(19) DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

Ausschliessungspatent

Erteilt gemaeß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461 (11) 211 359

Int.Cl.[3] 3(51) C 12 N 15/00

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) AP C 12 N/ 2512 877
(31) P3220116.8
(22) 26.05.83
(32) 28.05.82
(44) 11.07.84
(33) DE

(71) siehe (73)
(72) DWORKIN-RASTL, EVA,DR.;AT;DWORKIN, MARC-BRUCE,DR.;US;ADOLF, GUENTHER,MAG. DR.;AT; MEINDL, PETER,DR.;AT; BODO, GERHARD,PROF. DR.;AT;SWETLY, PETER,DR.;AT;
(73) DR. KARL THOMAE GMBH;BIBERACH AN DER RISS, DE

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES MIKROORGANISMUS

(57) Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Herstellung von Mikroorganismen, die die genetische Information zur Biosynthese von Interferonen des Typs α oder Typs β in gentechnologisch entsprechend konstruierten Plasmiden tragen und dadurch die grundlegende Voraussetzung für ein mikrobielles Verfahren zur Synthese dieser Interferone darstellen.

(19) DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

Ausschliessungspatent

Erteilt gemaeß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461 (11) 211 359

Int.Cl.³ 3(51) C 12 N 15/00

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) AP C 12 N/ 2512 877
(31) P3220116.8

(22) 26.05.83
(32) 28.05.82

(44) 11.07.84
(33) DE

(71) siehe (73)
(72) DWORKIN-RASTL, EVA,DR.;AT;DWORKIN, MARC-BRUCE,DR.;US;ADOLF, GUENTHER,MAG. DR.;AT; MEINDL, PETER,DR.;AT; BODO, GERHARD,PROF. DR.;AT;SWETLY, PETER,DR.;AT;
(73) DR. KARL THOMAE GMBH; BIBERACH AN DER RISS, DE

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES MIKROORGANISMUS

(57) Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Herstellung von Mikroorganismen, die die genetische Information zur Biosynthese von Interferonen des Typs α oder Typs β in gentechnologisch entsprechend konstruierten Plasmiden tragen und dadurch die grundlegende Voraussetzung für ein mikrobielles Verfahren zur Synthese dieser Interferone darstellen.

Zur PS Nr. 211 359
ist eine Zweitschrift erschienen
(Korrigiert gemäß § 23 Abs. 2 Anordn.ü,d. Verfahren v.d. Patentamt)

Mikrobiologisch hergestellte α- und β-Interferone, DNA-Sequenzen, die für diese Interferone codieren, Mikroorganismen, die diese genetische Information enthalten, und Verfahren zu ihrer Herstellung

Aus der Literatur sind drei Typen von Humaninterferonen bekannt, nämlich Leukocyten-Interferon (Interferon-α, Kurzbezeichnung: IFN-α), Fibroblasten-Interferon (Interferon-β, Kurzbezeichnung: IFN-β) und Immuninterferon (Interferon-γ, Kurzbezeichnung: IFN-γ) (siehe W. E. Stewart II "The Interferon System", Springer-Verlag Wien-New York, 2. Auflage (1981)). Menschliche Leukocyten oder menschliche myeloblastoide Zellen, welche mit Virus stimuliert sind, produzieren Leukocyten-Interferon, menschliche Fibroblasten, welche mit Virus oder einer geeigneten Nukleinsäure induziert sind, Fibroblasten-Interferon und menschliche T-Lymphocyten, welche mit Mitogen, z.B. Concanavalin, induziert sind, Immuninterferon.

Außerdem ist bekannt, daß menschliche Zellen des B-Lymphocyten-Typs, wie sie beispielsweise durch die Zellinien NC-37, Namalwa, Akuba oder RPMI 1788 repräsentiert werden, nach Stimulation durch Virus gleichzeitig Leukocyten-Interferon und Fibroblasten-Interferon produzieren (siehe Journal of General Virology 38, 51-59 (1977)). Hierbei können die Mengenverhältnisse an produziertem IFN-α und IFN-β durch die Wahl der Induktionsbedingungen

variiert werden (siehe Journal of Interferon Research 2, im Druck (1982)). Beispielsweise erhält man aus mit Sendaivirus induzierten Zellen verschiedener Zellinien folgende Mengenverhältnisse an IFN-α und IFN-β:

Zellinie	Prozent Interferon-Aktivität, neutralisiert durch spezifische Antiseren gegen		
	IFN-α	IFN-β	IFN-α + IFN-β
Namalwa	52	34	⩾98
NC-37	40	52	⩾97
Akuba	85	27	⩾98
RPMI 1788	68	29	⩾98

Desweiteren brachte molekulares Klonieren von IFN-α-Genen aus Leukocyten (siehe Nature 284, 316-320 (1980); Science 209, 1343-1347 (1980) und EP-A1-0.032.134) und aus myeloblastoiden Zellen (siehe Nature 287, 411-416 (1980), ibid 290, 20-26 (1981) und GB-A-2.079.291) das Ergebnis, daß IFN-α durch eine Genfamilie codiert wird, welche aus mindestens 10 voneinander unterscheidbaren Genen besteht, was wiederum zur Folge hat, daß die Genprodukte dieser DNA-Sequenzen kein einheitliches Protein darstellen; das heißt, daß IFN-α eine Mischung aus einander ähnlichen Proteinen darstellt. Diese Subtypen wurden als IFN-α 1,2,3 .... (siehe Nature 287, 401-408 (1980) und Gene 15, 379-394 (1981)) oder LeIFN A,B,C..... (siehe Nature 290, 20-26 (1981) in der Literatur bezeichnet.

Demgegenüber wurde für IFN-β eine einheitliche DNA-Sequenz gefunden; das heißt, für Fibroblasteninterferon codiert nur ein Einzelgen, und es sind daher auch keine Subtypen bekannt (siehe Nature 285, 542-547 (1980)).

Obwohl, anders als innerhalb der IFN-α-Genfamilie, zwischen IFN-α-Genen und dem IFN-ß-Gen keine Kreuzhybridisierung stattfindet, weisen die Sequenzen etwa 45 % Homologie auf (siehe Nature 285, 547-549 (1980)). Hierbei ist der längste Sequenzabschnitt, bei welchem vollständige Homologie zwischen den (5 von 7) funktionellen IFN-α-Genen und dem IFN-ß-Gen besteht, 13 Nukleotide lang. Dieses Tridekanukleotid ist literaturbekannt (siehe Eur. J. Cell. Biol 25, 8-9 (1981)). Die dieses Tridekanukleotid enthaltenden IFN-α-Gene sind LeIFN B,C,D,F,G; in LeIFN A und H sind nur 12 der 13 Nukleotide vorhanden (siehe Nature 290, 20-26 (1981)).

Die Herstellung der Interferone des Typs α und des Typs ß läßt sich überraschenderweise nun dadurch verbessern, daß man aus einem in an sich bekannter Weise erhaltenen Gemisch von Bakterien, die verschiedenste rekombinante DNA-Moleküle enthalten, mit Hilfe dieses Tridekanukleotids durch Koloniehybridisierung diejenigen identifiziert, die die Information für Interferon tragen, wobei IFN-α- und IFN-ß-Sequenzen in demselben Arbeitsgang gewonnen werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die gleichzeitige Isolierung von Mikroorganismen und deren in üblicher Weise erhältlichen Mutanten, die die genetische Information für die Interferone des Typs α oder des Typs ß tragen und somit die grundlegende Voraussetzung für die Produktion dieser Interferone darstellen:

Zur Erreichung des erfindungsgemäßen Zieles kann man beispielsweise in folgender Weise verfahren:

Auswahl einer geeigneten Zellinie, die nach Induktion, z.B. nach Sendaivirusinduktion, sowohl IFN-α als auch IFN-ß produziert. Als menschliche Zellen des B-Lymphocyten-Typs kommen beispielsweise die Zellinien Namalwa, NC-37, Akuba oder RPMI 1788 in Betracht, vorzugsweise jedoch die Zellinie Namalwa.

Die ausgewählten Zellen werden zweckmäßigerweise zum Zeitpunkt maximaler IFN-mRNA-Synthese denaturiert, zweckmäßigerweise 6-12 Stunden, vorzugsweise jedoch 9 Stunden, nach der Virusinduktion. Nach Abtrennen der Zellkerne wird aus dem Zellcytoplasma die RNA durch Phenolextraktion und Alkoholfällung gereinigt, nachfolgend durch Oligo (dT)-Zellulose-Chromatographie die Poly(A)$^+$RNA isoliert und diese durch Gradientenzentrifugation im Hinblick auf interferonspezifische Sequenzen angereichert (siehe linke Spalte der Figur 1).

Die so gereinigte Poly(A)$^+$RNA wird als Matrize zur Herstellung von einzelsträngiger cDNA mittels des Enzyms Reverse Transkriptase verwendet. Der zu diesem Einzel-DNA-Strang komplementäre zweite DNA-Strang wird mittels DNA-Polymerase I synthesiert. Die cDNA-Synthese und die Synthese des komplementären zweiten DNA-Stranges erfolgt in einer Lösung, welche die Deoxynucleosidtriphosphate des Adenosins, Thymidins, Guanosins und Cytidins enthält. Die erhaltene doppelsträngige cDNA-Mischung wird anschließend an beiden Strangenden durch das Enzym S1 Nuklease so modifiziert, daß überhängende Einzelstrangregionen entfernt werden, und jene doppelsträngigen DNA-Moleküle mittels Gradienten-Zentrifugation isoliert, welche mindestens 600 Basenpaare aufweisen. Die so erhaltene cDNA-Mischung wird mittels des Enzyms Terminale Transferase durch Oligodeoxycytidin-Anlagerung am 3'-Ende beider Stränge um etwa 15 Nukleotide verlängert, womit ein Bestandteil der Synthese rekombinater Moleküle fertiggestellt ist (siehe linke Spalte der Figur 1).

Als zweite Komponente wird ein zirkuläres doppelsträngiges Plasmid, vorzugsweise aus Escherichia coli stammend, z.B. Escherichia coli Plasmid pBR322, mittels Restriktionsendonuklease Pst I linearisiert und analog der cDNA-Mischung durch Anlagerung von Oligodeoxyguanidin an die 3'-Enden des Moleküls so modifiziert, daß überhängende Oligodeoxyguanidinenden entstehen. Diese Enden können mit den freien Oligodeoxycytidinenden der cDNA-Moleküle stabile DNA Doppelstrang-Regionen bilden (siehe rechte Spalte der Figur 1).

