



Ausschlusspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-8461

(11)

209 476

Int.Cl.⁸ 3(51) C 12 N 15/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 N/ 2338 485
(31) 193556;275088

(22) 02.10.81
(32) 03.10.80;18.08.81

(44) 09.05.84
(33) US;US

(71) siehe (73)

(72) HERSHBERGER, CHARLES L.;RADUE, ANNA K.;ROSTECK, PAUL R. JR.;US;
(73) ELI LILLY AND COMPANY; INDIANAPOLIS, US

(54) VERFAHREN ZUR STABILISIERUNG UND SELEKTIERUNG VON WIRTSZELLEN, DIE REKOMBINIERENDE DNA ENTHALTEN

(57) Verfahren zur Stabilisierung und Selektierung von Wirtszellen, die rekombinierende DNA enthalten, welche ein funktionelles Polypeptid ausdrückt, das darin besteht, daß man a) die Wirtszellen mit einem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor transformiert, der sowohl ein Repressorgen als auch ein Gen enthält, welches ein funktionelles Polypeptid ausdrückt, und b) die transformierten Wirtszellen mit einem lysogenen Organismus lysogenisiert, der einen Präger enthält, welcher in den Wirtszellen letal oder konditionell letal ist, der aber in den transformierten Wirtszellen durch das in dem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor enthaltene Repressorgen repressiert wird, mit der Maßgabe, daß der rekombinierende DNA-Klonierungsvektor ein Replikon und einen Promotor enthält, welche für den Repressor nicht sensitiv sind, und mit der weiteren Maßgabe, daß bei Lysogenisierung der transformierten Wirtszellen mit dem lysogenen Organismus, der ein Gen enthält, welches konditionell letal ist, die erhaltenen Wirtszellen unter restriktiven Bedingungen kultiviert werden.

233848 5 -1-

Titel der Erfindung: Verfahren zur Stabilisierung und Selektierung von Wirtszellen, die rekombinierende DNA enthalten.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Stabilisierung und Selektierung von Wirtszellen, die rekombinierende DNA enthalten, welche ein funktionelles Polypeptid ausdrückt. Ferner ist die Erfindung auch auf neue Organismen und klonbildende Vektoren gerichtet, die bei diesem Verfahren verwendet werden. Die Erfindung läßt sich so anpassen, daß sie eine einfache, bequeme und wohlfeile Methode zur Lyse von Wirtszellen schafft, um hierdurch intrazelluläre Produkte zu reinigen.

Im einzelnen betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Stabilisierung und Selektierung von Wirtszellen, die rekombinierende DNA enthalten, welche ein funktionelles Polypeptid ausdrückt, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- a) die Wirtszellen mit einem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor transformiert, der sowohl ein Repressorgen als auch ein Gen enthält, welches ein funktionelles Polypeptid ausdrückt, und
 - b) die transformierten Wirtszellen mit einem lysogenen Organismus lysogenisiert, der einen Präger enthält, welcher in den Wirtszellen letal oder konditionell letal ist, der aber in den transformierten Wirtszellen durch das in dem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor enthaltene Repressorgen repressiert wird,
- mit der Maßgabe, daß der rekombinierende DNA-Klonierungsvektor ein Replikon und einen Promotor enthält, welche für den Repressor nicht sensitiv sind, und mit der weiteren Maßgabe, daß bei Lysogenisierung der transformierten Wirtszellen mit einem lysogenen Organismus, der ein Gen enthält, welches konditionell letal ist, die erhaltenen Wirtszellen unter restriktiven Bedingungen kultiviert werden.

Weiter ist die Erfindung auch auf eine transformierte Wirtszelle gerichtet, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie besteht aus

- a) einem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor, der sowohl ein Repressorgen als auch ein Gen enthält, welches ein funktionelles Polypeptid ausdrückt, und
- b) einem chromosomalen Präger, der letal oder konditionell letal ist, jedoch durch das Repressorgen, das im rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor enthalten ist, repressiert wird,

mit der Maßgabe, daß der rekombinierende DNA-Klonierungsvektor ein Replikon und einen Promotor enthält, die für den Repressor nicht sensitiv sind.

Schließlich betrifft die Erfindung auch noch ein Verfahren zur Lyse von Wirtszellen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man einen letalen oder konditionell letalen Präger, der

zu einer Wirtszellenlyse führt, entweder einführt in

a) Wirtszellen, die mit einem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor transformiert sind, der ein Repressorgen enthält, welches einen Präger repressiert, der eine Wirtszellenlyse hervorruft und der bei oder oberhalb einer Temperatur innerhalb eines bestimmten Temperaturbereiches inaktiviert ist, und die transformierten Wirtszellen mit einem lysogenen Organismus lysogenisiert, der einen Präger enthält, welcher in den Wirtszellen letal oder konditionell letal ist, der jedoch in den transformierten Wirtszellen durch das Repressorgen, welches in dem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor enthalten ist, repressiert wird, oder einführt in

b) Wirtszellen, indem man die Wirtszellen mit einem lysogenen Organismus, der einen konditionell letalen Präger enthält, lysogenisiert oder indem man die Wirtszellen mit einem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor, der einen konditionell letalen Präger enthält, transformiert

und die hierdurch jeweils erhaltenen Wirtszellen bei einer Temperatur, die den Repressor inaktiviert, oder, im Fall eines konditionell letalen Prägers, bei einer Temperatur, die nicht innerhalb des Temperaturbereichs liegt, der eine Züchtung der Wirtszellen erlaubt, züchtet.

Durch die Erfindung wird ein selektives System zur Verfügung gestellt, durch welches sich rekombinierende DNA-Wirtszellen stabilisieren oder selektieren lassen, indem man hierzu einen letalen chromosomalen Präger verwendet, der durch ein Gen repressiert wird, das an einem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor getragen wird. Dies ist besonders wichtig, weil rekombinierende DNA-Klonierungsvektoren, wie Plasmide, häufig rasch aus Bakterienpopulationen verloren gehen und bei großtechnischen Fermentationen mehr als 10^{16} Zellgenerationen erforderlich sein können. Sobald daher die rekomb-

- a) die Wirtszellen mit einem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor transformiert, der sowohl ein Repressorgen als auch ein Gen enthält, welches ein funktionelles Polypeptid ausdrückt, und
- b) die transformierten Wirtszellen mit einem lysogenen Organismus lysogenisiert, der einen Präger enthält, welcher in den Wirtszellen letal oder konditionell letal ist, der aber in den transformierten Wirtszellen durch das in dem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor enthaltene Repressorgen repressiert wird,

mit der Maßgabe, daß der rekombinierende DNA-Klonierungsvektor ein Replikon und einen Promotor enthält, welche für den Repressor nicht sensitiv sind, und mit der weiteren Maßgabe, daß bei Lysogenisierung der transformierten Wirtszellen mit einem lysogenen Organismus, der ein Gen enthält, welches konditionell letal ist, die erhaltenen Wirtszellen unter restriktiven Bedingungen kultiviert werden.

Weiter ist die Erfindung auch auf eine transformierte Wirtszelle gerichtet, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie besteht aus

- a) einem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor, der sowohl ein Repressorgen als auch ein Gen enthält, welches ein funktionelles Polypeptid ausdrückt, und
- b) einem chromosomalen Präger, der letal oder konditionell letal ist, jedoch durch das Repressorgen, das im rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor enthalten ist, repressiert wird,

mit der Maßgabe, daß der rekombinierende DNA-Klonierungsvektor ein Replikon und einen Promotor enthält, die für den Repressor nicht sensitiv sind.

Schließlich betrifft die Erfindung auch noch ein Verfahren zur Lyse von Wirtszellen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man einen letalen oder konditionell letalen Präger, der

zu einer Wirtszellenlyse führt, entweder einführt in

a) Wirtszellen, die mit einem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor transformiert sind, der ein Repressorgen enthält, welches einen Präger repressiert, der eine Wirtszellenlyse hervorruft und der bei oder oberhalb einer Temperatur innerhalb eines bestimmten Temperaturbereiches inaktiviert ist, und die transformierten Wirtszellen mit einem lysogenen Organismus lysogenisiert, der einen Präger enthält, welcher in den Wirtszellen letal oder konditionell letal ist, der jedoch in den transformierten Wirtszellen durch das Repressorgen, welches in dem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor enthalten ist, repressiert wird, oder einführt in

b) Wirtszellen, indem man die Wirtszellen mit einem lysogenen Organismus, der einen konditionell letalen Präger enthält, lysogenisiert oder indem man die Wirtszellen mit einem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor, der einen konditionell letalen Präger enthält, transformiert

und die hierdurch jeweils erhaltenen Wirtszellen bei einer Temperatur, die den Repressor inaktiviert, oder, im Fall eines konditionell letalen Prägers, bei einer Temperatur, die nicht innerhalb des Temperaturbereichs liegt, der eine Züchtung der Wirtszellen erlaubt, züchtet.

Durch die Erfindung wird ein selektives System zur Verfügung gestellt, durch welches sich rekombinierende DNA-Wirtszellen stabilisieren oder selektieren lassen, indem man hierzu einen letalen chromosomalen Präger verwendet, der durch ein Gen repressiert wird, das an einem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor getragen wird. Dies ist besonders wichtig, weil rekombinierende DNA-Klonierungsvektoren, wie Plasmide, häufig rasch aus Bakterienpopulationen verloren gehen und bei großtechnischen Fermentationen mehr als 10^{16} Zellgenerationen erforderlich sein können. Sobald daher die rekomb-

binierende DNA-Codierung für das gewünschte Produkt einmal in ein Plasmid eingesetzt ist, dann ist es wünschenswert oder sogar essentiell, daß die das Plasmid enthaltende Mikroorganismenkultur so stabilisiert ist, daß alle Zellen der Kultur, das gewünschte Plasmid enthalten. Dies ist schwierig und kritisch, weil rekombinierende Plasmide mit fremder DNA notorisch instabil sind und oft mehr als 90 % der Zellen in einer Population das rekombinierende Plasmid nicht enthalten können, nachdem eine Kultur über Nacht gewachsen ist. Es kommt daher zu einer ganz dramatischen Verringerung der Produktionskapazität, weil eine Expression der gewünschten Gene nur in denjenigen Zellen möglich ist, die das Plasmid beibehalten.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen:

Es gibt bisher nur sehr wenige wirksame Methoden zur Stabilisierung rekombinierender Plasmide, und diese haben alle ernsthafte Nachteile.

