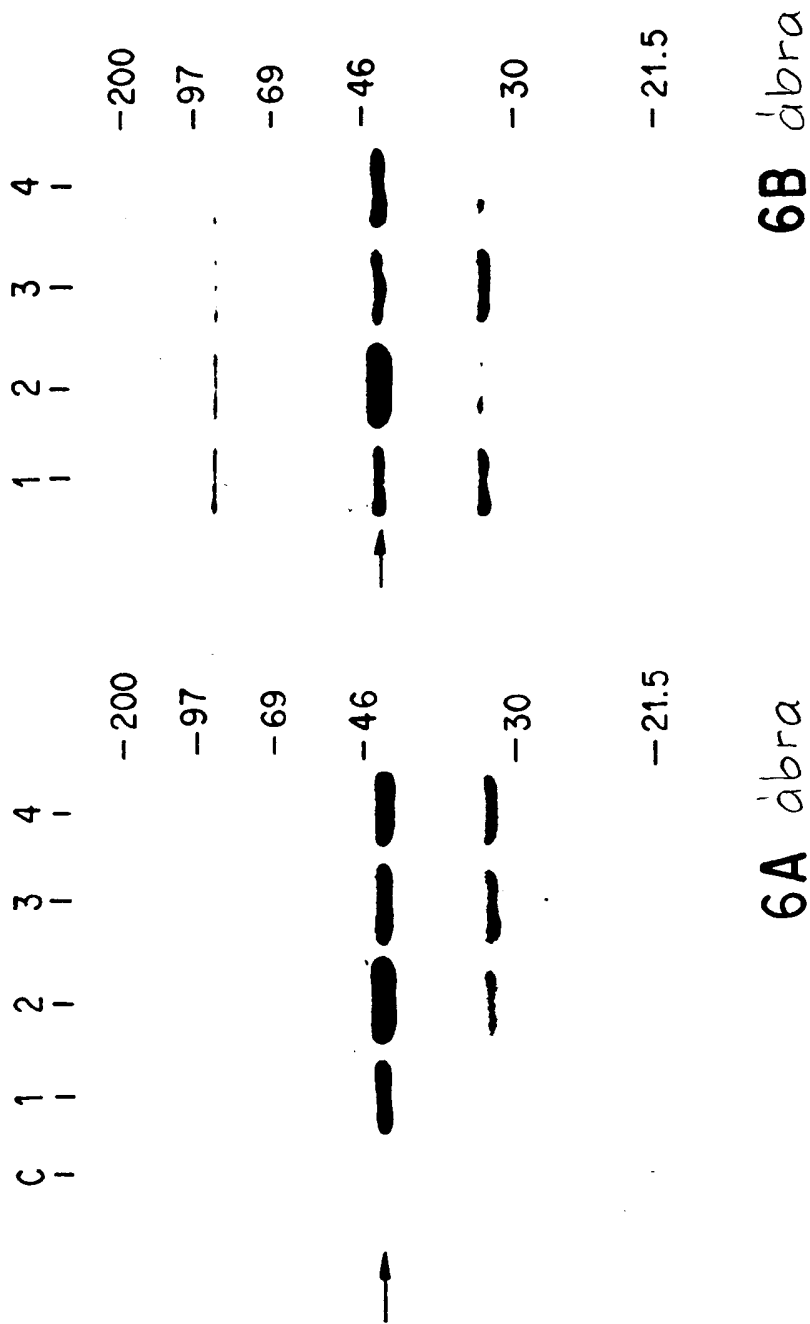
Tom



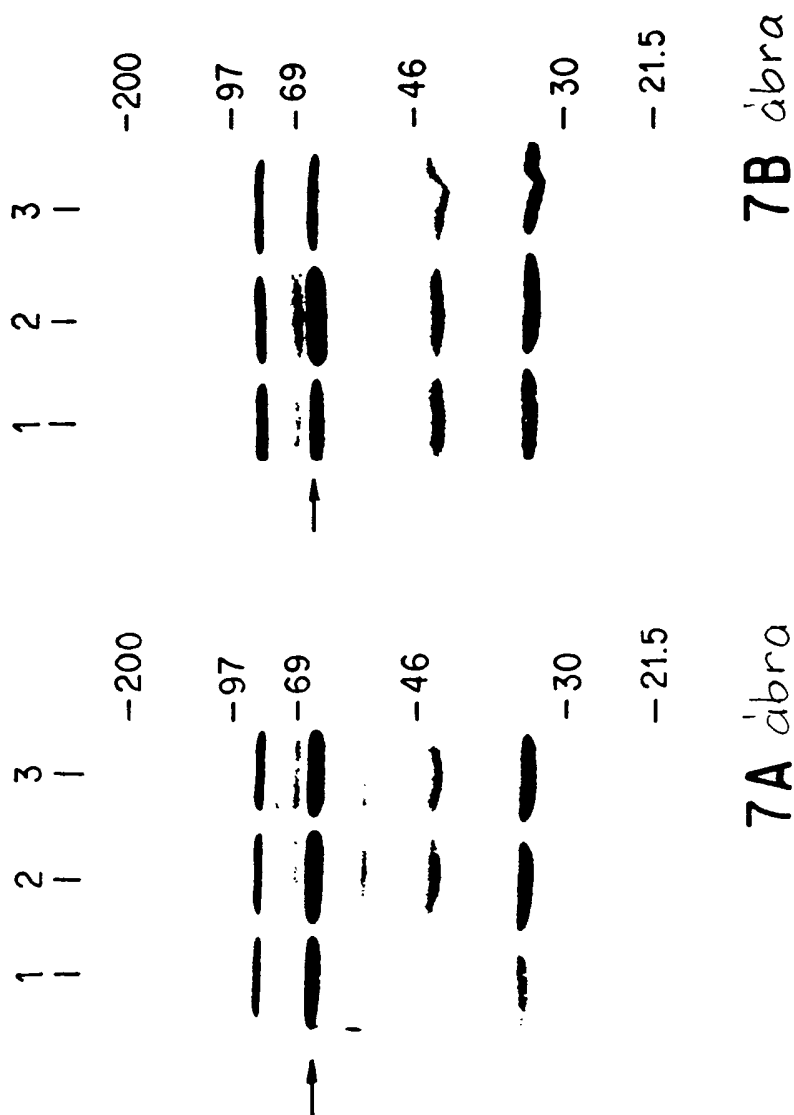
5B abra