Mit den so hergestellten Hybridplasmiden, z.B. aus pBR322 und cDNA, wird ein Mikroorganismus als Wirt, z.B. Escherichia coli HB 101, transformiert, in dem die Replikation und Expression dieser DNA erfolgt.

Aus den so hergestellten Klonen werden nun diejenigen, welche für IFN-α oder für IFN-ß spezifische Sequenzen enthalten, durch Koloniehybridisierung nachgewiesen. Als Probe dient radioaktiv markierte cDNA, welche durch reverse Transkription von IFN-mRNA-hältiger RNA, mit dem für Interferonsequenzen spezifischen Tridekanukleotid 5'dCCTTCTGGAACTG3' als Primer, synthetisiert wird. Hierzu wird das Tridekanukleotid radioaktiv am Ende markiert, vorzugsweise mit γ - ^{32}P-ATP und T4-Polynukleotid-Kinase. Die Herstellung des Iniationskomplexes für die Reverse-Transkriptase-Reaktion mit einem Überschuß des markierten Tridekanukleotids und Poly(A)$^+$RNA aus Sendaivirus-induzierten Zellen erfolgt analog den vorstehend beschriebenen Bedingungen (siehe Figur 2). Eine so hergestellte cDNA trägt also nur dann eine radioaktive Markierung, wenn der Initiationskomplex für die Reverse Transkriptase-Reaktion mit dem Tridekanukleotid stattgefunden hat, da ja die Markierung ausschließlich in diesem Segment enthalten ist. Hierdurch wird erfindungsgemäß eine hohe Selektivität für das Erkennen der DNA mit einer zum Tridekanukleotid komplementären DNA-Sequenz und damit für α- und ß-Interferon-DNA gewährleistet. Das Sichtbarmachen jener transformierten Bakterienkolonien, welche Hybridplasmide mit zum eingesetzten Tridekanukleotid komplementären DNA-Sequenzen enthalten, erfolgt durch Autoradiographie (siehe Figur 3). Auf diese Weise wurden von etwa 13000 transformierten Bakterienklonen 190 Klone isoliert, welche mit der durch das Tridekanukleotid initiierten cDNA ein positives Signal ergaben, das heißt, etwa 1 % aller Klone der Genbank enthalten die spezifische Sequenz dCCTTCTGGAACTG.

Der Nachweis der interferonspezifischen Nukleinsäuresequenzen in den rekombinanten DNA-Molekülen erfolgt durch RNA-Transfer-Hybridisierung, Hybridisolierung, Restriktionskartierung und Nukleinsäuresequenzierung. Der biologische Nachweis der gebildeten Interferonpolypeptide erfolgt durch Bestimmung der antiviralen Aktivität, die Bestimmung des Interferontyps durch immunologische Methoden.

Die auf diese Weise isolierten Interferongene können dann in Bakterien, aber auch in anderen Organismen, wie z.B. Hefe, zur Expression gebracht werden, wobei durch Vorschalten eines Promotors in Kombination mit einer Ribosomenbindungssequenz Werte bis zum etwa 10^4-fachen der Spontanexpression erzielt werden können.

Durch die vorliegende Erfindung ist es somit erstmals gelungen, durch die Wahl von Zellen des B-Lymphocyten-Typs als Ausgangsmaterial zur Isolierung der erforderlichen RNA und unter Verwendung eines interferonspezifischen Oligonukleotids als Primer für die als Hybridisierungsprobe verwendete cDNA das erfindungsgemäße Ziel zu erreichen, zwei verwandte Genklassen, nämlich die 2 Genklassen IFN-α und IFN-β, in einem Arbeitsgang zu isolieren und hierauf ihre Verwendbarkeit für die Produktion von Interferonen zu zeigen.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern:

Beispiel A

Auswahl einer geeigneten Zellinie zur Produktion von Poly(A)$^+$RNA, welche humane IFN-α und IFN-β-mRNA enthält:

Verschiedene humane Zellinien wurden mit Sendaivirus zur Interferonproduktion nach literaturbekannten Verfahren induziert und aus den Zellüberständen nach 24 - 48 Stunden der Gehalt an ~~IFN-~~α und IFN-β durch Neutralisation mit typspezifischen Antiseren bestimmt. Die gefundenen Mengenverhältnisse zwischen IFN-α und IFN-β in einigen der getesteten Zellinien sind in der Tabelle auf Seite 2 zusammengestellt. Dabei zeigt sich, daß Namalwa Zellen z.B. etwas mehr als 50 % IFN-α und bis zu etwa 50 % IFN-β nach Sendaivirus Induktion produzieren.

Der Neutralisationstest wurde wie folgt durchgeführt:

Ungefähr 10 Interferon-Einheiten aus den Überständen der mit Sendaivirus induzierten Zellkulturen wurden 60 - 90 Minuten bei 37°C inkubiert mit:

1. Antiserum gegen IFN-α; endgültige Verdünnung 1:100; (erhalten von Research Resources Branch, National Institutes of Allergy and Infections Diseases, Bethesda Md, USA).

2. Antiserum gegen Human β-IFN; endgültige Verdünnung 1:300; (erhalten von Dr. Y. H. Tan, University of Calgary, Canada).

3. Mischung aus 1. und 2.

Nach der Inkubation wurde die Rest-Interferonaktivität im Plaquereduktionstest (siehe Journal of Interferon Research 2, im Druck (1982)) bestimmt.

Beispiel B

Herstellung von Poly(A)$^+$RNA, welche menschliche IFN-α und IFN-β-mRNA enthält, aus Sendaivirus induzierten Namalwazellen

Züchtung der Namalwazellen und Induktion mit Sendaivirus erfolgte nach literaturbekannten Methoden (siehe Methods in Enzymology, Vol 78A, pp. 69-75 (1981), Academic Press, New York). Der Zeitpunkt der mRNA Präparation wurde mit 9 Stunden (6-12 Stunden) nach der Induktion mit Sendaivirus gewählt, da nach diesem Intervall der Anteil an interferonspezifischer mRNA ein Maximum erreicht.

Die Zellen wurden 20 Minuten bei 1000 g abzentrifugiert, einmal in NP-40-Puffer (0,14 M NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) gewaschen und in NP 40-Puffer mit 0,5 % des nicht ionischen Detergens NP-40 (Shell) und 2 mg/ml Bentonit resuspendiert. Nach 5 Minuten im Eisbad wurden die Zellkerne durch Zentrifugation wie oben pelletiert, die (RNA-hältige) cytoplasmatische Fraktion (Überstand) wurde nach Zugabe von 2 % SDS, 5 mM EDTA und 50 mM Tris-HCl, pH 9, 3 x mit Phenol-Chloroform und 1 x mit Chloroform extrahiert und die RNA anschließend alkoholgefällt. Poly(A)$^+$RNA wurde nach literaturbekannter Methode (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 69, 1408-1412 (1972)) durch Oligo-(dT)-Zellulose-Chromatographie gereinigt und durch Zentrifugation in einem 5-20 % Saccharosegradienten in 10 mM Natriumacetatpuffer, pH 5,5, 1 mM EDTA (20 Stunden bei 25000 U/min mit einem Spinco SW 27-Rotor) der Molekülgröße nach aufgetrennt und Moleküle der Größenordnung zwischen 6 S (Sedimentationseinheiten) und 18S (der Einfachheit halber "12S-RNA" genannt) gesammelt (siehe linke Seite der Figur 1).

Der Gehalt an Interferon-spezifischer mRNA (IFN-α und IFN-β-mRNA) wurde durch Mikroinjektion von "12S-RNA" in Xenopus laevis-Oocyten (siehe J. Embryol. and Exper. Morph. 20, 401-414 (1968)) und Messen der Interferonaktivität im Oocytenüberstand bestimmt. Dabei ergab 1 µg injizierter "12S-RNA" einen mittleren Interferontiter von etwa 1000 Internationalen Interferoneinheiten (I.E.) bezogen auf den Interferonstandard 69/19:

Menge "12S"-Poly(A)$^+$RNA aus Sendaivirus-induzierten Namalwazellen	Einheiten Interferon pro ml Oocytenüberstand	Prozent Interferonaktivität neutralisiert durch Antiseren gegen:	
		IFN-α	IFN-α + IFN-β
1 µg	1 000	80	>98

Etwa 80 % dieser Aktivität war also durch Antiserum gegen α-Typ Interferon neutralisierbar, während die gesamte Aktivität nur durch ein Gemisch aus Anti-α und Anti-β-Interferon-Antiserum neutralisierbar war.

Beispiel C

Herstellung einer Namalwa-cDNA-Klonbank

Die Poly(A)$^+$RNA, welche eine Molekülgröße zwischen 6-18S besitzt ("12S-RNA") (siehe Beispiel B) wurde als Matrize zur Herstellung von einzelsträngiger cDNA verwendet, wobei 40 µg/ml Poly(A)$^+$RNA in 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 1 mM dNTPs, 0,4 mM DTT, 4 mM Na-Pyrophosphat, 20 µg/ml Oligo(dT)$_{12-18}$ (PL-Biochemicals), 25 µg/ml Actinomycin D mit 100 Einheiten/ml AMV Reverse Transkriptase (Dr. J. Beard, Life Sciences, Inc. 1509$\frac{1}{2}$ 49th street, South, St. Petersburg, Florida 33707, USA) 45 Minuten bei 44-45°C inkubiert wurden. Anschließend wurde der

RNA-Anteil des RNA-DNA-Hybrides durch einstündige Inkubation in 0,3 M NaOH bei 50°C entfernt, danach die einzelsträngige cDNA neutralisiert und äthanolgefällt.

Der zum Einzel-DNA-Strang komplementäre zweite DNA-Strang wurde unter folgenden Bedingungen synthetisiert: 30 µg/ml einzelsträngige cDNA wurden in 0,12 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,9, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM dNTPs mit 300 Einheiten/ml DNA Polymerase I (Boehringer Mannheim) 6 Stunden bei 15°C inkubiert, dann phenolextrahiert und äthanolgefällt.