Eine dieser Methoden besteht in einer Einführung antibiotisch resistenter Gene in rekombinierende Plasmide und einem anschließenden Zusatz des jeweiligen Antibiotikums zum Kulturmedium. Zellen, die das Plasmid mit dem antibiotisch resistenten Gen enthalten, werden dabei als geeignet selektiert, während Zellen, die das Plasmid verlieren, als ungeeignet selektiert und daher eliminiert werden. Der wesentliche Nachteil dieser Methode besteht darin, daß man hierbei ein großtechnisches Wachstum an antibiotisch resistenten Bakterien benötigt, im Fermentationsmedium ein teures Antibiotikum braucht und schließlich das Antibiotikum vom gewünschten Produkt durch eine nachfolgende Reinigung entfernen muß.

Die andere bekannte Methode zur Stabilisierung rekombinie-

render Plasmide besteht in einer Komplementierung einer auxotropen Mutation auf dem Chromosom. Bei dieser Methode sind der Zusammensetzung des Fermentationsmediums starke Grenzen gesetzt, wobei die Fermentation zudem in einem Medium durchgeführt werden muß, das den von den Wirtsbakterien benötigten Nährstoff nicht enthält. Durch Syntrophie kann es ferner dazu kommen, daß die Zellen nach Verlust des Plasmids noch weiter wachsen können. Beide Arten an Selektion sind daher abhängig von einer speziellen Manipulation der Medien. Solche Beschränkungen führen zu einer Erhöhung der Kosten der Fermentation und begrenzen die für eine Verbesserung der Produktivität verfügbaren Möglichkeiten.

Aufgabe der Erfindung

Die bekannten Methoden zur Stabilisierung rekombinierender Plasmide haben somit die verschiedensten Nachteile, und Aufgabe der Erfindung ist daher die Bereitstellung anderer Selektionsmethoden, die von der Zusammensetzung der Medien unabhängig sind und bei denen der rekombinierende DNA-Klonierungsvektor unter allen Fermentationsbedingungen aufrechterhalten bleibt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Diese Aufgabe läßt sich nun durch einen Zellsuicid lösen, da sich suicide Zellen konstruieren lassen, die einen letalen Präger auf einem Chromosom und einen Repressor oder ein komplementierendes Gen auf einem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor enthalten. Diesen Merkmalen entsprechend aufgebaute Zellen sterben ab, wenn sie den Vektor verlieren. Die Erfindung baut auf diesem Prinzip auf und sorgt hierdurch dafür, daß alle lebenden Zellen in einer Kultur den gewünschten rekombinierenden DNA-Klonie-

rungsvektor enthalten. Dies ist besonders wichtig, weil hierdurch das Produktionsvermögen solcher Kulturen verbessert wird, ohne daß dies mit den bereits oben erwähnten Nachteilen verbunden ist. Durch die Erfindung wird somit ein Verfahren zur Selektierung und Aufrechterhaltung einer plasmidhaltigen Bakterienpopulation bereitgestellt, indem hierzu Gebrauch gemacht wird von einem letalen chromosomalen Präger, der durch ein von einem Plasmid getragenes Gen repressiert wird.

Erfindungsgemäß wird unter einem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor jedes Mittel unter Einschluß rekombinierender Plasmide, Bakteriophage und Viren verstanden, das aus einem DNA-Molekül besteht, an welches ein oder mehr zusätzliche DNA-Segmente gebunden sein können.

Unter einem Repressor wird ein Gen verstanden, das an einem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor angeordnet ist und das eine Expression eines letalen oder konditionell letalen Gens in einem Chromosom einer Wirtszelle repressiert oder verhindert.

Ein funktionelles Polypeptid ist ein gewinnbares bioaktives vollständig heterologes Polypeptid oder ein entsprechender Vorläufer, ein gewinnbares bioaktives Polypeptid aus einem heterologen Polypeptid und einem ganzen homologen Polypeptid oder einem Teil hiervon oder ein gewinnbares bioinaktives Fusionspolypeptid aus einem heterologen Polypeptid und einem bioinaktivierenden homologen Polypeptid, das speziell gespalten werden kann.

Ein verschmolzenes Genprodukt ist ein gewinnbares heterologes Polypeptid, das mit einem ganzen homologen Polypeptid oder einem Teil hiervon verschmolzen ist.

Ein Präger ist ein Gen oder eine Kombination von Genen bekannter Funktion und Stellung an einem Chromosom oder einem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor.

Die Erfindung kann angewandt werden zum Wachsenlassen von Kulturen, durch welches Produkte gebildet werden, die von rekombinierender DNA codiert sind. Ohne ein wirksames Selektionssystem verlieren viele Zellen in solchen Kulturen das gewünschte Plasmid, so daß die Bildung des gewünschten Produkts stark verringert ist. Durch die Erfindung wird sichergestellt, daß alle lebenden Zellen in einer Kultur den rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor tragen, so daß die mögliche Produktivität einer solchen Kultur erfindungsgemäß verbessert wird.

Die Erfindung ist besonders vielseitig, da sie auf die Bildung irgendeiner Substanz angewandt werden kann, deren Synthese von einem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor bestimmt wird. Ein bevorzugter rekombinierender DNA-Klonierungsvektor ist das Plasmid, wobei erfindungsgemäß, statt dessen selbstverständlich auch bakteriophage oder andere Vektoren verwendet werden können. Erfindungsgemäß kann ferner auch Gebrauch gemacht werden von irgendeinem letalen Präger, der in ein Wirtszellchromosom eingebaut ist, falls die Letalität von einem Präger kompensiert oder komplementiert wird, der sich auf einem geeigneten rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor befindet. Die Brauchbarkeit der Erfindung ist unabhängig von anderen Prägern, die auf dem Klonierungsvektor geklont sind, so daß erfindungsgemäß rekombinierende Stämme verwendet werden können, die ein oder mehr Gene enthalten, die aus der technischen Produktion oder der Forschung stammen.

Die Anwendbarkeit eines Zellsuicids zur Aufrechterhaltung und Stabilisierung rekombinierender DNA-Wirtszellen wird

anhand der Wechselwirkung von Bakteriophag λ mit *Escherichia coli* K12 gezeigt. Das Bakteriophag λ ist ein temperiertes Bakteriophag, das bei der Infizierung von *Escherichia coli* K12 einem von zwei gegenseitig exklusiven Zyklen folgt. In der lytischen Phase repliziert sich das Bakteriophag DNA autonom, lenkt die Synthese und Anordnung der Bakteriophagkomponenten und tötet die Zellen gleichlaufend mit der Freisetzung von reifem Bakteriophag. In der lysogenen Phase ist das Bakteriophag in das Wirtschromosom als ein Prophag integriert, repliziert sich als Präger auf dem Chromosom und blockiert die Synthese der Bakteriophagkomponenten. Ein Bakteriophagen, nämlich λcI , codiert für einen Repressor, der den lysogenen Zustand aufrechterhält und eine Expression von Genen für Bakteriophagkomponenten und eine Reifung blockiert. Ist der Repressor inaktiviert oder von der Zelle entfernt, dann entwickelt sich das Prophag aus dem Chromosom, tritt in den lytischen Kreis ein und tötet die Zelle. Ein Bakteriophag mit einem unvollkommenen λcI -Gen kann den lysogenen Zustand nicht beibehalten und ist für die Zelle letal, es sei denn, daß von einer anderen Quelle für einen funktionellen Repressor gesorgt wird. Bei einer beispielsweise Ausführungsform der Erfindung wird $\lambda cI90$ als ein repressorabhängiges Prophag verwendet und ein cI -Gen als funktioneller Repressor verwendet, das in einen rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor geklont ist.

Das selektive System und die Brauchbarkeit der Erfindung lassen sich zeigen, indem man das $\lambda cI857$ Repressorgen vom Bakteriophag λ auf das Insulinplasmid pIA2 kloniert. Das Plasmid pIA2 erhält man aus pIA1 durch Insertion eines tetracyclinresistenten Prägers (Proc. Nat. Acad. Sci. 76, 106 bis 110 (1979)). Die Insertion von tetracyclin- und anderen antibiotikaresistenten Prägern auf bekannte Plasmide ist eine dem Fachmann geläufige Maßnahme und läßt sich in bekannter Weise erreichen.

Die Restriktionsstelle und der Funktionsplan von Plasmid pIA2 gehen aus Fig. 1 der Zeichnung hervor. Die Klonung des Repressorgens λ cI857 von Bakteriophag λ auf Plasmid pIA2 führt zu einem neuen Plasmid, das als Plasmid pAR2 bezeichnet wird, welches die lytische Entwicklung von Bakteriophag λ blockiert und die Bildung eines verschmolzenen Genprodukts von Humaninsulin-A-Kette codiert.

Die Restriktionsstelle und der Funktionsplan für das Plasmid pAR2 gehen aus Fig. 2 der Zeichnung hervor.

Das neue Rekombinationsplasmid pAR2 kann zu *Escherichia coli* K12 RV308 (J.Mol. Biol. 139, 147 bis 161 (1980)) transformiert werden, und der hierdurch erhaltene Stamm läßt sich dann mit Bakteriophag λ cI90 lysogenisieren. Das Bakteriophag λ cI90 bildet keinen funktionellen cI-Repressor, so daß der konstruierte Stamm *Escherichia coli* K12 RV308 λ cI90/pAR2 eine Retention des Plasmids pAR2 erfordert, während der konstruierte Stamm *Escherichia coli* K12 RV308/pAR2 ohne das Plasmid gleich gut überlebt. Ein Vergleich der Plasmidretention in den beiden Stämmen zeigt deutlich, daß praktisch alle lebenden Zellen im erfindungsgemäßen Stamm das gewünschte Plasmid haben. Ferner behält der Stamm *Escherichia coli* K12 RV308 λ cI90/pAR2 nicht nur das Plasmid pAR2, sondern bildet darüber hinaus auch noch das gewünschte verschmolzene Genprodukt, wie sich durch Elektrophorese mittels Polyacrylamidgel zeigen läßt.

Das Plasmid pAR2 läßt sich ferner auch in *Escherichia coli* K12 C600R_k-M_k- (Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 1030 bis 1034 (1974)) transformieren, und den hierdurch erhaltenen Stamm kann man dann mit dem Bakteriophag λ cI90 lysogenisieren. Der hierdurch konstruierte Stamm *Escherichia coli* K12 C600R_k-M_k- λ cI90/pAR2 braucht zum Überleben das Plasmid pAR2 und dies stellt daher ebenfalls ein Beispiel für die Erfin-

dung dar.