5A abra

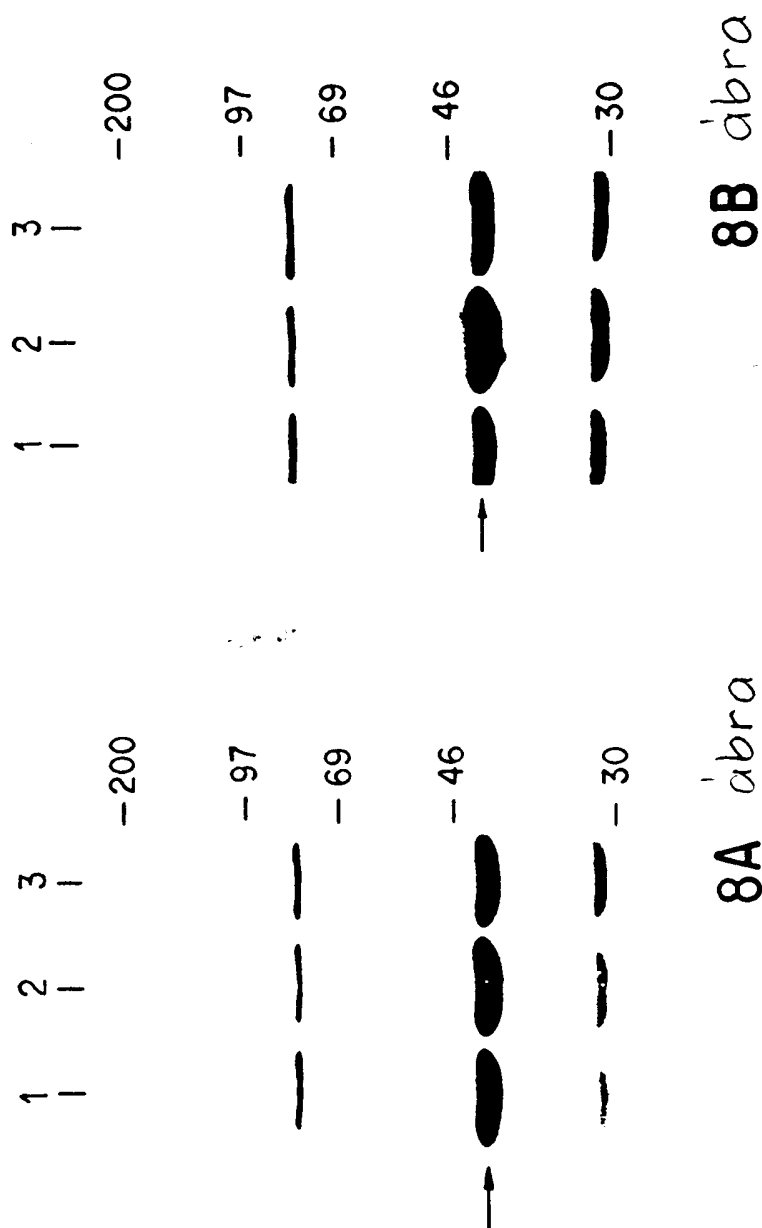
10/5/12



Finny Tour



ing
Touh