Die so hergestellte doppelsträngige cDNA-Mischung wurde an den beiden Strangenden derart modifiziert, daß überhängende Einzelstrangregionen entfernt wurden. Dazu wurde die DNA in 0,3 M NaCl, 30 mM Natriumacetat, pH 4,5, 1 mM $ZnCl_2$ mit 1250 Einheiten/ml S1-Nuklease (Miles Laboratories) 30 Minuten bei 37°C inkubiert, hierauf wurde phenolextrahiert und äthanolgefällt. Die so hergestellte "blunt ended" doppelsträngige cDNA wurde auf einem 5-20 % Saccharosegradienten in 10 mM Natriumacetatpuffer, pH 5,5, 1 mM EDTA, aufgetrennt und jene Fraktionen isoliert, welche eine Länge von mindestens 600 Basenpaaren aufwiesen.

Von dieser cDNA-Mischung wurden 0,5 µg durch Oligodeoxycytidin-Anlagerung am 3'Ende beider Stränge, durch Inkubation in 140 mM Kaliumcacodylat, pH 6,9, 30 mM Tris-HCl, pH 6,9, 2 mM $CoCl_2$, 0,1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, 5 µM dCTP mit 500 Einheiten/ml Terminaler Transferase, 4 Minuten bei 37°C, um etwa 15 Nukleotide verlängert. Mit diesem Schritt ist die cDNA-Mischung, als ein Bestandteil der rekombinanten Moleküle, fertiggestellt (siehe linke Seite Fig. 1).

Als zweite Komponente wurde das Escherichia coli-Plasmid pBR322, ein zirkuläres doppelsträngiges DNA Molekül, herangezogen. Ein Aliquot von 2 µg pBR322 wurde durch die Restriktionsendonuklease Pst I linearisiert und in ähnlicher Weise wie die cDNA-Mischung durch Anlagerung von Oligodeoxyguanidin an die 3' Enden des Moleküls derart modifiziert, daß überhän-

gende Oligodeoxyguanidinenden erzeugt wurden (rechte Seite der Figur 1). Diese Oligodeoxyguanidinenden können mittels Basenpaarung mit den freien Oligodeoxycytidinenden der cDNA Moleküle stabile DNA Doppelstrang-Regionen erzeugen. Dazu werden die beiden Komponenten dieser Reaktion in 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8, 10 Minuten bei 65°C, dann 2,5 Stunden bei 45°C, dann über Nacht bei 37°C inkubiert.

Durch diese Methode wird die Pst I Restriktionsendonuklease-Spaltstelle regeneriert und kann in der Folge benützt werden, um die cDNA-Inserte aus dem Vektorhybrid herauszuschneiden.

Die nach dieser Methode hergestellten Hybridplasmide aus pBR322 und Namalwa-cDNA wurden zur Transformation von Escherichia coli HB 101 nach literaturbekannter Methode (Proc. Natl. Acad. Sci, USA 69, 2110-2114 (1972)) verwendet. Mit dieser Methode wurden 30 000 Klone transformierter E.coli Zellen erhalten und einzeln in Mikrotiterplatten aufgeteilt.

Beispiel D

Herstellung einer bezüglich IFN-α und IFN-β-DNA Sequenzen spezifischen Hybridisierungsprobe unter Benutzung eines synthetischen Tridekanukleotids 5'dCCTTCTGGAACTG3'

Die dieser Erfindung zugrunde liegende Selektionsmethode für transformierte E.coli Klone, welche Interferonsequenzen enthalten, basiert auf der Verwendung eines synthetischen Tridekanukleotids mit der Sequenz: 5'dCCTTCTGGAACTG3'. Diese Sequenz stellt das längste, nicht unterbrochene DNA Segment dar, in welchem Homologie zwischen den meisten IFN-α Genen und dem IFN-β Gen vorliegt. Die Synthese des Tridekanukleotids wurde bereits beschrieben. Das Tridekanukleotid wurde in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 0,1 mM Spermidin, 1 µM ^{32}P-γ-ATP mit 60 Einheiten/ml T4-Polynukleotidkinase (Bethesda

Reserach Laboratories) 30 Minuten bei 37°C zu einer spezifischen Aktivität von etwa 500 Ci/mMol am 5' Ende des Moleküls markiert.

Dieses endmarkierte Tridekanukleotid wurde als Primer für (einzelsträngige) cDNA-Synthese verwendet, wobei als Matrize Poly-$(A)^+$RNA aus Sendaivirus-induzierten Namalwazellen (siehe Beispiel B) diente. Die Reaktion wurde bei einem 5-10 fachen molaren Überschuß von Primer gegenüber RNA in 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 60 mM KCl, 5 mM DTT, 50 µg/ml Actinomycin D, 4 mM $MgCl_2$, 4 mM Natriumpyrophosphat, 0,5 mM dNTPs mit 100 Einheiten/ml AMV Reverse Transkriptase 90 Minuten bei 37°C durchgeführt. Nach Entfernung des RNA-Anteiles des RNA-DNA-Hybrides durch einstündige Inkubation in 0,3 M NaOH bei 50°C und anschließende Neutralisation mit 0,3 M Essigsäure ist die cDNA als Hybridisierungsprobe verwendbar. Eine schematische Darstellung dieses Verfahrens ist in Figur 2 wiedergegeben. Eine so hergestellte cDNA trägt demnach die radioaktive Markierung nur in Molekülen, die vom interferonspezifischen Tridekanukleotid als Primer ausgehend synthetisiert worden sind und zeigt somit eine hohe Spezifität für das Erkennen von Interferon-DNA-Sequenzen in Hybridisierungen.

Beispiel E

Koloniehybridisierung mit Tridekanukleotid-geprimter cDNA

Die hier dargestellte Methode dient der Erkennung jener transformierten Bakterienklone, welche Hybridplasmide mit zum Tridekanukleotid komplementären DNA Sequenzen enthalten. Dazu wurden Zellen von einzelnen geklonten Transformanten auf 22 x 15 cm Nitrozellulosefilter (Porengröße 0,45 µm, Millipore oder Schleicher & Schuell) transferiert, zu einer Koloniegröße von 2 mm Durchmesser auf den Filtern gezüchtet und nach literaturbekannter Methode für die Koloniehybridisierung vorbereitet (Proc. Natl. Acad. Sci USA 72, 3961-3965 (1975) und Analytical

Biochemistry 98, 60-63 (1979)). Die Nukleinsäurehybridisierung mit endmarkierter cDNA (siehe Beispiel D) wurde in 50 % Formamid, 4 x SET (1 x SET = 0,15 M NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8), 1 x Denhardt's Lösung (0,02 % BSA, 0,02 % Ficoll, 0,02 % Polyvinylpyrrolidon), 0,5 mg/ml denaturierter und gescherter Lachssperma DNA, 0,1 % Natriumpyrophosphat und 0,1 % SDS für 48 Stunden bei 37°C durchgeführt. Die Filter wurden hierauf in einer Lösung bestehend aus 50 % Formamid und 0,2 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M Natriumcitrat) bei 20-25°C mehrere Stunden (6-8 Stunden) gewaschen und dann mit einer Lösung aus 1 x SSC gespült. Die Filter wurden bei 20-25°C getrocknet und bei -70°C mit einem Röntgenfilm (Kodak XR) exponiert. Die Figur 3 zeigt ein typisches Ergebnis eines derartigen Versuches: Auf der abgebildeten Fläche wurden 1536 Bakterienkolonien gezüchtet und durch Koloniehybridisierung gescreent. Der Pfeil zeigt auf ein Beispiel eines transformierten Bakterienklons, dessen Hybridplasmid-DNA mit der radioaktiven Probe ein Signal ergibt. Insgesamt wurden durch Screenen von etwa 13000 transformierten Bakterienkolonien 190 Klone isoliert, welche mit der durch das Tridekanukleotid initiierten cDNA aus Sendaivirus-induzierten Namalwazellen ein positives Signal ergaben; sie wurden auf 2 Mikrotiter-platten (P1 und P2) gesammelt. Demnach enthielten etwa 1 % aller Klone der Klonbank die spezifische Sequenz dCCTTCTGGAACTG.

Beispiel F

Analyse der Sequenzkomplexität der mit Tridekanukleotid-geprimter cDNA hybridisierenden Klone

Um die Anzahl der Klone mit verschiedener Sequenz (Sequenzkomplexität) in den 190 Tridekanukleotid-positiven Klonen (siehe Beispiel E) festzustellen, wurden von verschiedenen Klonen die cDNA-Inserte durch Pst I-Verdauung (siehe Beispiel C), Elektrophorese in 0,8 % Agarosegelen und Elution der gewünschten Bande (durch Ausscheiden des die Bande beinhaltenden Gelstückchens

und elektrophoretische Elution der DNA aus der Agarose in einen Dialysenschlauch) isoliert und nach literaturbekannter Methode durch Nick-Translation mit ^{32}P markiert (J. Mol. Biol. 113, 237-251 (1977)). Abdrücke der Tridekanukleotid-positiven Klone (Mikrotiterplatten P1 und P2) und einer willkürlich ausgewählten Mikrotiterplatte (E52) wurden auf Nitrozellulosefilter transferiert, aufgezüchtet, für Koloniehybridisierung vorbereitet (siehe Beispiel E) und mit den verschiedenen ^{32}P-markierten ~~cDNA~~-Inserten hybridisiert. Die Hybridisierungen wurden durchgeführt wie in Beispiel E beschrieben, nur daß in die Hybridisierungslösung auch 50 µg/ml poly(U) und 10 µg/ml Poly(I): poly (C) zugegeben wurden und die Filter nach der Hybridisierung in 50 % Formamid und 1 x SSC gewaschen wurden. Die Figur 4 zeigt das Ergebnis eines solchen Experiments mit den Inserten der Klone P1H1 und P2H10 als Probe. (P1H1 ist der Klon mit der Position H1 auf der Mikrotiterplatte P1, P2H10 hat die Position H10 auf der Mikrotiterplatte P2.) Es zeigte sich, daß Klon P1H1 mit mehr als 90 % aller Tridekanukleotid-positiven Klone der Platten P1 und P2, wie auch mit einigen Klonen der Platte E52 hybridisiert (Figur 4, Teil A). Die Identität vieler dieser klonierten Sequenzen wurde später durch Restriktionsanalyse bestätigt. Klon P2H10 hybridisierte außer mit sich selbst auch mit den Klonen der Positionen 1C12, 1F12, E52E1 (Figur 4, Teil B). Klone P1A6 und P2B10 wurden auch auf diese Weise analysiert und hybridisierten jeweils nur mit sich selbst (dieses Ergebnis wird in Figur 4 nicht gezeigt). Aus diesen Resultaten konnte abgeleitet werden, daß in der Sammlung der 190 Tridekanukleotid-positiven Klone vermutlich weniger als 10 qualitativ verschiedene Sequenzen vorhanden sind, wobei P1H1, P2H10, P1A6 und P2B10 vier solcher verschiedener Sequenzen darstellen.