Die Erfindung lässt sich auch noch anhand anderer Plasmide erläutern. So kann man beispielsweise das cro-Gen von Bakteriophag λ auf Plasmid pBR322 (Life Sci. 25, 807 bis 818 (1979)) klonen, indem man das Fragment BamHI-EcoRI vom Bakteriophag λ cI857 inseriert. Das hierdurch erhaltene neue Plasmid, welches als Plasmid pAR1 bezeichnet wird, kann in Escherichia coli K12 RV308 transformiert werden, und der so erzeugte Stamm lässt sich dann mit Bakteriophag λ cI90 lysogenisieren. Eine ähnliche Operation lässt sich auch unter Verwendung von Escherichia coli K12 C600_{R_k-M_k}- oder Escherichia coli K12 C600 als Wirt und von Bakteriophag λ cI857 als lysogenem Organismus durchführen. Das Gen λ cro bildet einen Repressor, der die Funktion des Repressors cI ersetzt, und dies macht deutlich, daß die konstruierten Stämme Escherichia coli K12 RV308 λ cI90/pAR1, Escherichia coli K12 C600_{R_k-M_k}- λ cI857/pAR1 und Escherichia coli K12 C600 λ cI857/pAR1 zum Überleben ein Plasmid brauchen, welches λ cro enthält. Der Repressor λ cI857 wird bei 38 bis 44 °C oder darüber (restriktive Bedingungen) inaktiviert und bei niedrigeren Temperaturen (zulässige Bedingungen) aktiviert, so daß das λ cro enthaltende Plasmid nur zum Überleben im letztgenannten Stamm unter restriktiven Kulturbedingungen erforderlich ist. Ein Vergleich der Plasmidretention in Escherichia coli K12 C600_{R_k-M_k}- λ cI857/pAR1 unter zulässigen Bedingungen und somit ohne die Erfindung, sowie unter restriktiven Bedingungen und somit mit der Erfindung, zeigt deutlich, daß praktisch alle lebenden Zellen in der Kultur bei der Erfindung das gewünschte Plasmid haben. Ähnliche Ergebnisse zeigt auch ein Vergleich der Plasmidretention in erfindungsgemäß konstruierten Stämmen Escherichia coli K12 RV308 λ cI90/pAR1 sowie in nicht erfindungsgemäß konstruierten Stämmen Escherichia coli K12 RV308/pAR1. Die Anwendung von Plasmid pAR1 ist

besonders vorteilhaft, weil dieses Plasmid einen Promotor enthält, der ohne weiteres anpaßbar ist für die Insertion irgendeines der verschiedensten Gene, welche die Bildung brauchbarer Produkte codieren.

Zur weiteren beispieismäßigen Belegung und Demonstration der breiten Anwendbarkeit der Erfindung werden auch die Plasmide pPR1 und pPR3 hergestellt. Zur Konstruktion des Plasmids pPR1 inseriert man das Fragment 2,5 Kb BglII des Bakteriophags λ cI857 in die einmalige Restriktionsstelle BamHI des Plasmids pIA7 Δ 4 Δ 1. Die Restriktionsstelle und der Funktionsplan von pIA7 Δ 4 Δ 1 gehen aus der Fig. 3 der Zeichnung hervor. Das Plasmid pIA7 Δ 4 Δ 1 enthält demnach den Escherichia coli-Tryptophanpromotor, die Träger für eine antibiotische Resistenz und ein Gen, das ein verschmolzenes Genprodukt auspreßt, welches einen Teil des Proteins trp E enthält, das mit der Polypeptidkette A von Humaninsulin verschmolzen ist.

Nach dem in Beispiel 13A-I näher beschriebenen Verfahren wird ausgehend von Plasmid pBR322 auch das Plasmid pIA7 Δ 4 Δ 1 konstruiert. Nach der hierfür üblichen Schreibweise beinhaltet das Symbol " Δ " eine Auslöschung. Demnach beschreibt beispielsweise eine Bezugnahme auf ein Plasmid unter nachfolgender Angabe " Δ EcoRI-XbaI" das Plasmid, von welchem die Nucleotidsequenz zwischen den Restriktionsenzymstellen EcoRI durch Verdauung durch diese Enzyme entfernt worden ist. Bestimmte Auslöschungen werden der Einfachheit halber einfach durch eine Zahl bezeichnet. Beginnend vom ersten Basispaar ("bp") der Erkennungslage EcoRI, welche dem Gen für die Tetracyclinresistenz im Stammplasmid pBR322 vorangeht, bezeichnet das Symbol " Δ 1" daher eine Auslöschung von bp 1-30 (nämlich EcoRI-HindIII), und somit ein Außerkunctionsetzen des Tetracyclin-Promotor/Operator-Systems. Das Symbol " Δ 2" beinhaltet eine Auslöschung von bp 1-375 (näm-

lich Δ EcoRI-BamHI), und somit eine Entfernung von sowohl dem Tetracyclin-Promotor/Operator als auch einem Teil des Strukturgens, welches den Code für eine Tetracyclinresistenz trägt. Das Symbol " $\Delta 4$ " beinhaltet eine Auslöschung von bp ~ 900 bis ~ 1500 des Operator-Fragments trp, welches das Strukturgen für das Polypeptid trp D eliminiert.

Die Klonung des Repressorgens λ cI857 des Bakteriophags λ auf das Plasmid pIA7 Δ 4 Δ 1 führt zu einem neuen Plasmid, welches als Plasmid pPR1 bezeichnet wird, das die lytische Entwicklung des Bakteriophags λ blockiert und gleichzeitig die Bildung des oben erwähnten verschmolzenen Genprodukts co-dierte. Die Restriktionsstelle und der Funktionsplan für das Plasmid pPR1 gehen aus Fig. 4 der Zeichnung hervor. In dieser Figur sind die Verbindungsstellen BglII-BamHI durch das Symbol " $\overline{B/B}$ " bezeichnet.

Das neue Rekombinationsplasmid pPR1 läßt sich entsprechend transformieren, beispielsweise zu Escherichia coli K12 RV308, Escherichia coli K12 C600 (Bacteriol. Rev. 36, 526 bis 557, (1972) und Escherichia coli K12 C600_{R_k}-M_k- (Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 1030 bis 1034 (1974)), und die hierdurch erhaltenen Stämme kann man mit Bakteriophag λ cI90 lysogenisieren. Das Bakteriophag λ cI90 bildet keinen funktionellen Repressor cI, so daß die konstruierten Stämme Escherichia coli K12 RV308 λ cI90/pPR1, Escherichia coli K12 C600 λ cI90/pPR1 und Escherichia coli K12 C600_{R_k}-M_k- λ cI90/pPR1 eine Retention des Plasmids pPR1 erfordern, während die konstruierten Stämme Escherichia coli K12 RV308/pPR1, Escherichia coli K12 C600/pPR1 und Escherichia coli K12 C600_{R_k}-M_k-/pPR1 genau so gut ohne das Plasmid überleben. Ein Vergleich der Plasmidretention in den Stämmen macht deutlich, daß praktisch alle lebenden Zellen in den erfindungsgemäßen Stämmen das gewünschte Plasmid haben. Darüber hinaus behalten auch alle Stämme Escherichia coli K12 RV308 λ cI90/pPR1, Escherichia coli K12 C600 λ cI90/pPR1 und

Escherichia coli K12 C600R_k^{-M_k}-λCI90/pPR1 das Plasmid pPR1 und bilden das gewünschte verschmolzene Genprodukt, wie sich durch Elektrophorese mittels Polyacrylamidgel feststellen läßt.

Das Plasmid pPR3 wird konstruiert durch Insertion des Fragments 2,5 Kb BglII des Bakteriophagen λCI857 in die einmalige Restriktionsstelle BamHI des Plasmids pIB7Δ4Δ1. Die Restriktionsstelle und der Funktionsplan des Plasmids pIB7Δ4Δ1 gehen aus Fig. 5 der Zeichnung hervor. Das Plasmid pIB7 4 1 enthält demnach ein Gen, welches ein verschmolzenes Genprodukt ausdrückt, das aus einem Teil des Proteins trp E besteht, welches mit der Polypeptidkette B von Humaninsulin verschmolzen ist.

In analoger Weise wie das Plasmid pIA7Δ4Δ1 wird auch das Plasmid pIB7Δ4Δ1 ausgehend von dem Plasmid pBR322 gebildet. Der spezielle Aufbau dieses Plasmids geht aus Beispiel 21 hervor.

Die Klonung des Repressorgens λCI857 des Bakteriophagen λ auf das Plasmid pIB7Δ4Δ1 führt zu dem neuen Plasmid pPR3. Dieses Plasmid blockiert die lytische Entwicklung des Bakteriophagen λ und codiert gleichzeitig die Bildung des oben erwähnten verschmolzenen Genprodukts. Die Restriktionsstelle und der Funktionsplan des Plasmids pPR3 gehen aus Fig. 6 der Zeichnung hervor. In dieser Figur sind die Verbindungsstellen BglII-BamHI durch das Symbol "[B/B]" bezeichnet.

Das neue Rekombinationsplasmid pPR3 läßt sich entsprechend transformieren, beispielsweise zu Escherichia coli K12 RV308, Escherichia coli K12 C600 und Escherichia coli K12 C600R_k^{-M_k}, und die hierdurch erhaltenen Stämme kann man dann mit Bakteriophag λCI90 lysogenisieren. Wie bereits oben für die

Stämme beschrieben, welche lysogenisiertes pPR1 enthalten, erfordern die konstruierten Stämme *Escherichia coli* K12 RV308 λ cI90/pPR3, *Escherichia coli* K12 C600 λ cI90/pPR3 und *Escherichia coli* K12 C600R_k-M_k- λ cI90/pPR3 eine Retention des Plasmids pPR3, während die konstruierten Stämme *Escherichia coli* K12 RV308/pPR3, *Escherichia coli* K12 C600/pPR3 und *Escherichia coli* K12 C600R_k-M_k-/pPR3 keine solche Retention erfordern und ohne das Plasmid genau so gut überleben. Ein Vergleich der Plasmidretention in den Stämmen macht deutlich, daß praktisch alle lebenden Zellen in den erfindungsgemäßen Stämmen das gewünschte Plasmid haben. Die Stämme *Escherichia coli* K12 RV308 λ cI90/pPR3, *Escherichia coli* K12 C600 λ cI90/pPR3 und *Escherichia coli* K12 C600R_k-M_k- λ cI90/pPR3 behalten ferner auch ihre Plasmide und bilden das gewünschte verschmolzene Genprodukt, wie sich durch Elektrophorese mittels Polyacrylamidgel zeigen läßt.

Das erfindungsgemäß verwendete Repressorgen λ cI857 ist temperaturempfindlich und wird bei Temperaturen von 38 bis 44°C oder darüber inaktiviert. Eine Temperaturverschiebung auf 38 bis 44°C führt daher zu einer Lyse der Zellen durch Einleitung des lytischen Kreislaufs des λ Prophagen, welches erfindungsgemäß in den Wirtszellenstamm eingeführt worden ist. Bei Verwendung eines temperaturempfindlichen Repressors, der einen letalen oder möglicherweise letalen Präger ausdrückt, welcher eine Wirtszellenlyse hervorruft, und bei Züchtung der Wirtszellen bei einer Temperatur, die den Repressor inaktiviert, und, im Falle eines möglicherweise letalen Prägers, bei einer Temperatur, die nicht innerhalb des Temperaturbereichs für eine zulässige Kultur der Wirtszellen liegt, ermöglicht die Erfindung selbstverständlich auch eine einfache, bequeme und wohlfeile Methode zur Lyse von Zellen für eine Reinigung intrazellulärer Produkte.