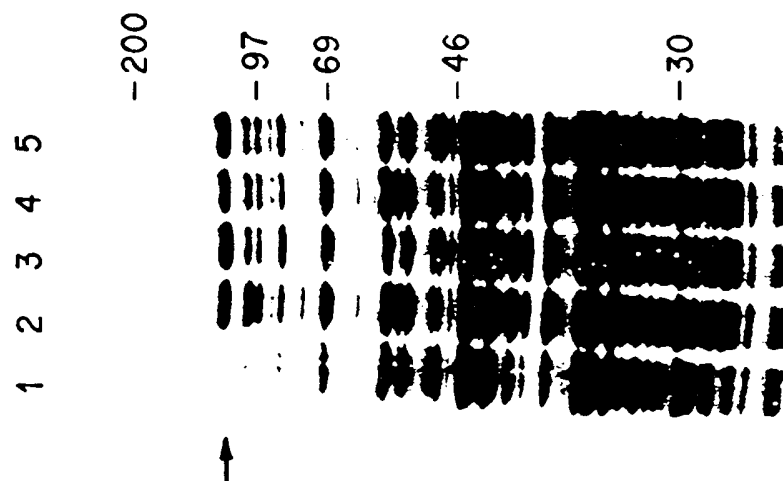


Jimmy Tow

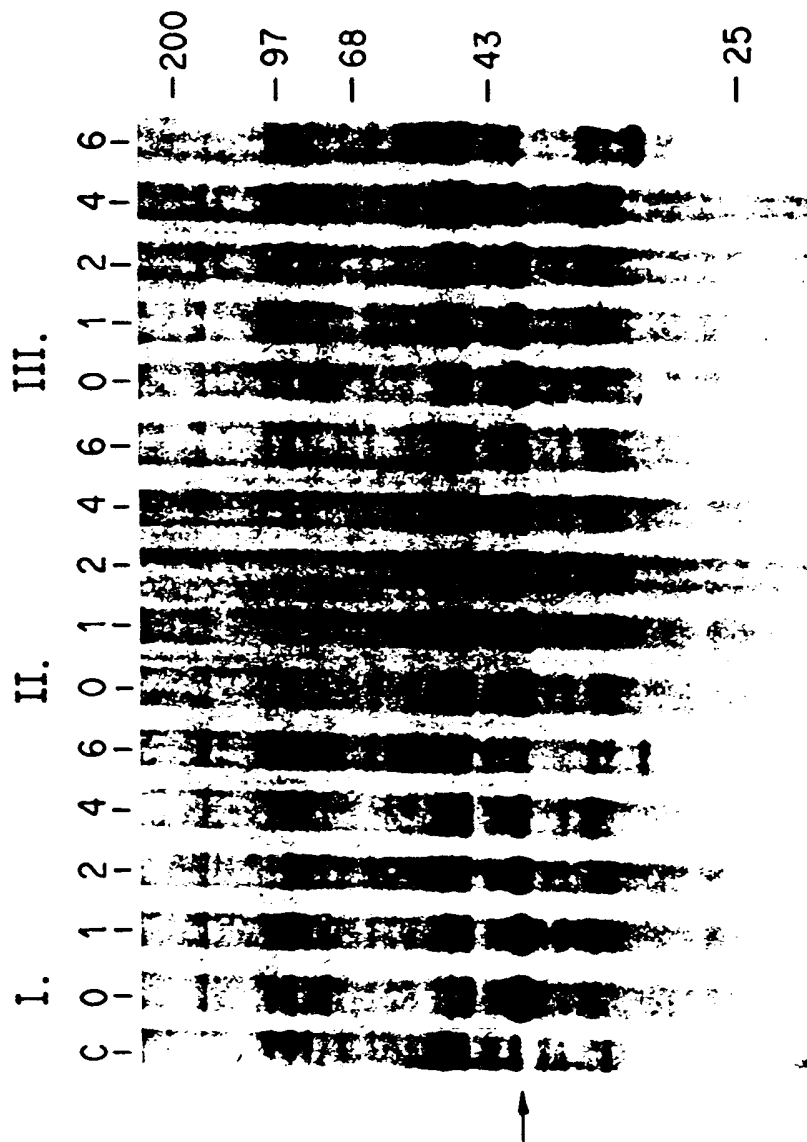
9B dbra