Beispiel G

RNA-Transfer-Hybridisierungen

Um herauszufinden, ob ein bestimmter Tridekanukleotid-positiver Bakterienklon Interferonsequenzen enthalten könnte, wurde getestet, ob seine Plasmid-DNA mit einer in Namalwazellen durch Sendaivirus induzierten mRNA hybridisiert. Dazu wurde Poly(A)$^+$-RNA von induzierten und nicht induzierten Namalwazellen analog der in Beispiel B angegebenen Weise isoliert, durch Inkubation eine Stunde bei 50°C in 1 M Glyoxal, 50 % DMSO, 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7 denaturiert, auf einem 1,4 % Agarosegel aufgetrennt, nach literaturbekannter Methode (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 5201-5205 (1980)) auf Nitrozellulosefilter transferiert und mit durch Nick-Translation ^{32}P-markierter (siehe Beispiel F) Plasmid-DNA hybridisiert. Plasmid-DNA, die von einem induzierten Gen abstammt, wird in dieser Versuchsanordnung nur mit RNA aus induzierten Zellen hybridisieren, nicht aber mit RNA aus uninduzierten Zellen. Figur 5 zeigt die Autoradiographie eines solchen Experiments: induzierte RNA ("i") ist jeweils in der linken Spalte eines Paares, nicht-induzierte RNA ("n") in der rechten Spalte. Die zur Hybridisierung verwendeten Plasmid-DNAs sind P1H1 (A), P1F12 (B,D), P2H10 (C), P1A6 (E), P2B10 (F). Von den getesteten Plasmiden hybridisierten P1F12, P2H10 und P1A6 nur mit RNA aus induzierten Zellen, während P1H1 und P2B10 auch mit RNA aus nicht induzierten Zellen ein Signal ergaben. Die Molekülgröße der mit P1F12 und P2H10 hybridisierenden RNA liegt bei 11-12S, die Größe der mit P1A6 hybridisierenden RNA bei 12-14S. Diese Molekülgrößen sind für IFN-ß bzw. IFN-α-mRNA literaturbekannt. Die Plasmide P1F12, P2H10 und P1A6 wurden daher weiter untersucht, um ihren Gehalt an Interferon-DNA-Sequenzen eindeutig festzustellen.

Beispiel H

Biologischer Nachweis von Interferonaktivität in den Translationsprodukten hybrid-isolierter RNA

Ein auf biologischer Testung basierender Nachweis, ob ein bestimmtes Hybridplasmid Interferon-DNA-Sequenzen enthält oder nicht, wurde für die Plasmide P1F12, P2H10, P1H1 und P2B10 durchgeführt. Das Prinzip dieses Nachweises ist folgendermaßen: die zu testende Plasmid-DNA wird auf einem Nitrozellulosefilter fixiert und hierauf unter Hybridisierungsbedingungen mit Poly(A)$^+$RNA aus induzierten Namalwazellen (siehe Beispiel B) inkubiert. Enthält die gebundene DNA Interferonsequenzen, so wird Interferon-mRNA damit hybridisieren. Die nicht hybridisierte RNA wird in der Folge weggewaschen, die hybridisierte RNA von der DNA herabgeschmolzen und in Xenopus laevis-Oocyten injiziert. Oocyten können injizierte mRNA in Proteine übersetzen (siehe Beispiel B). Handelt es sich bei der hybridisierten mRNA um Interferon-mRNA, so wird in den Oocyten Interferon-Protein entstehen, dessen antivirale Eigenschaften im Plaquereduktionstest (siehe Beispiel A) nachgewiesen werden können. Im Detail wurde dieser Versuch so durchgeführt: 10 µg linearisierte Plasmid-DNA wurden in 200 µl 0,5 N NaOH denaturiert, mit 200 µl 0,5 N Essigsäure + 20 x SET (Zusammensetzung von SET siehe Beispiel E) neutralisiert und durch Filtration auf Ø 2,5 cm Nitrozellulosefilter gebunden. Die Filter wurden bei Zimmertemperatur getrocknet, 2 Stunden bei 80°C gebacken und dann eine Stunde bei 53°C oder auch bei 37°C in 50 % Formamid, 20 mM PIPES, pH 6,5, 0,4 M NaCl, 5 mM EDTA, 10 % Dextransulfat, 1 % SDS, 20 µg/ml E.coli tRNA, 50 µg/ml Poly(A) prähybridisiert und im selben Puffer nach Zugabe von 14-40 µg induzierter Namalwa Poly(A)$^+$RNA 5 Stunden lang hybridisiert. Hierauf wurden die Filter 3 x 20 Minuten bei 25°C in 0,2 - 1 x SET, 0,2 % SDS, 1 % Dextransulfat, 5 µg/ml tRNA, dann 2 x 10 Minuten bei 25°C in 2 mM EDTA, pH 8,0, 0,2 % SDS, 1 % Dextransulfat, 5 µg/ml tRNA, dann 1 x 5 Minuten bei 60°C in 2 mM EDTA, pH 8,0, 0,2 % SDS, 5 µg/ml tRNA gewaschen. Die hybridisierte RNA wurde 4 Minuten

bei 100°C in 1 ml H_2O + 10 µg tRNA eluiert. Nach Chromatographie auf einer Oligo(dT)-Zellulose Säule (siehe Beispiel B) wurde die RNA äthanolgefällt, in 5 µl H_2O aufgenommen und in Xenopus laevis-Oocyten injiziert. Die Oocytenüberstände wurden nach zweitägiger Inkubation bei Zimmertemperatur abgenommen und in Plaquereduktionstest auf Interferonaktivität getestet.

Das Ergebnis brachte eine Bestätigung der von den RNA-Transfer-Hybridisierungen (Beispiel G) nahegelegten Vermutung, nämlich daß Klone P1F12 und P2H10, nicht aber die Klone P1H1 und P2B10 Interferon-DNA-Inserte trugen. Durch Neutralisation der erhaltenen Interferonaktivität mit spezifischen Antiseren gegen IFN-α oder IFN-ß (siehe Beispiel A) konnte gezeigt werden, daß es sich bei den Inserten der Klone P1F12 und P2H10 um IFN-ß-DNA-Sequenzen handelte.

Klon	Interferonaktivität (Einheiten/ml Oocytenüberstand)	Prozent Neutralisation durch Antiserum gegen	
		IFN-α	IFN-ß
P1F12	~ 50	-	98
P2H10	~ 50	-	98
P1H1	< 2	-	-
P2B10	< 2	-	-

Beispiel I

Restriktions- und Sequenzanalyse der Klone von IFN-ß-Typ

Die cDNA-Inserte der Klone P1F12 und P2H10 wurden mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen untersucht, wobei das Vorhandensein und, im gegebenen Fall, die Positionen der Spaltstellen der Enzyme Bam HI, Bgl II, Eco RI, Hin dIII, Pst I und Pvu II ermittelt wurden. Ein Vergleich der Restriktionskarten von

P1F12 und P2H10 mit dem literaturbekannten Gen für IFN-ß (Gene 10, 11-15 (1980)) ist in der Figur 6 wiedergegeben: Alle drei Klone werden von Pvu II, Pst I und Bgl II geschnitten, wobei die Entfernungen zwischen den einzelnen Spaltstellen für jeden Klon dieselben sind. Zum letzten Beweis für die Identität der Inserts der Klone P1F12 und P2H10 mit dem IFN-ß-Gen wurden nach der Methode von Maxam und Gilbert (Proc. Nat. Acad. Sci USA 74, 560-564 (1977)) Teile ihrer DNA-Sequenzen ("rechts" (3') der Pvu II- und Bgl II-Schnittstellen) ermittelt und mit der publizierten IFN-ß-Sequenz verglichen. Die Sequenzen von P1F12 und P2H10 zeigen vollständige Übereinstimmung mit dem IFN-ß-Gen; sie sind in Figur 7 dargestellt.

Beide Klone haben am 5'Ende nicht die vollständige IFN-ß-Sequenz, es fehlen ihnen etwa 60 Nukleotide der für reifes Protein codierenden Region. Am 3'-Ende ist P1F12 vollständig, auch P2H10 enthält die gesamte 3'-Region von IFN-ß-cDNA inklusive der von Poly(A)RNA herstammenden Poly(dA)-Sequenzen. P2H10 erstreckt sich jedoch noch beträchtlich (1400 Basenpaare) weiter: 3' vom Poly(dA) liegt ein Bereich mit der Sequenz Oligo(dC), gefolgt von einer Sequenz unbekannten Ursprungs; DNA-Sequenzanalyse verschiedener Abschnitte dieser zusätzlichen Region von P2H10 ergab keine Homologie mit dem IFN-ß-Gen. Es zeigte sich weiters, daß die mit Klon P2H10 kreuzhybridisierenden Klone P1C12 und E52E1 (beschrieben in Beispiel F) mit eben dieser zusätzlichen Region von P2H10 hybridisieren und nicht mit dem IFN-ß-Anteil.

Beispiel J

Analyse des IFN-α-Typ Klons P1A6

Der Klon P1A6 hybridisiert mit virus-induzierter Namalwa-RNA in der Region von 12-14S (beschrieben in Beispiel G). Er enthält ein cDNA-Insert von etwa 900 Basenpaaren, das, wie Restriktionsanalyse ergab, keine Spaltstellen für die Enzyme Bam HI, Bgl II, Eco RI, Hin dIII, Pst I und Pvu II aufweist (siehe Figur 6).

Der Beweis dafür, daß Klon P1A6 IFN-α-Sequenzen beinhaltet, wurde wieder durch DNA-Sequenzanalyse erbracht: die Sequenz des cDNA-Inserts von P1A6 wurde von den das Insert begrenzenden Pst I-Spaltstellen nach innen ermittelt (siehe Figur 8) und mit den von Goeddel et al. (Nature 290, 20-26 (1981)) beschriebenen IFN-α-Sequenzen verglichen. Es zeigte sich, daß Klon P1A6 eine um 49 Basenpaare kürzere Variante von LeIFN C darstellt. Das Vorhandensein von Poly(A)-Sequenzen am 3'-Ende von P1A6 weist darauf hin, daß Klon P1A6 von einer kürzeren mRNA abstammt als der publizierte Klon LeIFN C. Die für LeIFN C-Protein codierende Region ist jedoch vollständig vorhanden.