Eine weitere beispieismäßige Ausführungsform der oben erwähnten Methode zur Lyse rekombinierender DNA, die Wirtszellen enthält, besteht in einer Lysogenisierung der Wirtszellen mit einem lysogenen Organismus, der einen konditionell letalen Präger enthält, welcher eine Wirtszellenlyse verursacht, und in einer Züchtung der Wirtszellen unter restriktiven Bedingungen. Wiederum ein anderes Beispiel für diese Methode zur Lyse von Wirtszellen besteht in einer Transformierung der Wirtszellen mit einem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor, der einen konditionell letalen Präger enthält, welcher eine Lyse von Wirtszellen verursacht, und in einer Züchtung der transformierten Wirtszellen unter restriktiven Bedingungen. Die Züchtung der Wirtszellen unter restriktiven Bedingungen läßt sich während des Züchtungsverfahrens ohne weiteres zu irgendeiner Zeit durchführen, zu der man eine Lyse von Wirtszellen haben möchte.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung macht Gebrauch von einem von einem Plasmid getragenen Gen, zur Repression eines letalen chromosomalen Prägers. Die Selektion der Zellen ist unabhängig vom Replikon und ferner auch den anderen Genen am Plasmid. Bei der vorliegenden beschriebenen Ausführungsform wird zwar vom bakteriophagen Gen $\lambda cI857$ Gebrauch gemacht, es kann statt dessen jedoch auch irgendein anderes Gen λcI verwendet werden, das einen funktionellen Repressor bildet. Ferner kann man auch sonstige Repressorgene, beispielsweise das Gen λcro einsetzen, da dieses Gen obigen Ausführungen zufolge einen Repressor bildet, der die Funktion des Repressors cI übernehmen kann. Das zur Erläuterung der Erfindung verwendete Prophag trägt eine Mutation $\lambda cI90$ und bildet daher keine funktionellen Repressor λcI . Es können auch andere Mutanten des Bakteriophagen λ verwendet werden, falls sie ebenfalls kein funktionelles Gen cI oder keinen Repressor enthalten. Selbstverständlich braucht man bei Verwendung solcher Mutanten dann eine an-

dere Repressorquelle, um den lysogenen Zustand beizubehalten.

Das erfindungsgemäße selektive System kann auf Wirtszellen angewandt werden, die Plasmide mit Genen enthalten, welche für eine Expression der verschiedensten brauchbaren Produkte sorgen. Das von einem Plasmid getragene Gen kann beispielsweise ein natürlich vorkommendes Gen, ein nichtnatürlich vorkommendes Gen oder ein Gen sein, das teilweise natürlich und teilweise synthetisch oder nichtnatürlich vorkommt. Von der Erfindung kann insbesondere Gebrauch gemacht werden zur Auswahl und Haltung von Zellen, die ein von einem Plasmid getragenes Gen enthalten, welches den Code bildet für Humanpräproinsulin, Humanproinsulin, Humaninsulin-A-Kette, Humaninsulin-B-Kette, Humanwachstumshormon, Nichthumanwachstumshormon, Nichthumaninsulin, Humaninterferon, Nichthumaninterferon, Viralantigen, Urokinase, irgendein Peptidhormon, irgendein Enzym, irgendein Polypeptid oder praktisch jedes sonstige Gen, das in der Forschung und Technik von Bedeutung ist.

Bei den hierin beschriebenen speziellen Ausführungsformen der Erfindung ist die Plasmidreplikation oder die Expression des Genprodukts bestimmt vom Replikon aus pMB1 (Life Sci. 25, 807 bis 818 (1979)) und entweder vom lac-Promotor oder vom trp-Promotor. Andere Replikone und Promotoren können ebenfalls verwendet werden, sofern sie in *Escherichia coli* K12 funktionell und gegenüber dem jeweils verwendeten Repressor nicht empfindlich sind. Die Auswahl der Replikone und Promotoren, die in *Escherichia coli* K12 funktionell und gegenüber einem bestimmten Repressor nicht empfindlich sind, ist ohne weiteres möglich und liegt im Rahmen des fachmännischen Könnens. Zu Beispielen für andere Replikone gehören die Replikone von ColE1, NR1, RK2, RK6, pSC101, RP1, RP4, F und dergleichen unter Einschluß

von Bakteriophag, das in *Escherichia coli* K12 repliziert. Zu Beispielen für andere Promotoren gehören der Bakteriophage λ_{P_L} -Promotor, Lipoproteinpromotor, Ribosomalprotein oder RNA-Promotoren und praktisch auch alle sonstigen Promotoren. Selbstverständlich lassen sich auch noch andere Replikone und Promotoren konstruieren, was für den Fachmann keinerlei Probleme bereitet.

Die obigen Ausführungen zeigen, daß durch Verwendung eines letalen chromosomalen Trägers, den man durch Repression von einem plasmidgetragenen Gen erhält, ein Verfahren zur Selektierung und Aufrechterhaltung einer plasmidhaltigen Bakterienpopulation bereitgestellt wird. Es sind die verschiedensten Ausführungsformen dieses Verfahrens möglich. Anstelle des Bakteriophagen λ kann man beispielsweise auch verschiedene andere Bakteriophagen verwenden, und es können auch andere Klassen an letalen Mutationen angewandt werden, sofern sich hierdurch eine Repression durch ein plasmidgetragenes Gen ergibt. Zu Beispielen für letale Mutationen, die erfindungsgemäß brauchbar sind, gehören beispielsweise folgende: Chromosomale DNA-Replikation, Zellwandsynthese, Ribosomfunktion, RNA-Polymerase, tRNA-Synthese und -Modifikation, Aminoacyl-tRNA-synthetase, DNA-Restriktion und -Modifikation sowie Zellteilungsmutationen. Andere letale Mutationen bieten sich dem Fachmann von selbst an.

Manche Klassen an letalen Mutationen, die als konditionelle letale Mutationen bezeichnet werden, erhält man lediglich durch Expression unter restriktiven Bedingungen, beispielsweise bei erhöhter Temperatur. Solche Mutationen lassen sich isolieren und sind bei Expression gegenüber Zellen letal, während sie unter bestimmten zulässigen Züchtungsbedingungen keine Expression oder Letalität ergeben. Der erfindungsgemäße Zellsuicid läßt sich unter restrikti-

ven Bedingungen auf jede konditionelle letale Mutation anwenden, solange ein Plasmid oder ein sonstiger rekombinierender DNA-Klonierungsvektor einen geeigneten Repressor trägt, der unter restriktiven Bedingungen funktionell ist. Eine solche Mutation wird nicht wiederum konditionell letal, sofern das Plasmid oder der sonstige rekombinierende DNA-Klonierungsvektor nicht verlorengeht.

Widersinnige Mutationen oder Repressoren stellen eine spezielle Klasse von Genen dar, die zur Erläuterung der erfindungsgemäß erzielbaren Stabilisierung und Selektierung herangezogen werden kann. Unter einer widersinnigen Mutation wird eine Grundsubstitution oder eine Rahmenverschiebungsmutation verstanden, die zu einer Umwandlung eines eine Aminosäure spezifizierenden Codons in ein kettenendständiges Codon führt. Widersinnige Mutationen haben demzufolge einen vorzeitigen Abschluß einer Polypeptidkette an einer Stelle zur Folge, an der das widersinnige Codon in der als Bote dienenden Ribonucleinsäure (mRNA) auftritt. Ein widersinniger Repressor ist ein Gen, das die Insertion einer Aminosäure in die wachsende Polypeptidkette in Antwort auf ein widersinniges Codon ermöglicht. In Abwesenheit eines solchen widersinnigen Repressors kommt es durch eine widersinnige Mutation zu einem Abschluß des Polypeptids. Zur weiteren Erläuterung der Erfindung kann man eine letale widersinnige Mutation in ein Chromosom einer transformierten Wirtszelle einführen, wenn ein geeigneter widersinniger Repressor auf den rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor innerhalb der Wirtszelle geklont wird. Auf diese Weise wird ein genetisches Gleichgewicht aufrechterhalten, sofern der rekombinierende DNA-Klonierungsvektor nicht verlorengeht, da die Wirtszelle dann abstirbt und sich selbst zerstört.

Die Fülle an genetischer und biochemischer Information

über *Escherichia coli* K12 macht diesen Organismus erfindungsgemäß als Wirtszelle besonders geeignet. Die Erfindung ist jedoch nicht auf irgendeinen Genus, eine Spezies oder einen Stamm beschränkt, sondern sie läßt sich auf alle Organismen anwenden, wo letale Mutationen und Repressoren verfügbar sind oder isoliert oder konstruiert werden können. Die Erfindung läßt sich daher beispielsweise anwenden auf Prokaryotes, einer Züchtung zugängliche freilebende Eukaryotes und insbesondere Bakterien, wie beispielsweise *Bacillus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Actinomycetes*, *Streptomyces*, *Serratia*, *Agrobacterium* oder *Pseudomonas*, Pilze, wie beispielsweise *Neurospora*, *Cephalosporium*, *Aspergillus* oder *Penicillium*, Hefen und Zellen, die einer Züchtung zugänglich sind, welche abgeleitet sind von Gewebe multizellulärer Organismen unter Einschluß von Chordata, Mammalia, Aves, Amphibia oder Reptilia, oder von Pflanzen.

Alle Ausführungsformen der Erfindung haben das gemeinsame Merkmal, daß sie gegenüber der Zusammensetzung der Medien unempfindlich sind. Die Erfindung ermöglicht zur Verbesserung der Produktivität daher einen breiten Bereich an Fermentationsmanipulation.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung wird anhand folgender Beispiele, welche bevorzugte Ausführungsformen zeigen, weiter erläutert. Gegebenenfalls wird darin sowohl eine Erklärung als auch eine tatsächliche Beschreibung der angewandten Maßnahmen angegeben.