9A dbra

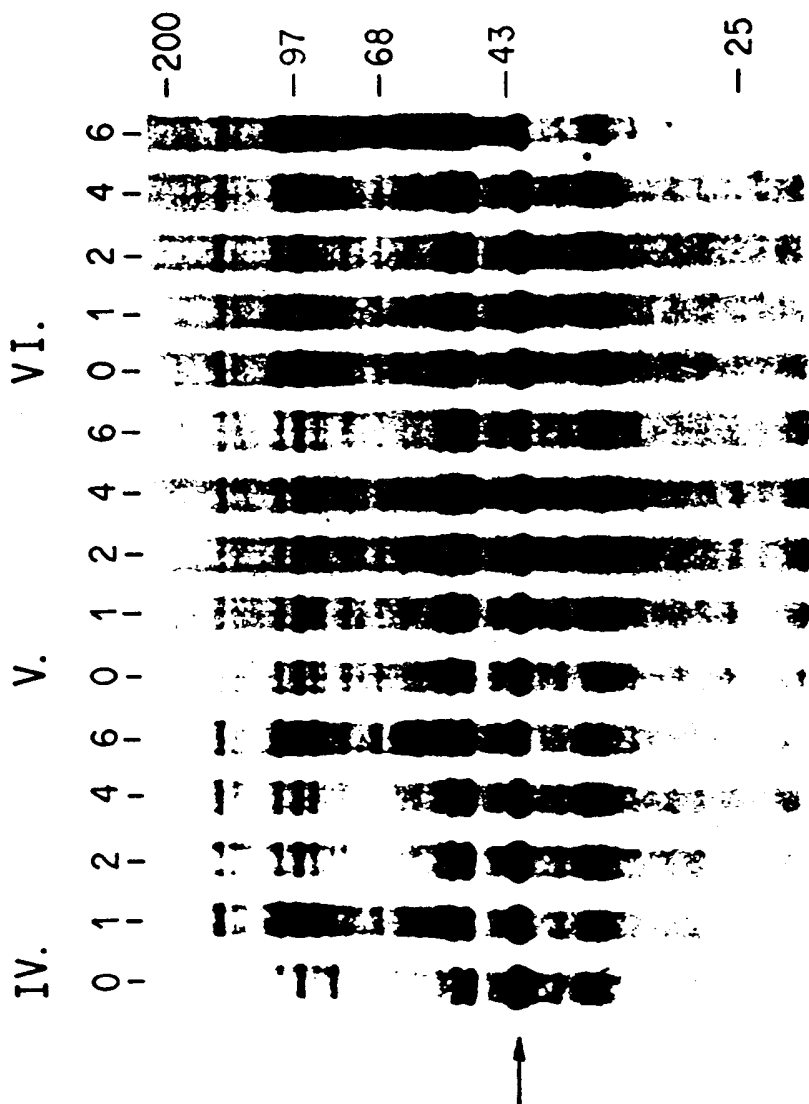


Jimmy Tost



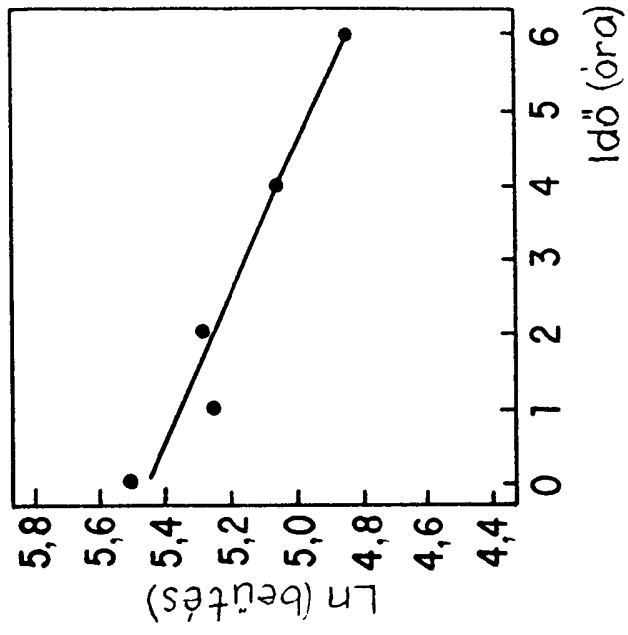