Beispiel K

Identifikation und Analyse eines weiteren IFN-α-Typ Klons (1F7)

Klon P1A6 war der einzige IFN-α-Typ-Klon, der aus der Kollektion der 190 Tridekanukleotid-positiven Klone (siehe Beispiel E) identifiziert werden konnte. Um weitere IFN-α-Typ-Klone zu ermitteln, wurden 1800 Klone der ursprünglichen cDNA-Klonbank (Beispiel C) durch Koloniehybridisierung (wie in Beispiel F beschrieben) mit dem cDNA-Insert des Klons P1A6 hybridisiert. Ein weiterer IFN-α-Klon (Klon 1F7) wurde auf diese Weise gefunden. Restriktionsanalyse und teilweise DNA-Sequenzierung des cDNA Inserts von 1F7 ergaben, daß es sich bei 1F7 um eine um 175 Basenpaare längere Variante des Klontyps LeIFN A (Goeddel et al., siehe oben) handelt. 1F7 enthält wie LeIFN A je 2 Spaltstellen für die Enzyme Bgl II und Pvu II (Figur 6); die ermittelten DNA-Sequenzen am 5'- und am 3'-Ende des Inserts sind in Figur 8 angegeben.

Desweiteren wurden Teile der DNA-Sequenz des IFN-α-Typ Klons (1F7) nach der Dideoxy-Methode (siehe Messing et al. in Nuc. Acid. Res. 9, 309 (1981) und Gardner, R.C. et al. in Nuc. Acid. Res. 9, 2871 (1981)) mit einem Universal-Primer analysiert. Für die Positionen 120 bis 327 wurde folgende Teilsequenz gefunden:

.....CCTGGCACAGATGAGGAGAATCTCTCTTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACG
TGACTTTGGATTTCCCCAGGAGGAGTTTGGCAACCAGTTCCAAAAGGCTGAAACCA
TCCCTGTCCTCCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGAC
TCATCTGCTGCTTGGGATGAGACCCTCCTAGACAAATTCTA.....

Im Vergleich zu der literaturbekannten Sequenz des IFN-αA Typs (siehe D.V. Goeddel et al. in Nature 290, 20 (1981)) weist die neue DNA-Sequenz des IFN-α-Typ Klons (1F7) im Bereich der Nukleotide Nr. 120-327 folgende Unterschiede auf:
In Position 137 und 170 wurde jeweils das Nukleotid A durch G ersetzt.

Beispiel L

Interferonaktivität in Lysaten von E.coli HB101, transformiert mit dem hybriden Plasmid 1F7

Lysate von mit P1A6 oder 1F7 transformierten Bakterienkulturen wurden auf ihren Gehalt an biologisch aktivem Interferon untersucht. Dazu wurden 100 ml Bakterienkultur in L-Broth-Medium zu einer optischen Dichte von 0,6-0,8 gezüchtet, durch Zentrifugation 10 Minuten bei 7000 U/min pelletiert, 1 x in 50 mM Tris-HCl, pH 8, 30 mM NaCl gewaschen und schließlich in 1,5 ml desselben Puffers suspendiert. Nach Inkubation mit 1 mg/ml Lysozym 30 Minuten auf Eis wurden die Bakterien 5 x gefroren und getaut und hierauf die Zellbruchstücke durch Zentrifugation eine Stunde bei 40000 U/min entfernt. Der Überstand wurde steril filtriert und im Plaquereduktionstest auf Interferonaktivität getestet. In auf diese Weise gewonnenen Lysaten von Klon 1F7 konnten etwa 500 Einheiten pro ml Interferon nachgewiesen werden; Klon 1A6 ergab in diesem Test keine Aktivität, was vermutlich auf eine andere Orientierung des Inserts im Plasmidvektor zurückgeführt werden kann.

Beispiel M

Verbesserung der Expression des von 1F7 codierten Interferontyps

Um gute Expression eines Genes zu erreichen, müssen auf DNA-Ebene drei Voraussetzungen erfüllt werden: erstens muß vor dem Gen ein Promotor (eine RNA-Polymerase-Bindungsstelle) liegen, zweitens muß die abgelesene RNA vor dem Initiationscodon der Translation eine Ribosomenbindungssequenz (RBS) tragen und drittens muß der Abstand zwischen RBS und Initiationscodon eine geeignete Länge haben.

Zur Expression des von 1F7 codierten Interferons wurde als Promotorsequenz der literaturbekannte Promotor des Tryptophanoperons von Serratia marcescens (Nature 276, 684-689 (1978)) genommen und als RBS eine literaturbekannte DNA-Sequenz (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5543-5548 (1981)). Zur Ermittlung des optimalen Abstandes zwischen der RBS und dem Initiationscodon von 1F7 wurde folgende Strategie gewählt: die 1F7-cDNA-Sequenz wurde mit der für doppelsträngige DNA spezifischen Exonuklease BAL 31 kurz verdaut, wodurch ein Gemisch von Molekülen verschiedener Länge erhalten wurde. Diese Moleküle wurden hierauf mit Hilfe von synthetischen Linkersequenzen in geeigneter Weise in ein "Expressionsplasmid" ligiert, das heißt, in ein Plasmid, das Promotor und RBS enthielt. E.coli HB101 wurde mit diesen Plasmiden transformiert und einzelne Transformanten wurden auf Interferonsproduktion getestet.

Im Detail wurde der Versuch folgendermaßen durchgeführt: 0,5 - 1 µg 1F7-Insert wurden in 100 µl 20 mM Tris-HCl, pH 8,1, 0,6 M NaCl, 12 mM $MgCl_2$, 12 mM $CaCl_2$, 1 mM EDTA 3 min bei 30°C mit 0,5 Einheiten BAL-31 (Bethesda Reserach Laboratories) inkubiert. Hierauf wurde die Reaktion durch Zugabe von 300 µl 15 mM EDTA, pH 7,8, beendet, es wurde 10 min auf 65°C erwärmt, mit Phenol und Äther extrahiert und äthanolgefällt. Der Niederschlag wurde in 10 µl 70 mM Tris-HCl, pH 7,5, 7 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0,4 mM ATP, zusammen mit 30 - 60 pMol phosphorylierten Hin dIII-Linkern

(Bethesda Research Laboratories) aufgenommen und mit 0,5 - 1 Einheiten T4-Ligase (Bethesda Research Laboratories) über Nacht bei 14°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen 10 min auf 65°C beendet, 2 M NH_4-Acetat zugegeben und die Interferongene von nicht ligierten Linkern durch Fällung mit 0,6 Volumen Isopropanol gereinigt. Die Fällung wurde in 30 - 50 µl 33 mM Tris-Acetat, pH 7,9, 66 mM K-Acetat, 10 mM Mg-Acetat, 100 µg/ml BSA gelöst und mit 30 - 50 Einheiten Hin dIII 2 - 3 Stunden lang verdaut. Die Reaktion wurde durch Erhitzen 10 min auf 65°C beendet und nach Zugabe von 2 M NH_4-Acetat wurden die Interferongene mit 0,6 Volumen Isopropanol gefällt. Der Niederschlag wurde in 10 µl 70 mM Tris-HCl, pH 7,5, 7 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0,5 mM ATP aufgelöst und mit Hilfe von 10^{-2} Einheiten T4-Ligase mit 0,2 µg Hin dIII-linearisiertem, phosphatasebehandeltem Expressionsplasmid pER103 über Nacht bei 14°C ligiert. pER103 ist ein pBR322-Derivat, das die Promotorsequenz des Tryptophanoperons von S.marcescens und eine literaturbekannte RBS enthält (siehe oben); es kann mit Hin dIII in der Nähe der RBS linearisiert werden. Die so erhaltenen Plasmide wurden zur Transformation von E.coli HB 101 verwendet und die Interferonproduktion einzelner Transformanten wurde auf die in Beispiel L beschriebene Weise getestet. Es ergabe sich eine Steigerung der Interferonexpression bis zum etwa 10^4-fachen Wert der Spontanexpression.

Die vorstehend erwähnten Eigenschaften belegen, daß die erfindungsgemäß hergestellten rekombinanten DNA-Moleküle Sequenzen enthalten, die für α- oder ß-Interferon codieren, wobei anhand eines dieser erfindungsgemäß erhaltenen Plasmide die Expression von Interferon des Typs α gezeigt wird.

Beispielsweise wurden folgende Mikroorganismen und rekombinante-DNA-Moleküle bei der Hinterlegungsstelle "Deutsche Sammlung von Mikro-Organismen, Grisebachstraße 8, 3400 Göttingen," am 17. Mai 1982 unter den DSM-Nummern

2362 (1F7), 2363 (P1A6),
2364 (P1F12) und
2365 (P2H10)

hinterlegt und sind der Öffentlichkeit gemäß Budapester Vertrag zugänglich.