B e i s p i e l 1

Aufbau von Rekombinationsplasmid pAR2

Die verschiedenen Restriktionsstellen BglII im Bakteriophagen λ CI857 und die einzige Restriktionsstelle BamHI im Plasmid pIA2 erlauben die Klonierung von Bakteriophagfragmenten zum Klonierungsvektor pIA2. Das Bakteriophag λ CI857 enthält sechs Stellen, die gegenüber BglII empfindlich sind. Eines der Fragmente BglII enthält 2,5 Kb unter Einschluß des Gens λ CI und ferner auch des Gens λ rex (Gene, 217 bis 280 (1979) und Genetic Maps, Band 1 (1980) NIH). Die Fragmente BglII enthalten Extensionen 5' mit der Sequenz GATC, die identisch und komplementär sind zu den Extensionen 5' an den Fragmenten BamHI. Das Humaninsulinplasmid pIA2 enthält 11,0 Kb unter Einschluß einer einzigen Stelle, die durch BamHI gespalten wird. Eine Klonierung an der Stelle BamHI inaktiviert das Resistenzgen Tc, das am pIA2 getragen wird. Durch Ligation der Fragmente BglII und der Fragmente BamHI entstehen Rekombinanten mit den Sequenzen

AGATCC oder GGATCT
TCTAGG oder CCTAGA

an den Verbindungsstellen. Diese Sequenzen werden durch BglII oder BamHI nicht gespalten. Eine Restriktion mit beiden Enzymen führt daher zu einer Eliminierung aller Ligationsprodukte mit Ausnahme derjenigen, die an der Stelle BamHI von pIA2 ein Fragment λ BglII legiert enthalten.

Bei den verwendeten Restriktionsenzymen handelt es sich um im Handel erhältliche Materialien, die nach den Beschreibungen der jeweiligen Hersteller angewandt werden. Diese Restriktionsenzyme und die hierzu erforderlichen Beschreibungen sind über folgende Quellen zugänglich:

Bethesda Research Laboratories Inc., Box 6010, Rockville, Maryland 20850

Boehringer Mannheim Biochemicals, 7941 Castleway Drive,
P.O. Box 50816, Indianapolis, Indiana 46250
Research Products, Miles Laboratories Inc., Elkhart, In-
diana 46515.

Rekombinierende DNA-Moleküle werden mit Ligase T4 DNA in
0,10 ml eines Reaktionsgemisches gebildet, das $3,0 \times 10^{-13}$
Mol an restriktiertem Vektor und $6,0 \times 10^{-13}$ Mol an Re-
striktionsfragmenten von Bakteriophag λ enthält. Weitere
und vollständigere Reaktionsbedingungen gehen aus J.Bac-
teriol. 121, 354 bis 362 (1975) hervor.

B e i s p i e l 2

Transformation von Rekombinationsplasmid pAR2 zu Escheri-
chia coli K12 C600R_K-M_K-

Frische, über Nacht gewachsene Kulturen von Escherichia co-
li K12 C600R_K-M_K- (Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 1030 bis 1034 (1974) unter-
teilt man in Subkulturen in einem Verhältnis von 1:10 in frischer L-
Brühe (Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor
Labs, Cold Spring Harbor, New York (1972) und läßt das Ganze dann 1,0 Std.
bei 37°C wachsen. Es werden insgesamt 660 Klett-Einhei-
ten an Zellen geerntet, die man mit 2,5 ml 100 mmolarer
Natriumchloridlösung wäscht, in 150 mmolarer Calciumchlo-
ridlösung mit 10,0 % Glycerin suspendiert und 20 Minuten
bei Raumtemperatur bebrütet. Die Zellen werden durch Zentri-
fugieren geerntet, wieder in 0,5 ml Calciumchlorid-gly-
cerin suspendiert, 3 bis 5 Minuten auf Eis abgekühlt und
eingefroren. Die Zellsuspensionen werden bis zum Gebrauch
in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Durch diese Konservie-
rung und Aufbewahrung kommt es zu keiner Beeinträchtigung
der Lebensfähigkeit oder der Häufigkeit der Transformation
durch die kovalent geschlossene zirkulare DNA. Die Zellen
werden in einem Eisbad aufgetaut und in einem Verhältnis

von 0,1 ml Zellen auf 0,05 ml DNA (hergestellt gemäß Beispiel 1) mit einer Konzentration von 2,0 µg/ml vermischt. Die auf diese Weise gebildeten Proben werden 10,0 Minuten auf Eis gekühlt, worauf man sie mit 0,85 ml L-Brühe verdünnt, 2,0 Stunden bei 32°C bebrütet, auf L-Agar (Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Labs, Cold Spring Harbor, New York (1972)) mit 5×10^9 mol λ b2 ausbreitet und bei 32°C bebrütet. Die Transformanten werden bezüglich ihrer Immunität gegenüber dem Bakteriophagen λ b2 bei 32°C selektiert. Die Rekombinanten werden zum Nachweis ihrer Ap^r , Tc^s und λ b2-Immunität bei 32°C und ihrer λ b2-Sensitivität bei 42°C untersucht. Ein Transformant wird ausgewählt und als Escherichia coli K12 C600R_k-M_k-/pAR2 bezeichnet. Diese überlebende Kolonie wird bezüglich der erwarteten Phenotypen untersucht und zur Isolierung und Amplifizierung des aufgebauten rekombinanten Plasmids pAR2 verwendet.

Beispiel 3

Amplifizierung und Isolierung von Rekombinationsplasmid pAR2

Das Plasmid DNA von Escherichia coli K12 C600R_k-M_k-/pAR2 wird mit Chloramphenicol amplifiziert und isoliert durch das geklärte Lysatverfahren (J. Mol. Biol. 36, 185 bis 194 (1968)). Die erhaltene kovalent geschlossene zirkuläre DNA wird durch Äquilibrierungsuptrazentrifugierung in CsCl und Propidiumdiiodid gereinigt. Das Propidiumdiiodid wird mit 2-Propanol extrahiert und die DNA in CsCl bei -20°C aufbewahrt. Entsprechende Arbeitslösungen von DNA werden in SSC/10-Puffer (0,015 molar an NaCl, 0,0015 molar an Natriumcitrat, pH-Wert 7,0) durch Chromatographie über Sephadex-Säulen (PD10*) ausgetauscht.

* Pharmacia, 800 Centennial Ave, Piscataway, New Jersey 08851

B e i s p i e l 4

Transformation von Rekombinationsplasmid pAR2 zu Escherichia coli K12 RV308

Die Transformation von Rekombinationsplasmid pAR2 zu Escherichia coli K12 RV308 wird nach dem in Beispiel 2 beschriebenen Verfahren durchgeführt, mit der Ausnahme, daß man 300 mmolares Calciumchlorid verwendet. Entsprechende Proben werden mit 0,85 ml L-Brühe verdünnt, 2,0 Stunden bei 32° C bebrütet, auf L-Agar mit 5×10^9 Mol $\lambda b2$ ausgebreitet und bei 32° C bebrütet. Die überlebenden Kolonien werden bezüglich der erwarteten Phenotypen untersucht und bestehen in den gewünschten Transformanten von Escherichia coli K12 RV308/pAR2.

B e i s p i e l 5

Aufbau von Escherichia coli K12 RV308 $\lambda cI90$ /pAR2 durch Lyso-genisierung mit $\lambda cI90$

Man läßt Escherichia coli K12 RV308/pAR2 (hergestellt nach Beispiel 4) so lange bei 32° C wachsen, bis 35 Klett-Einheiten produziert sind, worauf man das Ganze 60,0 Minuten bei 45° C weiterbehandelt. Man infiziert die Zellen mit $\lambda cI90$ in einem Moe von 20 und bebrütet das Ganze dann 40 Minuten bei 45° C. Sodann läßt man Kolonien bei 32° C auf L-Agar wachsen, der 10 $\mu g/ml$ Ampicillin enthält. Die erhaltenen Kolonien von Escherichia coli K12 RV308 $\lambda cI90$ /pAR2 werden entsprechend untersucht, um das Wachstum bei 32° C und die Empfindlichkeit bei 42° C zu ermitteln.

B e i s p i e l 6

Aufbau von Rekombinationsplasmid pAR1

Die Restriktionsstellen EcoRI und BamHI im Bakteriophagen λ cI857 und im Plasmid pBR322 ermöglichen die Klonierung von Bakteriophagfragmenten auf den Klonierungsvektor pBR322. Man kauft entsprechende Restriktionsenzyme und setzt sie den Anweisungen des Herstellers entsprechend ein. Man entzieht daher Bakteriophag λ cI857 und Plasmid pBR322 jeweils einer Doppelbehandlung mit Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI. Etwa 528 μ g der auf diese Weise erzeugten und restriktierten λ cI857 DNA in 10 mM Tris-HCl mit einem pH-Wert von 8 inkubiert man mit 10000 Einheiten pro ml bakterieller alkalischer Phosphatase 30 Minuten bei 65°C. Die bakterielle alkalische Phosphatase führt zu einer Entfernung der endständigen Phosphatgruppen von den Restriktionsfragmenten des Bakteriophagen λ und verhindert hierdurch ihre gegenseitige Aneinanderbindung. Die Enzymbehandlung verhindert jedoch keine Ligation an nichtbehandelte DNA, wie beispielsweise an restriktiertes Plasmid pBR322.

Die mit Bakteriophag λ cI857 behandelte und restriktierte DNA wird durch Gleichgewichtszentrifugierung in CsCl und Propidiumdiodid gereinigt. Das Propidiumdiodid wird mit 2-Propanol extrahiert, und die DNA in CsCl bei minus 20°C aufbewahrt. Entsprechende Arbeitslösungen von DNA werden in SSC/10-Puffer (0,015 M NaCl, 0,0015 M Natriumcitrat, pH 7) durch Chromatographie über Sephadex-Säulen (PD 10) ausgetauscht.

Es werden entsprechende rekombinierende DNA-Moleküle mit T4-DNA-Ligase in 0,10 ml eines Reaktionsgemisches gebildet, das 2,2 μ g restriktiertem pBR322-Vektor und 3,8 μ g Restriktionsfragmente von Bakteriophag λ enthält. Weitere

und vollständigere Reaktionsbedingungen gehen aus J. Bacteriol. 121, 354-362 (1975) hervor.

Beispiel 7

Transformation von Rekombinationsplasmid pAR1 zu Escherichia coli K12 C600R_k-M_k-

Die Transformation von Plasmid pAR1 zu Escherichia coli K12 C600R_k-M_k- wird nach dem in Beispiel 2 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Der Repressor λ cro ist nicht temperaturempfindlich, so daß die Transformanten bezüglich ihrer Immunität gegenüber Bakteriophag λ b2 sowohl bei 32°C als auch bei 42°C selektiert werden. Die Rekombinanten werden zum Nachweis von Ap^r und Tc^S weiter untersucht, wobei einer der Transformanten ausgewählt und als Escherichia coli K12 C600R_k-M_k-/pAR1 bezeichnet wird. Diese überlebende Kolonie wird bezüglich der erwarteten Phenotypen untersucht und zur Isolierung und Amplifizierung des Rekombinationsplasmids pAR1 verwendet. Die Stufen der Isolierung und Amplifizierung werden nach dem in Beispiel 3 beschriebenen Verfahren durchgeführt.