10. abra

Finj Tösl

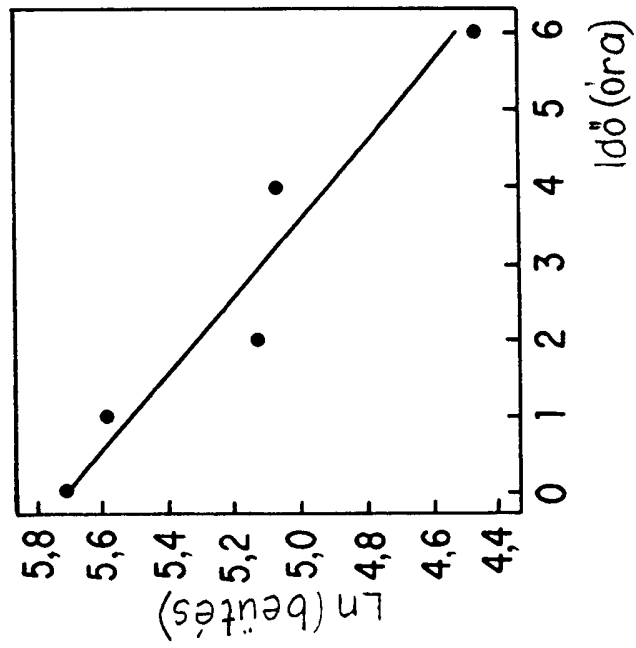


10. ábra (folyt.)