Verwendete Begriffe und Abkürzungen

(d)A:	(Deoxy) Adenosin
Antiserum:	ein Serum, das Antikörper beinhaltet
ATP:	Adenosintriphosphat
Autoradiographie:	fotographische Methode zum Nachweis von Radioaktivität
Basenpaar:	2 komplementäre Nukleotide, z.B. A-T, G-C
blunt ends:	vollständig basengepaarte Enden eines DNA-Doppelstrangmoleküls, zum Unterschied von überhängenden Einzelstrang-Enden
BSA:	Bovinserumalbumin
(d)C:	(Deoxy) Cytidin
cDNA:	eine zu RNA komplementäre DNA
cDNA-Pool:	Gemisch aus cDNAs verschiedener Sequenz
codieren:	die Information für etwas tragen; DNA trägt in der Nukleotidsequenz die Information für die Aminosäuresequenz eines Proteins
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Deoxyribonukleinsäure
DNA-Sequenz:	eine lineare Anordnung von Nukleotiden, welche durch Phosphodiesterbindungen verknüpft sind.
DTT:	Dithiothreitol
EDTA:	Äthylendinitrilotetraessigsäure
Elektrophorese:	Trennung von (DNA oder RNA-) Molekülen nach Molekülgröße im elektrischen Feld
Expression:	Umsetzung der Information eines Gens in mRNA durch Transkription und in weiterer Folge in Polypeptid (Protein) durch Translation

Filterhybridisierung:	Hybridisierung von Nukleinsäuren, wobei ein Partner filtergebunden ist
(d)G:	(Deoxy) Guanosin
Gen:	Abschnitt auf der DNA, der die Information für ein bestimmtes Transkript (RNA-Molekül) trägt, das in weiterer Folge in ein Protein übersetzt werden kann.
Genfamilien:	Familien von Genen, die für nahe verwandte Produkte (Subtypen) codieren
Genprodukt:	RNA (Transkript), Protein (Translationsprodukt)
Gradient:	siehe Saccharosegradient
Homologie (von DNA Sequenzen):	Verwandtschaft zwischen DNA-Sequenzen, die sich in einer ähnlichen Nukleotidabfolge zeigt
Hybrid:	stabiler Komplex von zwei zueinander zumindest zum Teil komplementären DNA-Strängen
Hybridisierung (von Nukleinsäuren):	Ausbildung von stabilen Komplexen zwischen zueinander komplementären einzelnen DNA- oder RNA-Strängen
Hybridisierungsprobe:	radioaktiv markierte Nukleinsäure, die zur Auffindung von dazu komplementären Sequenzen dient
Hybridplasmid:	Plasmid, das einen DNA-Abschnitt aus einem fremden Organismus enthält
I:	Inosin
IFN-α:	Leukocyteninterferon
IFN-β:	Fibroblasteninterferon
IFN-γ:	Immuninterferon
in vitro:	im Reaktionsglas
Induktion (von Interferonproduktion):	Stimulation von Zellen zur Synthese von Interferon durch Behandlung mit Induktoren (Viren, doppelsträngige RNA, Mitogene)

Initiationscodon:	Sequenz AUG der mRNA, die den Beginn der Translation signalisiert
Initiationskomplex:	Verbindung von Reverser Transkriptase mit mRNA und Primer, die den Beginn der cDNA-Synthese ermöglicht
Insert, cDNA-Insert:	das Stück fremder DNA (z.B. eine cDNA), das sich in einem Hybridplasmid befindet
Klon:	Bakterienkolonie, von einem einzelnen Bakterium abstammend
Klonbank, cDNA-Klonbank:	eine Sammlung von Bakterienklonen, die alle ein Hybridplasmid mit einem cDNA-Insert beinhalten
Klonieren:	das Herstellen von Klonen; zumeist verstanden als das Herstellen von Klonen, die ein Hybridplasmid beinhalten
Koloniehybridisierung:	Hybridisierung mit filtergebundenen denaturierten Bakterienkolonien
komplementär:	zueinander passend (Nukleotide in der DNA: A ist komplementär zu T, G ist komplementär zu C)
Kreuzhybridisierung:	Hybridisierung zwischen nicht identischen, aber homologen DNA-Sequenzen
ligieren:	kovalentes Verknüpfen von DNA-Sequenzen mit Hilfe des Enzyms Ligase
Mikrotiterplatte:	Platte mit 96 Vertiefungen, die durch die Koordinanten 1-12 und A-Z charakterisiert sind
Mitogen:	Substanz, die Zellen zur Mitose (Zellteilung) stimuliert
molekulares Klonieren:	siehe Klonieren
mRNA:	Messenger RNA, ist eine für Proteine codierende RNA
Neutralisation:	Inaktivierung eines Antigens durch Antikörper

dNTPs:	Mischung der 4 Nukleotide dATP, dTTP, dCTG, dGTP
Nukleotide:	Bausteine einer DNA oder RNA; (d)A, (d)C, (d)G, (d)T
Oligonukleotide	wenige miteinander durch Phosphodiesterbindungen verknüpfte Nukleotide
Oligo(C):	Oligomeres von C-Resten, durch Phosphodiesterbindungen verknüpft
Oligo(dT):	Oligomeres von dT-Resten, durch Phosphodiesterbindungen verknüpft
Oligo(dT)-Zellulose:	an Zellulose gebundene Oligo(dT)-Reste, zur Chromatographie von Poly(A)$^+$RNA
PIPES:	Piperazin-N,N'-bis(2-äthansulfonsäure)
Plasmid:	zirkuläre, extrachromosomale Bakterien-DNA, die selbständig repliziert
Poly(A) oder (dA):	Polymeres von A- oder dA-Resten, durch Phosphodiesterbindungen verknüpft
Poly(A)$^+$RNA:	mRNA, welche am 3'Ende der Nukleinsäuresequenz eine homopolymere Region von Poly(A) besitzt
Poly(C) oder (dC):	Polymeres von C- oder dC-Resten, durch Phosphodiesterbindungen verknüpft
Poly(I):	Polymeres von I-Resten, durch Phosphodiesterbindungen verknüpft
Poly(I):poly(C):	doppelsträngige Nukleinsäure, deren Stränge Poly(I) und Poly(C) sind
Poly(U):	Polymeres von U-Resten, durch Phosphodiesterbindungen verknüpft
Primer:	Oligonukleotid, komplementär zu einem Teil eines RNA-Moleküls, von dem ausgehend cDNA-Synthese erfolgt
Probe:	siehe Hybridisierungsprobe
Promotor:	DNA-Sequenz, an die RNA-Polymere bindet
RBS:	siehe Ribosomenbindungssequenz

rekombinante DNA:	DNA-Sequenz, welche aus DNA-Abschnitten verschiedener Herkunft besteht, die in vitro miteinander verknüpft worden sind
Replikation (von DNA):	Duplizierung eines DNA-Moleküles
Restriktionsanalyse:	Kartierung eines DNA-Moleküls im Hinblick auf Spaltstellen von Restriktionsendonukleasen
Restriktionsendonuklease:	Enzym, das bei einer bestimmten DNA-Sequenz den DNA-Doppelstrang spaltet
Restriktionskartierung:	siehe Restriktionsanalyse
Reverse Transkription:	Herstellung einer cDNA-Kopie mit einem RNA-Molekül als Matrize und einem Oligonukleotid als Primer
Ribosomenbindungssequenz:	Teil der mRNA, der ans Ribosom binden kann
RNA:	Ribonukleinsäure
RNA-Polymerase:	Enzym, das einen zu DNA komplementären RNA-Strang synthetisieren kann
Saccharosegradient:	Mittel zur Auftrennung eines Gemisches von (RNA-)Molekülen nach ihrer Größe
SDS:	Natriumdodecylsulfat
Screening:	Durchsuchen im Hinblick auf eine bestimmte Eigenschaft
Sequenzkomplexität:	ein Wert für die Anzahl qualitativ verschiedener DNA-Sequenzen in einer bestimmten Menge DNA
Subtypen:	siehe Genfamilien
(d)T:	(Deoxy) Thymidin
Transformant:	Bakterium, das fremde DNA durch Transformation erhalten hat
Transformation:	Einschleusen fremder DNA in Bakterien
Transkription:	Kopierung von mRNA von einer dazu komplementären DNA-Sequenz
Translation:	Umsetzung der Information von mRNA in ein Polypeptid (Translationsprodukt)

Tridekanukleotid:	Oligonukleotid mit 13 Nukleotidbestandteilen
Tridekanukleotid-positiv:	mit dem Tridekanukleotid hybridisierend
Tris:	Trishydroxymethylaminomethan
U:	Uridin
Vektor:	Vehikel zum Einschleusen fremder DNA in Bakterien, meist ein Plasmid
Vektorhybrid:	siehe Hybridplasmid

Kurze Beschreibung der Illustrationen:

Fig. 1:
ist eine schematische Darstellung der Herstellung einer cDNA-Klonbank.

Fig. 2:
ist eine schematische Darstellung der Herstellung einer cDNA als Hybridisierungsprobe, die bezüglich ihres Gehalts an IFN-α und IFN-ß-spezifischen DNA Sequenzen durch Verwendung eines spezifischen Tridekanukleotid-Primers angereichert ist.

Fig. 3:
zeigt das Ergebnis der Koloniehybridisierung einer Klonbank mit Tridekanukleotid-initiierter cDNA aus Namalwazellen. Die Darstellung zeigt eine Autoradiographie eines Nitrozellulosefilters, welches 1536 verschiedene Klone trägt. Der Pfeil zeigt auf ein Beispiel eines Tridekanukleotid-positiven Klons.

Fig. 4:
zeigt die Kolonie-Hybridisierungsreaktion von zwei Tridekanukleotid-positiven Klonen (Klone P1H1 und P2H10) mit der Gesamtheit der 190 Tridekanukleotid-positiven Klone (Mikrotiterplatten P1 und P2) und einer willkürlich gewählten Mikrotiterplatte (E52) als Kontrolle.

Fig. 5:
zeigt die Autoradiographie einer Filterhybridisierung von Poly(A)$^+$RNA aus induzierten und nicht induzierten Namalwazellen mit mehreren Plasmiden. Die virusinduzierte Poly(A)$^+$RNA ("i" in der linken Spalte jedes Paares) und die Poly(A)$^+$RNA aus nicht induzierten Namalwazellen ("n" in der rechten Spalte jedes Paares) wurden durch Elektrophorese nach Molekülgröße aufgetrennt, bevor der Transfer auf Nitrozellulosefilter, die Hybridisierung der Filter mit radioaktiv markierter Plasmid-DNA und anschließende Autoradiographie erfolgten.

Fig. 6:
zeigt den schematischen Vergleich der Restriktionskarten von vier DNA-Inserten aus rekombinanten DNA-Molekülen dieser Erfindung. Die DNA-Inserte der Plasmide P1F12 und P2H10 zeigen dabei Homologie zu IFN-ß-DNA Restriktionsmustern, die DNA-Inserte der Plasmide P1A6 und 1F7 zeigen Homologie zu zwei unterschiedlichen Subtypen von IFN-α-DNA.

Fig. 7:
zeigt Ausschnitte der (identischen) Nukleotidsequenzen von 2 Klonen mit IFN-ß-DNA-Spezifität (Klone P1F12 und P2H10).

Fig. 8:
zeigt die Nukleotidsequenzen der 3' und 5' terminalen Segmente von 2 Inserten mit IFN-α-DNA-Spezifität (Klone P1A6 und 1F7). Die unterstrichene Sequenz ATG ist das Initiationscodon für die Translation.