Beispiel 8

Aufbau von Escherichia coli K12 RV308 δ cI90/pAR1 durch Lyso- genisierung mit λ cI90

Man läßt Escherichia coli K12 RV308/pAR1 (die Transformation des Plasmids pAR1 zu Escherichia coli K12 RV308 wird nach dem in Beispiel 4 beschriebenen Verfahren durchgeführt) so lange bei 32°C wachsen, bis 35 Klett-Einheiten gebildet sind, worauf man das Ganze 30,0 Minuten oder 60,0 Minuten bei 45°C überträgt. Sodann werden die Zellen mit λ cI90 unter einem Moe-Wert von 20 infiziert und hier-

auf 40 Minuten bei 45°C bebrütet. Man läßt entsprechende Kolonien bei 32°C auf L-Agar wachsen, der 10 µg/ml Ampicillin enthält. Die erhaltenen Kolonien von *Escherichia coli* K12 RV308λcI90/pAR1 untersucht man dann bezüglich des erwarteten Phenotyps, wodurch der Genotyp des aufgebauten Stamms bestätigt wird.

Beispiel 9

Aufbau von *Escherichia coli* K12 C600R_k-M_k-λcI857/pAR1 durch Transformation mit pAR1

Man macht *Escherichia coli* K12 C600R_k-M_k-λcI857 (aufgebaut nach der eingangs bereits beschriebenen Arbeit von Miller, 1972) leistungsfähig und transformiert das Ganze dann nach dem aus Beispiel 2 hervorgehenden Verfahren, mit der Ausnahme, daß man die Zellen statt bei 37°C bei 32°C wachsen läßt. Man läßt entsprechende Kolonien auf L-Agar wachsen, der 10 µg/ml Ampicillin enthält, und untersucht die hierdurch erhaltenen Kolonien von *Escherichia coli* K12 C600R_k-M_k-λcI857/pAR1 dann bezüglich des erwarteten Phenotyps, wodurch sich eine Bestätigung des Genotyps des gewünschten Stamms ergibt.

Beispiel 10

Aufbau von *Escherichia coli* K12 C600λcI90/pAR2

Der gewünschte Stamm wird praktisch nach den Angaben der Beispiele 1, 2 und 5 aufgebaut, mit der Ausnahme, daß man statt *Escherichia coli* K12 RV308 als Wirtsstamm *Escherichia coli* K12 C600 verwendet.

B e i s p i e l 11

Aufbau von Escherichia coli K12 C600 λ cI857/pAR1

Der gewünschte Stamm wird praktisch nach den Angaben der Beispiele 6, 7 und 9 aufgebaut, mit der Ausnahme, daß man anstelle von Escherichia coli K12 C600R_k-M_k- als Wirtstamm Escherichia coli K12 C600 verwendet.

B e i s p i e l 12

Verfahren zur Bestimmung der Stabilitäten von Wirtszellen, die Rekombinationsplasmide enthalten, und zwar mit oder ohne Selektion

Zur Ermittlung der Häufigkeit von Zellen, die die Plasmide enthalten, verwendet man das Gen Ap^r auf den Rekombinationsplasmiden. Reihenverdünnungen der jeweiligen Kultur verteilt man auf L-Agar und läßt sie darauf bei 32°C mit oder ohne 10 µg/ml Ampicillin wachsen. Die Häufigkeit der Zellen von Plasmid⁺ wird als Verhältnis aus den ampicillinresistenten Kolonien und der Gesamtanzahl an Kolonien, die auf L-Agar ohne Ampicillin wachsen, bestimmt. Wahlweise trägt man die Kolonien auf dem L-Agar auch doppelt auf L-Agar mit 10 µg/ml Ampicillin auf und läßt das Ganze bei 32°C wachsen. Die Häufigkeit der Zellen von Plasmid⁺ wird in diesem Fall als das Verhältnis aus den ampicillinresistenten Kolonien zu der Gesamtanzahl an Kolonien, die auf L-Agar ohne Ampicillin wachsen, angesehen.

B e i s p i e l 13

Aufbau von Plasmid pIA7 Δ 4 Δ 1

A. Aufbau von Plasmid pBRHtrp

Das Plasmid pGM1 trägt den Escherichia coli Tryptophan-

operon, der die Auslöschung Δ LE1413 (J. Bacteriology 1457 bis 1466 (1978)) enthält und somit eine Expression eines Fusionsproteins ergibt, das die ersten sechs Aminosäuren der trp-Leitstruktur und etwa das letzte Drittel des Polypeptids trp E (welches in Verbindung als LE' bezeichnet wird) sowie ferner auch das Polypeptid trp D in seiner Gesamtheit enthält, und zwar alles unter der Kontrolle des trp-Promotor-Operator-Systems. Escherichia coli K12 W3110tna2trp Δ 102/pGM1 ist bei der American Type Culture Collection (ATCC Nr. 31622) hinterlegt worden, und pGM1 lässt sich in herkömmlicher Weise von dem Stamm entfernen und dann bei den im folgenden beschriebenen Verfahren verwenden.

Es werden etwa 20 μ g des Plasmids von dem Restriktionsenzym PvuII verbraucht, das das Plasmid an fünf Stellen spaltet. Sodann kombiniert man die Genfragmente mit EcoRI-Verknüpfern (die aus einem selbstkomplementären Oligonucleotid der Sequenz pCATGAATTCATG bestehen), wodurch sich eine EcoRI-Spaltstelle für eine spätere Klonierung zu einem Plasmid ergibt, das eine Stelle EcoRI enthält. Die aus pGM1 erhaltenen 20 μ g DNA-Fragmente behandelt man mit 10 Einheiten T_4 -DNA-Ligase in Gegenwart von 200 Picomol des in Stellung 5' phosphorylierten synthetischen Oligonucleotids pCATGAATTCATG und in 20 μ l T_4 -DNA-Ligasepuffer (20 mM Tris, pH 7,6, 0,5 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM Dithiothreitol) über Nacht bei 4°C. Sodann erhitzt man die Lösung zum Anhalten der Ligation 10 Minuten auf 70°C. Die Verknüpfere werden durch Verbrauch von EcoRI gespalten und die Fragmente, welche jetzt Enden von EcoRI aufweisen, werden durch Elektrophorese mittels 5 %-igem Polyacrylamidgel (die im folgenden einfach als PAGE bezeichnet wird) aufgetrennt. Die drei größten Fragmente werden vom Gel isoliert, indem man dieses zuerst mit Ethidiumbromid anfärbt und die Stellung der Fragmente mit Ultraviolett-

licht sichtbar macht und die interessanten Teile vom Gel ausschneidet. Jedes Gelfragment wird dann zusammen mit 300 µl 0,1 x TBE in einen Dialyseschlauch gegeben und einer Elektrophorese bei 100 V über eine Zeitdauer von 1 Stunde in 0,1 x TBE-Puffer unterzogen (der TBE-Puffer enthält 10,8 g Trisbase, 5,5 g Borsäure, 0,09 g Na₂EDTA in 1 Liter H₂O). Die wässrige Lösung wird aus dem Dialyseschlauch entnommen, mit Phenol extrahiert, mit Chloroform extrahiert und auf eine Natriumchloridmolarität von 0,2 eingestellt. Nach Ausfällung in Ethanol wird die DNA in Wasser gewonnen. Das trp-Promotor/Operator enthaltende Gen mit EcoRI-Enden wird nach folgendem Verfahren identifiziert, das die Insertion von Fragmenten in ein tetracyclinempfindliches Plasmid beinhaltet, welches nach Promotor/Operator-Insertion tetracyclinresistent wird. Alle im folgenden beschriebenen DNA-Fragmentisolierungen werden unter Verwendung von PAGE nach der oben beschriebenen Elektroelutionsmethode durchgeführt.

B. Aufbau von Plasmid pBRH trp Expressionstetracyclinresistenz unter der Kontrolle des trp-Promotors/Operators und Identifizierung sowie Amplifizierung des trp-Promotor/Operator enthaltenden DNA-Fragments, welches nach obiger Stufe A. isoliert worden ist

Plasmid pBRH1 (Nucleic Acids Research 6, 3267 bis 3287 (1979)) ergibt eine Expression von Ampicillinresistenz und enthält das Gen für Tetracyclinresistenz, führt jedoch zu keiner Expression dieser Resistenz, weil mit ihm kein Promotor verbunden ist. Das Plasmid ist demnach tetracyclinsensitiv. Durch Einführung eines Promotor/Operator-Systems in die Stelle EcoRI kann dieses Plasmid tetracyclinresistent gemacht werden.

Plasmid pBRH1 wird von EcoRI verdaut. Das Enzym wird durch Phenolextraktion und anschließende Chloroformextrak-

tion entfernt, worauf man die DNA in Wasser nach Ethanol-fällung gewinnt. Das erhaltene DNA-Molekül wird in getrennten Reaktionsgemischen mit jeweils den drei DNA-Fragmenten vereinigt, die man nach obigem Beispiel 13 A. erhält, und in der beschriebenen Weise mit T_4 -DNA-Ligase verknüpft. Die im Reaktionsgemisch vorhandene DNA wird zur Umwandlung von leistungsfähigem *Escherichia coli* K12 Stamm 294 (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 4147 bis 4198 (1976), ATCC Nr. 31448) unter Anwendung üblicher Techniken (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 3455 bis 3459 (1974) verwendet, und die Bakterien werden dann auf LB-Platten (Miller, 1972) aufgezogen, die 20 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und 5 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin enthalten.

Es werden mehrere tetracyclinresistente Kolonien selektiert, und das Plasmid DNA wird isoliert und als Plasmid pBRHtrp bestimmt. Die Anwesenheit des gewünschten Fragments wird durch Restriktionsenzymanalyse bestätigt. Das Plasmid pBRHtrp ergibt eine Expression von β -Lactamase, verleiht Ampicillin Resistenz und enthält ein DNA-Fragment, welches den trp-Promotor/Operator enthält. Das DNA-Fragment codiert ferner ein erstes Protein (welches als LE' bezeichnet wird), das aus einer Verschmelzung der ersten sechs Aminosäuren des trp-Leiters und etwa dem letzten Drittel des Polypeptids trp E besteht, und es ergibt auch eine Codierung für ein zweites Protein (welches als D' bezeichnet wird), das etwa der ersten Hälfte des Polypeptids trp D entspricht, sowie eine Codierung eines dritten Proteins, das durch das tetracyclinresistente Gen codiert ist.