Priny *Boh*

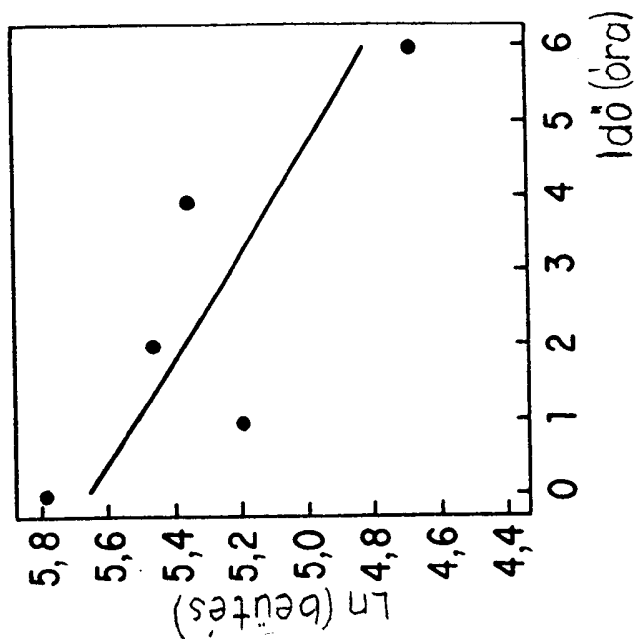


11(b) ábra

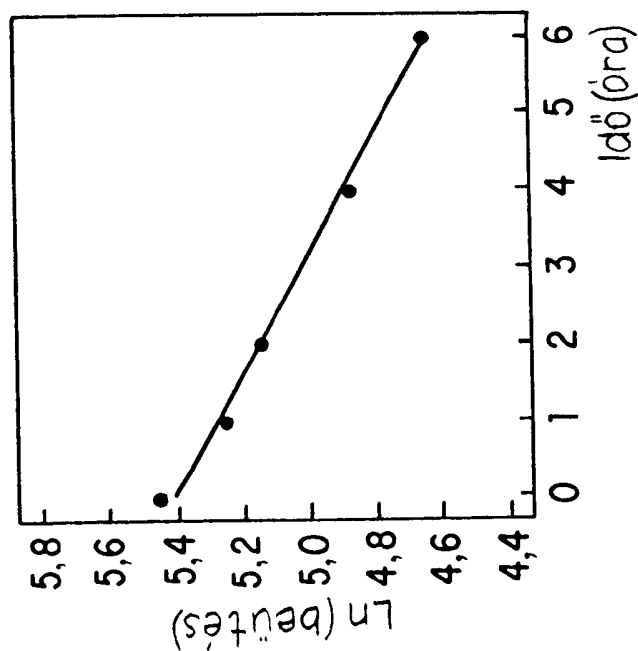


11(a) ábra

gyűj. Tóth

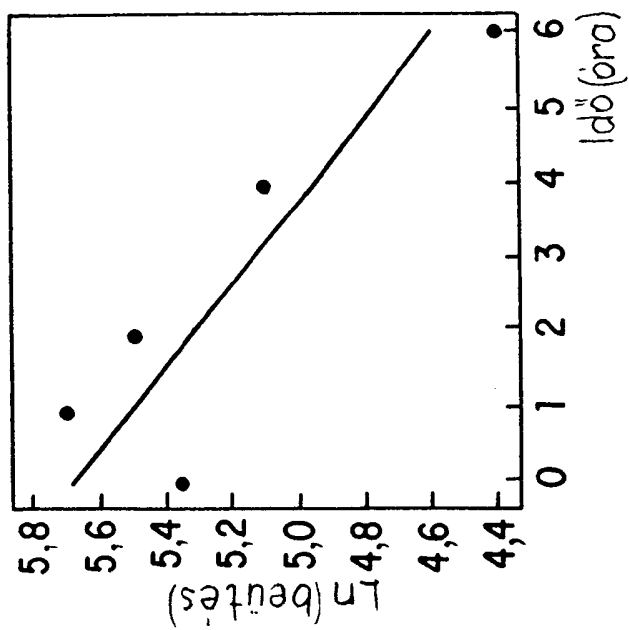


11(d) ábra

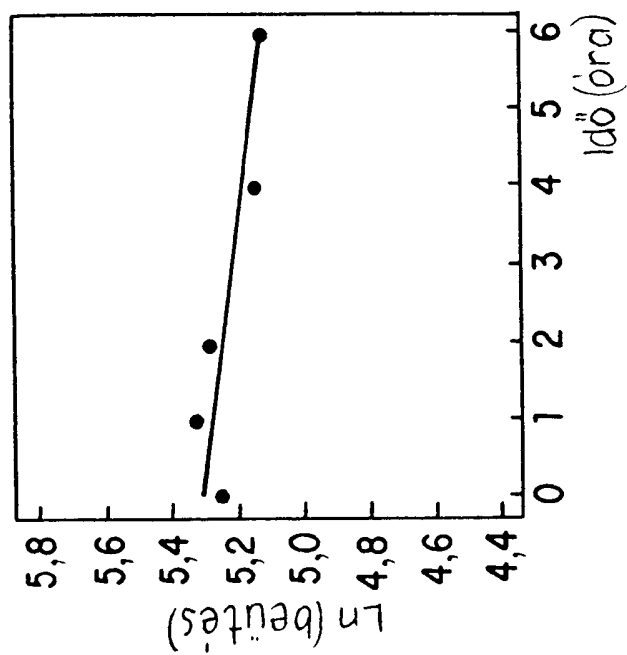


11(c) ábra

Fin
1002



11(f) ábra



11(e) ábra

Fing Towl