AP C 12 N/251 287
(62 404 /12)

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung eines Mikroorganismus und seine in üblicher Weise erhältlichen Mutanten, welcher die genetische Information für die Biosynthese von Interferon des Typs α oder des Typs β in einem Hydridplasmid enthält, dadurch gekennzeichnet, daß man aus cDNA, die mit RNA aus induzierten menschlichen Zellen des B-Lymphocyten-Typs als Matrize synthetisiert worden war, eine entsprechend Klonbank herstellt und daraus diejenigen Klone, in denen das Hybridplasmid die genetische Information für die Biosynthese der Interferone des Typs α oder des Typs β enthält, unter Verwendung einer cDNA als Hybridisierungsprobe, die mit Interferonsequenzen beinhaltender RNA als Matrize und einem interferonspezifischen Oligonukleotid als Primer synthetisiert worden war, oder unter Verwendung des Oligonukleotids selbst als Hybridisierungsprobe identifiziert, und den so ausgewählten Klon nach üblichen Methoden kultiviert.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Mikroorganismus Escherichia coli verwendet wird.

3. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Mikroorganismus Escherichia coli Stamm HB 101 verwendet wird.

4. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die cDNA-Komponente in dem Hybridplasmid des Klons P1A6, P1F12 oder P2H10 enthalten ist.

5. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Hybridplasmid pBR322(Pst)PLAG, pBR322 (Pat) 1F7, pBR322(Pst)P1F12 oder pBR322(Pst) P2H10 verwendet wird.

6. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die für die Biosynthese von Interferon des Typs a codierende DNA-Sequenz des Hybridplasmids p BR322(Pst) 1F7 die Teilsequenz der Formel

120
.....CCTGGCACAGATGAGGAGAATCTCTCTTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACG
TGACTTTGGATTTCCCCAGGAGGAGTTTGGCAACCAGTTCCAAAAGGCTGAAACCA
TCCCTGTCCTCCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGAC
TCATCTGCTGCTTGGGATGAGACCCTCCTAGACAAATTCTA.....
237

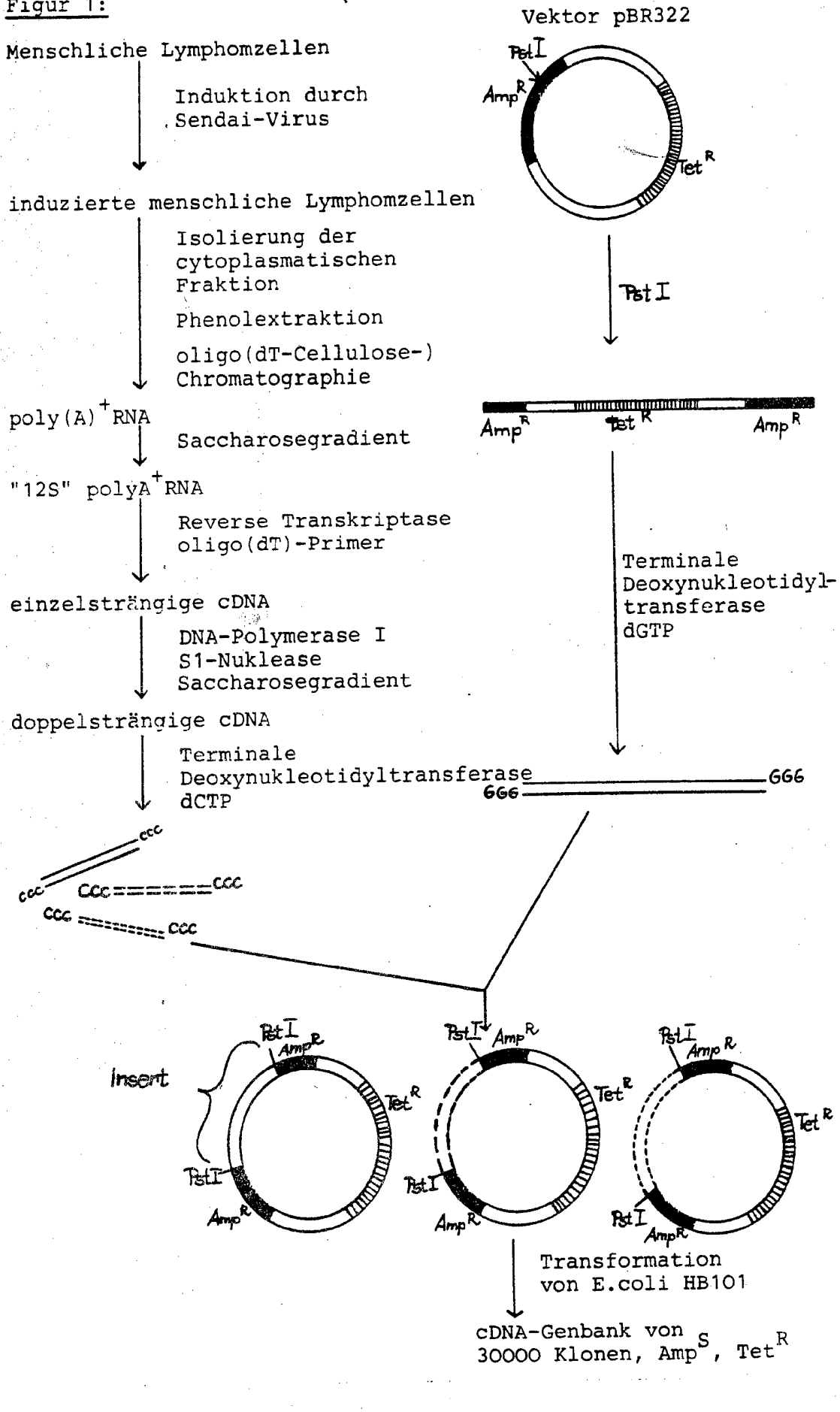
enthält.

7. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als interferonspezifisches Oligonukleotid das Tridekanukleotid 5'dCCTTCTGGAACTG3' verwendet wird.

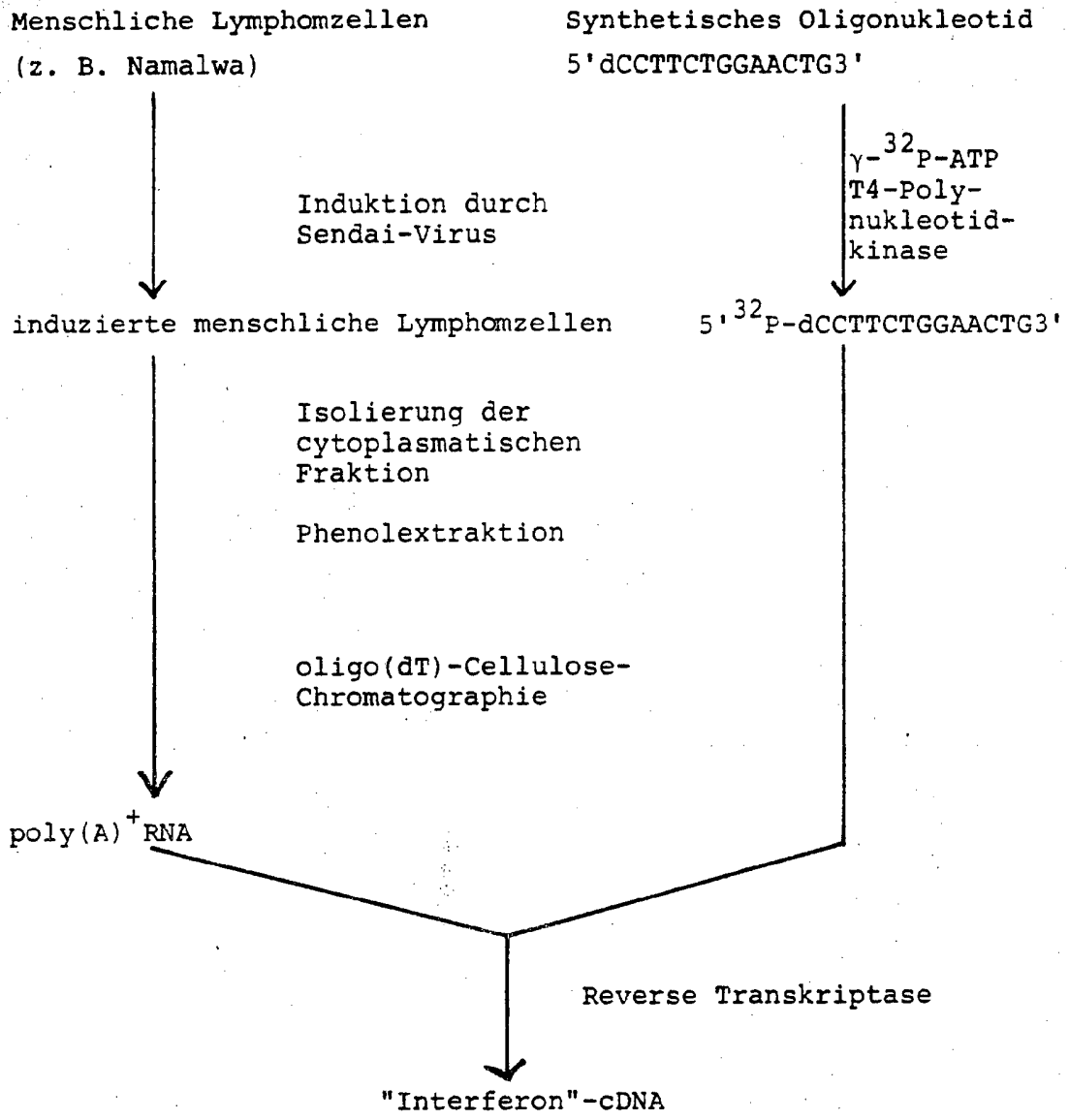
8. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als menschliche Zellen des B-Lymphocyten-Typs Zellen der Zellinie NC-37, Namalwa, Akuba oder RPMI 1788 verwendet werden.