C. Aufbau von Plasmid pSOM7A2

Das Plasmid pBRHtrp wird durch das Restriktionsenzym EcoRI verdaut, und das hierdurch erhaltene Fragment vereinigt man nach Isolierung durch PAGE und Elektroelution mit EcoRI-ver-

daudem Plasmid pSOM11 (Sci. 198, 1056 (1977), GB-OS 2 007 676A). Das Gemisch wird mit T_4 -DNA-Ligase verknüpft, und die erhaltene DNA in der oben beschriebenen Weise zu *Escherichia coli* K12 Stamm 294 transformiert. Auf Ampicillinhaltigen Platten werden Transformationsbakterien selektiert, und die erhaltenen Ampicillinresistenten Kolonien werden durch Koloniehybridisierung einem Screening unterzogen (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 3951 bis 3965 (1975)). Das trp-Promotor/Operator enthaltende Fragment wird nach Isolierung aus pBRH trp und anschließender radioaktiver Markierung mittels p^{32} als Probe bei obigem Verfahren verwendet. In der Koloniehybridisierung erweisen sich mehrere Kolonien als positiv, und diese werden daher ausgewählt. Das Plasmid DNA wird isoliert, und die Orientierung der inserierten Fragmente bestimmt man durch Restriktionsanalyse unter Verwendung der Enzyme BglII und BamHI bei der sogenannten Doppelverdauung. Kolonien, die das gewünschte Plasmid mit dem trp-Promotor/Operator-Fragment in der geeigneten Orientierung enthalten, läßt man in LB-Medium (Miller, 1972) wachsen, welches 10 μ g/ml Ampicillin enthält. Das gewünschte Plasmid wird als pSOM7 Δ 2 bezeichnet und für den im folgenden beschriebenen Aufbau verwendet.

D. Aufbau von Plasmid pTrp24

1. Aufbau eines Genfragments, welches Codone für die Distalbereiche des LE'-Polypeptids mit Restriktionsstellen BglII oder EcoRI an den Enden 5' oder 3' des Codierungsstrangs enthalten

Das Plasmid pSOM7 Δ 2 wird unter solchen Bedingungen zuerst durch HindIII und dann durch λ -Exonuclease (eine 5'- bis 3'-Exonuclease) unter solchen Bedingungen verdaut, daß sich eine Verdauung ergibt, welche bis hinter die Restriktionsstelle BglII innerhalb der LE'-Codierungsregion reicht. Man

löst etwa 20 µg HindIII-verdautes pSOM7Δ2 in einem Puffer (20 mM Glycinpuffer, pH 9,6, 1 mM MgCl₂, 1 mM β-Mercaptoethanol). Das erhaltene Gemisch wird 60 Minuten bei Raumtemperatur mit fünf Einheiten λ-Exonuclease behandelt. Sodann extrahiert man das Gemisch mit Phenol sowie mit Chloroform und fällt das Ganze dann mittels Ethanol.

Zur Bildung eines Rests EcoRI am distalen Ende des LE'-Genfragments synthetisiert man einen Primer ³²pCCTGTGCATGAT nach der verbesserten Phosphotriestermethode (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 5765 (1978)) und hybridisiert das Ganze dann zum einsträngigen Ende des LE'-Genfragments, das man durch λ-Exonucleaseverdauung erhält. Die Hybridisierung wird durchgeführt, indem man 20 µg des mit λ-Exonuclease behandelten Verdauungsprodukts HindIII von Plasmid pSOM7Δ2 in 20 µl H₂O löst und die Lösung mit 6 µl einer Lösung vereinigt, die etwa 80 Picomol des oben beschriebenen und in Stellung 5' phosphorylierten Oligonucleotids enthält. Das synthetische Fragment wird zum 3'-Ende der LE'-Codierungssequenz hybridisiert, und der zurückbleibende einsträngige Anteil des LE'-Fragments wird durch Klenow-Polymerase I unter Verwendung von dATP, dTTP, dGTP und dCTP eingefüllt. Bei der Klenow-Polymerase I handelt es sich um das Fragment, das man durch proteolytische Spaltung von DNA-Polymerase I erhält. Es enthält die Polymerisierungsaktivität 5' → 3', die exonucleolytische Aktivität 3' → 5', jedoch nicht die exonucleolytische Aktivität 5' → 3' des Stammenzym (Kornberg, 1974, W.H. Freeman and Co., SFO, 98).

Man erwärmt das Reaktionsgemisch auf 50° C, läßt es dann langsam auf 10° C abkühlen und gibt anschließend 4 µl des Klenow-Enzyms zu. Nach 15 Minuten langer Inkubation bei Raumtemperatur und 30 Minuten langer Inkubation bei 37° C wird die Reaktion durch Zugabe von 5 µl 0,25 molarer EDTA unterbrochen. Das Reaktionsgemisch wird mit Phenol extra-

hiert, mit Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Sodann wird die DNA mit dem Restriktionsenzym BglII gespalten, worauf man die Fragmente mittels PAGE abtrennt. Ein unter Verwendung des Gels erhaltenes Autoradiogramm ergibt ein mit P^{32} markiertes Fragment der erwarteten Länge von etwa 470 bP, welches man durch Elektroelution gewinnt. Dieses Fragment LE' (d) hat ein Endstück BglII sowie ein blankes Ende, das mit dem Beginn des Primers zusammenfällt.

2. Aufbau von Plasmid pTh α 1

Der Aufbau von Plasmid pTh α 1 erfolgt durch Insertion eines synthetisierten Gens für Thymosin α 1 in Plasmid pBR322. Die Synthese des DNA-codierenden Thymosin α 1 besteht in einer Synthese und anschließenden Ligation der 16 Oligonucleotide (T_1 bis T_{16}), die durch die doppelköpfigen Pfeile in Fig. 7 der Zeichnung angegeben sind. Am N-terminalen Ende wird ein Met-Codon ATG inseriert, und die Enden 5' sind mit einsträngigen kohäsiven Endstücken versehen, um auf diese Weise eine Bindung an Plasmide zu erleichtern, die mit EcoRI und BamHI gespalten werden. Die Stelle BglII im Zentrum des Gens trägt zur Analyse der Rekombinationsplasmide bei.

Die Oligodesoxyribonucleotide T_1 bis T_{16} werden unter Verwendung der modifizierten Phosphotriestermethode unter Einsatz vollständig geschützter Aufbaublöcke für Tridesoxyribonucleotide synthetisiert (Science 198, 1056 (1977)). Die verschiedenen Oligodesoxyribonucleotide gehen aus der folgenden Tabelle I hervor.

TABELLE ISynthetische Oligonucleotide für Thymosin α 1-Gene

| Verbindung | Sequenz | Länge | Verweilzeit in der HPLC-Analyse (min) * |
|------------|-------------------------------|-------|---|
| T 1 | A-A-T-T-C-A-T-G-C-C | 10 | 17,4 |
| T 2 | T-G-A-T-G-C-T-G-C-T-G-T-T-G-A | 15 | 24,3 |
| T 3 | T-A-C-T-T-C-T-T-C-T-G-A | 12 | 20,3 |
| T 4 | G-A-T-T-A-C-T-A-C-T-A-A-A | 13 | 22,0 |
| T 5 | G-C-A-G-C-A-T-C-A-G-A-C-A-T-G | 15 | 24,8 |
| T 6 | G-A-A-G-T-A-T-C-A-A-C-A | 12 | 20,1 |
| T 7 | A-G-T-A-A-T-C-T-C-A-G-A-A | 13 | 22,6 |
| T 8 | A-A-G-A-T-C-T-T-T-A-G-T | 12 | 20,2 |
| T 9 | G-A-T-C-T-T-A-A-G-G-A-G | 12 | 20,4 |
| T 10 | A-A-G-A-A-G-G-A-A-G-T-T | 12 | 21,1 |
| T 11 | G-T-C-G-A-A-G-A-G-G-C-T | 12 | 20,5 |
| T 12 | G-A-G-A-A-C-T-A-A-T-A-G | 12 | 20,4 |
| T 13 | C-T-T-C-T-T-C-T-C-C-T-T | 12 | 19,9 |
| T 14 | T-T-C-G-A-C-A-A-C-T-T-C | 12 | 20,5 |
| T 15 | G-T-T-C-T-C-A-G-C-C-T-C | 12 | 20,2 |
| T 16 | G-A-T-C-C-T-A-T-T-A | 10 | 17,2 |

* Bei Umgebungstemperatur

Ein Beispiel für die obige Synthese ist das folgende Verfahren zur Herstellung des Fragments T_{15} , welches in Fig. 8 der Zeichnung zusammengefaßt ist. Verschiedene Nucleotidfragmente, die zur Synthese des Fragments T_{15} verwendet werden, sind in dieser Fig. 8 numerisch bezeichnet.

Die darin enthaltenen Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

TPSTe = 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonyltetrazol

BSA = Benzolsulfonsäure

TLC = Dünnschichtchromatographie

HPLC = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

DMT = 4,4'-Dimethoxytrityl

CE = 2-Cyanoethyl

R = p-Chlorphenyl

Bz = Benzoyl

An = Anisoyl

iBu = Isobutyl

Py = Pyridin

AcOH = Essigsäure und

Et₃N = Triethylamin.

Die vollständig geschützten Tridesoxyribonucleotide 4 (85 mg, 0,05 mMol) und 2 (180 mg, 0,1 mMol) werden an ihren Hydroxygruppen in Stellung 5' von den Schutzgruppen befreit, indem man sie 10 Minuten bei 0°C mit 2 % BSA in 7:3 (V/V) Chloroform/Methanol (10 und 20 ml) behandelt. Die Reaktionen werden durch Zugabe von gesättigtem wäßrigem Ammoniumbicarbonat (2 ml) unterbrochen, worauf man das Ganze mit Chloroform (25 ml) extrahiert und mit Wasser (2 x 10 ml) wäscht. Die organischen Schichten werden getrocknet (Magnesiumsulfat), auf geringe Volumina (etwa 5 ml) eingeengt und durch Zugabe von Petrolether (Siedebereich 35 bis 60°C) gefällt. Die farblosen Niederschläge werden abzentrifugiert und unter Vakuum in einem Exsiccator getrocknet, wodurch man zu den Produkten 6 oder 8 gelangt, und zwar in Form homogener Substanzen nach dünnschichtchromatographischer Aufarbei-

tung mittels Silicagel (Merck 60 F254, Chloroform/Methanol, 9:1).