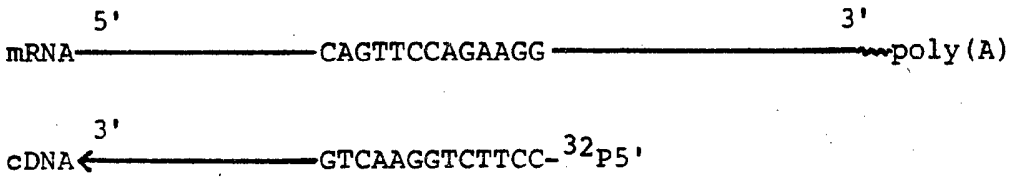
Hierzu 7 Seiten Zeichnungen

Figur 1:

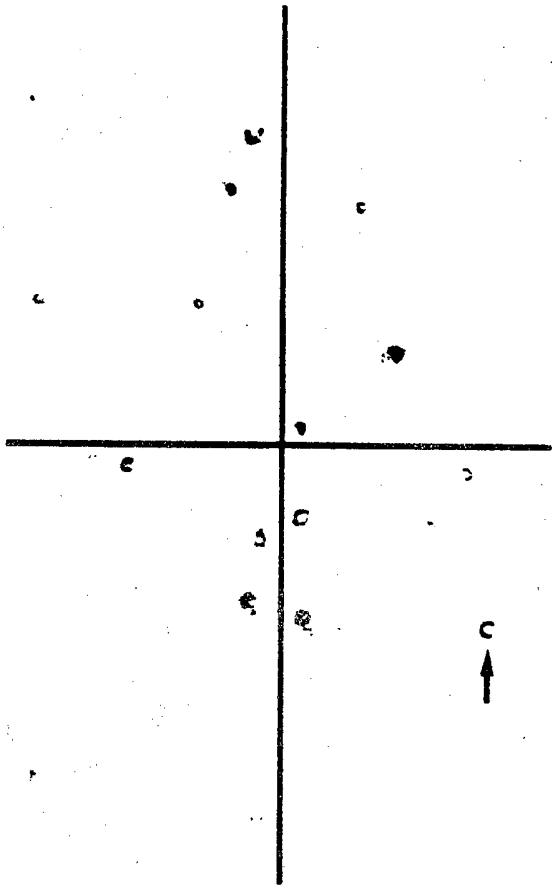

Vektor pBR322
Menschliche Lymphomzellen
Induktion durch Sendai-Virus
induzierte menschliche Lymphomzellen
Isolierung der cytoplasmatischen Fraktion
Phenolextraktion
oligo(dT-Cellulose-) Chromatographie
poly(A)+RNA
Saccharosegradient
"12S" polyA+RNA
Reverse Transkriptase
oligo(dT)-Primer
einzelsträngige cDNA
DNA-Polymerase I
S1-Nuklease
Saccharosegradient
doppelsträngige cDNA
Terminale Deoxynukleotidyltransferase
dCTP
PstI
AmpR
TetR
Terminale Deoxynukleotidyl-transferase
dGTP
GGG
CCC
Insert
Transformation von E.coli HB101
cDNA-Genbank von 30000 Klonen, AmpS, TetR

Figur 2:

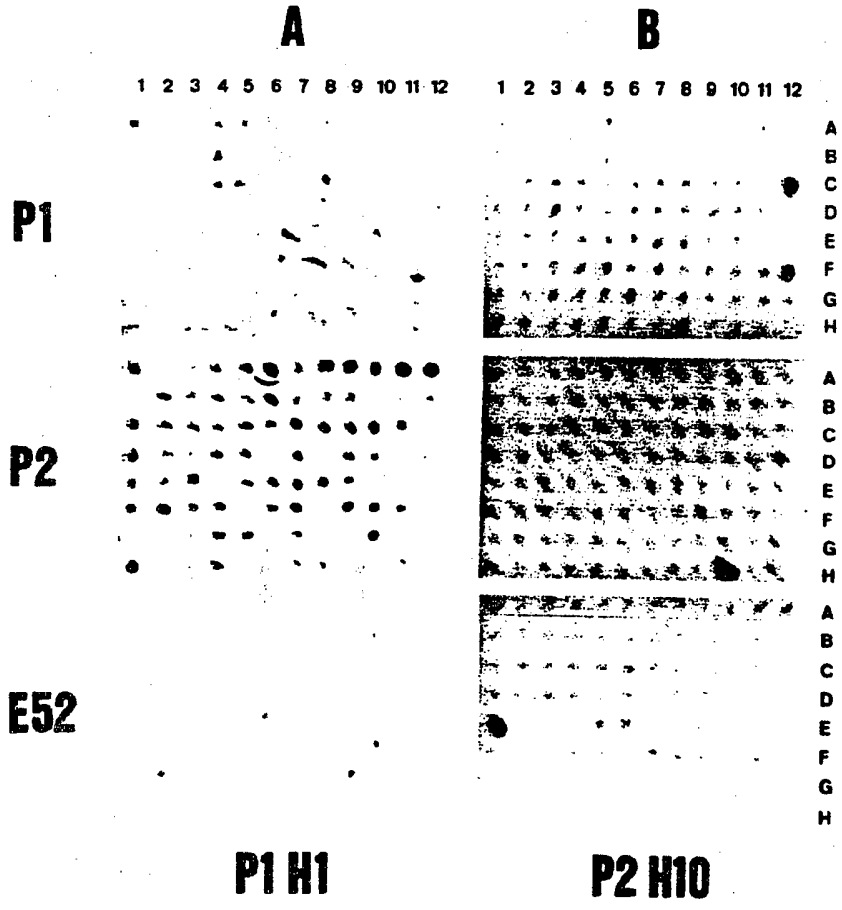

Menschliche Lymphomzellen
(z. B. Namalwa)
Synthetisches Oligonukleotid
5'dCCTTCTGGAACTG3'
γ-32P-ATP
T4-Poly-
nukleotid-
kinase
Induktion durch
Sendai-Virus
induzierte menschliche Lymphomzellen
5'32P-dCCTTCTGGAACTG3'
Isolierung der
cytoplasmatischen
Fraktion
Phenolextraktion
oligo(dT)-Cellulose-
Chromatographie
poly(A)+RNA
Reverse Transkriptase
"Interferon"-cDNA


5'
3'
mRNA
CAGTTCCAGAAGG
poly(A)
3'
cDNA
GTCAAGGTCTTCC-32P5'

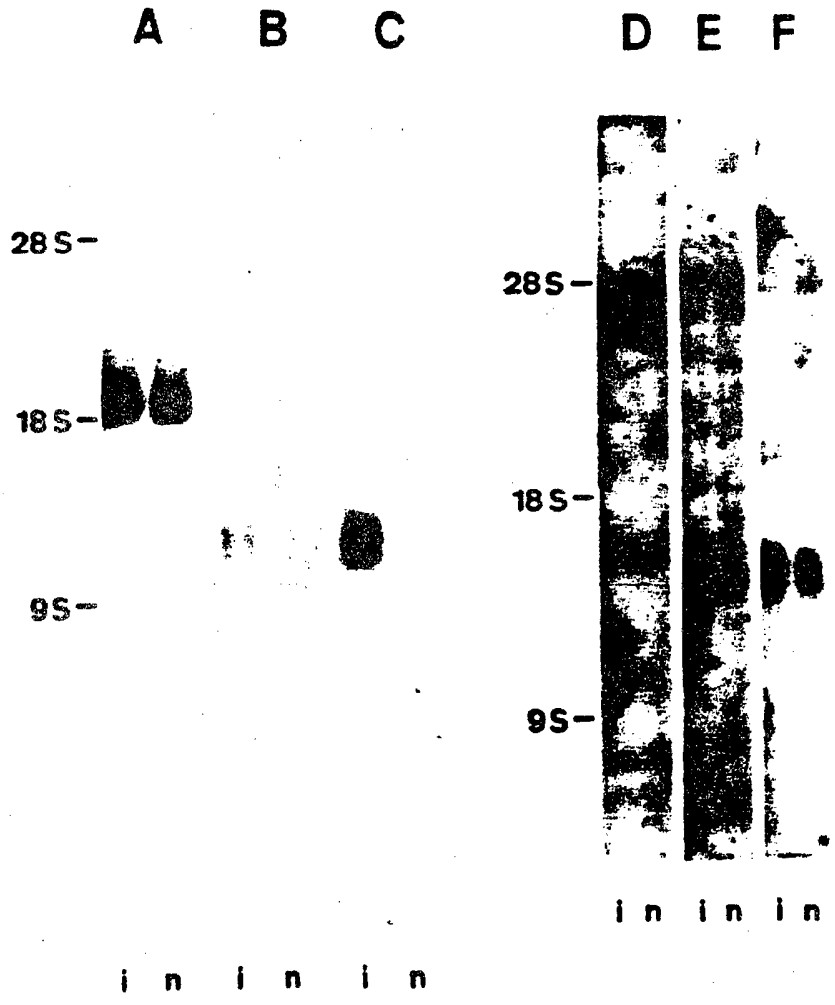
Figur 3:



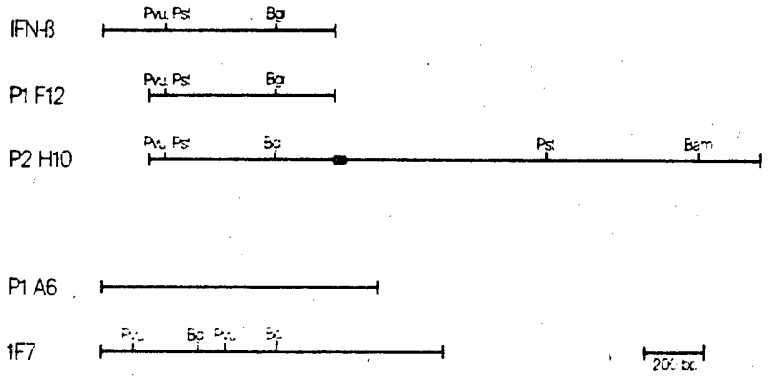
Figur 4:



Figur 5:



Figur 6:



Figur 7:

Klone P1F12 und P2H10:

Sequenz 3' von der Pvu II-Spaltstelle:

.....ACGCCGCATTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTCAGAC-
AAGATTCATCTAGCACTGGCTGGA.....

Sequenz 3' von der Bgl II-Spaltstelle:

....ACTGGACAATTGCTTCAAGCATTCTTCAACCAGCAGATGCTGTTTAAGTGACTGATGG-
... CTAATGTACTGCATATGAAA.....

Figur 8:

Klon P1A6:

5'-Ende:.....TTATCCATCTCAAGTAGCCTAGCAATATTTGCAACATCCCAATG.....
3'-Ende: .....GAGTCGCTTTACATTGTGGTTAATGTAACAATATATGTTCTTC polyA

Klon 1F7:

5'-Ende: ....AGGGTCACCCATTTCAACCAGTCTAGCAGCATCTGCAACATCTACAATG..
3'-Ende: ....TTATATTCAAGATATAAGTAAAAATAAACTTTCTGTAAACC polyA