Die Trimeren 1 und 3 (270 mg, 0,15 mMol oder 145 mg, 0,075 mMol) werden in die entsprechenden Phosphodiester (5 und 7) überführt, indem man sie 25 Minuten bei Umgebungstemperatur mit Triethylamin/Pyridin/Wasser (1:3:1, V/V, 10 ml) behandelt. Die Reagenzien werden auf einem Rotationsverdampfer entfernt und die Rückstände durch wiederholte Verdampfung mit wasserfreiem Pyridin (3 x 10 ml) getrocknet. Man vereinigt das Trimere 8 (0,05 mMol) und das Trimere 7 mit TPSTe (50 mg, 0,15 mMol) in wasserfreiem Pyridin (3 ml) und läßt das Reaktionsgemisch unter Vakuum 2 Stunden bei Umgebungstemperatur stehen. Eine entsprechende dünnenschichtchromatographische Analyse zeigt, daß 95 % des Trimeren 8 zum hexameren Produkt umgewandelt worden sind (was durch Detektion der DMT-Gruppe durch Besprühen mit 10 %-iger wäßriger Schwefelsäure und Erwärmen auf 60°C sichtbar gemacht wird). Die Reaktion wird durch Zugabe von Wasser (1,0 ml) unterbrochen und das Lösungsmittel unter verringertem Druck entfernt. Nach Entfernung des Pyridins durch gleichzeitige Verdampfung mit Toluol spaltet man die Schutzgruppe des Hexamers in Stellung 5' mit 2 % BSA (8 ml) in der oben für die Trimeren 4 und 2, beschriebenen Weise ab. Das hierdurch erhaltene Produkt (10) wird auf einer mit Silicagel gefüllten Säule (Merck 60 H, 3,5 x 5 cm) durch stufenweise Gradientenelution mit Chloroform/Methanol (98:2 bis 95:5, V/V) gereinigt. Die das Produkt 10 enthaltenden Fraktionen werden zur Trockne eingedampft.

In ähnlicher Weise kuppelt man auch das Trimere 5 zum Trimeren 6 und reinigt das vollständig geschützte Produkt direkt über Silicagel. Diese Verbindung wird dann in der oben beschriebenen Weise in Stellung 3' durch Behandeln mit Triethylamin/Pyridin/Wasser von der Schutzgruppe be-

freit, wodurch man zum Fragment 9 gelangt.

Schließlich kuppelt man die Hexameren 9 und 10 in wasserfreiem Pyridin (2 ml) mit TPSTe (75 mg, 0,225 mMol) als Kondensationsmittel. Nach Beendigung (4 Stunden bei Umgebungstemperatur) wird das Gemisch auf einem Rotationsverdampfer verdampft und der Rückstand über Silicagel chromatographiert. Das durch Fällung mit Petrolether erhaltene Produkt 11 (160 mg) erscheint im Dünnschichtchromatogramm homogen. Ein Teil der Verbindung 11 (20 mg) in Pyridin (0,5 ml) wird durch Behandlung mit konzentriertem Ammoniumhydroxid (7 ml, 8 Stunden, 60°C) und nachfolgende Behandlung in 80 %-iger Essigsäure (15 Minuten, Umgebungstemperatur) vollständig von den Schutzgruppen befreit. Der nach Verdampfen der Essigsäure erhaltene feste Rückstand wird in 4 %igem wässrigem Ammoniumhydroxid (V/V, 4 ml) gelöst und die Lösung mit Ethylether (3 x 2 ml) extrahiert. Die wässrige Schicht wird auf 1 bis 2 ml eingengt, und einen Teil dieses Konzentrats unterzieht man dann zur Reinigung der erhaltenen Verbindung 12 einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie. Die dem überwiegenden Maximum entsprechenden Fraktionen werden zusammengefaßt (etwa 2,0 Einheiten mit einem Außendurchmesser von 254) und auf etwa 5 ml eingengt. Das erhaltene Endprodukt 12 wird unter Verwendung von Biogel P2 (1,5 x 100 cm) unter Elution mit 20 %-igem wässrigem Ethanol von Salz befreit, worauf man das Eluat zur Trockne eindampft und den Rückstand wieder in Wasser (200 µl) eluiert, wodurch man zu einer Lösung von $A_{254} = 10$ gelangt. Die Sequenz der Verbindung 12 wird durch zweidimensionale Sequenzanalyse bestätigt.

Das vollständige Gen Thymosin α 1 wird von den 16 synthetischen Oligonucleotiden unter Anwendung der Methoden gesammelt, wie sie vorher im einzelnen für Somatostatin

(Sci. 198, 1056 (1977)), Insulin (Proc. Nat. Acad. Sci. 76, 106 bis 110 (1979)) und Wachstumshormon (Nature, 281, 544 (1979)) im einzelnen beschrieben worden sind. Jeweils 10 µg der Oligonucleotide T₁₂ bis T₁₅ phosphoryliert man quantitativ mit [γ-³²P]-ATP (New England Nuclear) in Gegenwart von T₄-Polynucleotidkinase (Proc. Nat. Acad. Sci. 76, 106 bis 110 (1979)), wodurch man zu spezifischen Aktivitäten von etwa 1 Ci/mMol gelangt. Radioaktiv markierte Fragmente werden durch Elektrophorese mittels eines Gels aus 20 % Polyacrylamid und 7 Mol Harnstoff gereinigt, und die Sequenzen der eluierten Fragmente bestimmt man durch zweidimensionale Elektrophorese und Homochromatographie (Nucleic Acids Res. 1, 331 (1974)) von Partialschneckenvenomverdauungsprodukten. Die Fragmente T₁ und T₁₆ werden unphosphoryliert belassen, um eine unerwünschte Polymerisation während nachfolgender Ligationsreaktionen minimal zu halten. Diese Oligonucleotide (jeweils 2 µg) werden in vier Gruppen aus vier Fragmenten (siehe Fig. 9 der Zeichnung) durch T₄-DNA-Ligase unter Anwendung bekannter Methoden (Proc. Nat. Acad. Sci. 76, 106 bis 110 (1979)) zusammengefaßt. Die Reaktionsprodukte werden durch Gelelektrophorese auf einem 15 %-igen Polyacrylamidgel, das 7 Mol Harnstoff enthält (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 3455 (1977)), gereinigt. Die vier isolierten Produkte werden miteinander verbunden, und das Reaktionsgemisch wird durch Elektrophorese mittels 10 %-igem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die DNA im Größenbereich des Gens Thymosin-α 1 (90 bis 105 Grundpaare) wird elektroeluiert.

Das Plasmid pBR322 (0,5 µg) wird mit den Restriktionsendonucleasen BamHI und EcoRI behandelt, und die Fragmente werden durch Elektrophorese mittels Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das große Fragment wird vom Gel durch Elektroelution gewonnen und dann an die synthetische DNA (Nature

281, 544 (1979)) gebunden. Dieses Gemisch verwendet man dann zur Transformierung von *Escherichia coli* K12 Stamm 294, ATCC Nr. 31446. 5 % des Transformationsgemisches trägt man auf LB-Platten auf, die 20 µg/ml Ampicillin enthalten. Die vier erhaltenen und ampicillinresistenten Kolonien sind gegenüber Tetracyclin empfindlich, was auf eine Insertion in das tetracyclinresistente Gen hinweist. Eine Analyse der Plasmide aus diesen vier Kolonien zeigt, daß jeweils das Plasmid, welches als pTh α 1 bezeichnet wird, einmal (a) eine Stelle BglII enthält, die im pBR322 selbst nicht zu finden ist, was auf das Vorhandensein des Gens Thymosin- α 1 gemäß Fig. 7 hindeutet, und (b) zum anderen Mal ein Fragment mit etwa 105 Grundpaaren enthält, welches durch Spaltung BamHI/EcoRI gebildet wurde. Der Aufbauweg für das Plasmid pTh α 1 (welches nicht schematisch gezeigt ist) geht aus Fig. 9 der Zeichnung hervor, in der die starken Punkte für die Phosphatgruppen in Stellung 5' stehen.

3. Reaktion von behandeltem pTh α 1 und LE'(d)-Fragment

Das Plasmid pTh α 1 enthält eine Gen spezifizierende Ampicillinresistenz und ein Strukturgen spezifizierendes Thymosin- α 1, welches am Codierungsstrangende 5' in eine Stelle 5 und am Ende 3' in eine Stelle BamHI geklont ist. Das Thymosin-Gen enthält auch eine Stelle BglII. Zur Bildung eines Plasmids, das zur Aufnahme des in obiger Weise hergestellten LE'(d)-Fragments befähigt ist, wird das pTh α 1 durch EcoRI verdaut und dann durch Reaktion mit Klenow-Polymerase I mit dTTP und dATP umgesetzt, um hierdurch die Reste EcoRI stumpf zu machen. Durch BglII-Verdauung des erhaltenen Produkts ergibt sich ein lineares DNA-Fragment, welches das Gen für eine Ampicillinresistenz enthält und an seinen entgegengesetzten Enden einen klebrigen Rest BglII und ein stumpfes Ende aufweist. Das erhaltene Produkt läßt sich durch Umsetzung mit dem LE'(d)-Fragment, welches ein

klebriges Ende BglIII und ein stumpfes Ende aufweist, in Gegenwart von T_4 -Ligase rezirkulieren, wodurch man zu Plasmid pTrp24 gelangt. Durch diese Maßnahme wird wiederum eine Stelle EcoRI an der Stellung gebildet, an der es zu einer Ligation des stumpfen Endes kommt.

E. Aufbau von Plasmid pSOM7 Δ 2 Δ 4

Durch aufeinanderfolgende Verdauung von pTrp24 mit BglIII und EcoRI und anschließende PAGE sowie Elektroelution gelangt man zu einem Fragment, welches Codone für das LE'(d)-Polypeptid aufweist und über ein klebriges Ende BglIII sowie ein klebriges Ende EcoRI anschließend an das Codierende in Stellung 3' verfügt. Das LE'(d)-Fragment kann in die Stelle BglIII des Plasmids pSom7 Δ 2 geklont werden, wodurch sich ein LE'-Polypeptid/Somatostatin-Fusionsprotein ergibt, das unter der Kontrolle des Tryptophan-Promotors/Operators ausgedrückt wird. Hierzu braucht man (1) eine teilweise EcoRI-Verdauung von pSom7 Δ 2 zur Abspaltung der EcoRI-Stelle, die distal zum Tryptophan-Promotor/Operator angeordnet ist, und (2) eine geeignete Auswahl der Primersequenz für eine saubere Beibehaltung des Codonleserahmens und zur Neubildung einer Spaltstelle EcoRI.

Zu diesem Zweck verdünnt man 16 μ g Plasmid pSom7 Δ 2 in 200 μ l eines Puffers aus 20 mMol Tris, pH 7,5, 5 mMol $MgCl_2$, 0,02 NP40 Detergens und 100 mMol NaCl und behandelt das Ganze mit 0,5 Einheiten EcoRI. Nach 15 Minuten langer Umsetzung bei 37°C wird das Reaktionsgemisch mit Phenol extrahiert, mit Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt und dann mit BglIII verdaut. Das erhaltene größere Fragment wird durch das PAGE-Verfahren und durch anschließende Elektroelution isoliert. Dieses Fragment enthält die Codone "LE'(p)" für das proximale Ende des LE'-Polypeptids, nämlich für die Bausteine, die nach der Stelle BglIII folgen. Das Fragment wird dann an das

obige LE'(d)-Fragment in Gegenwart von T_4 -DNA-Ligase gebunden, wodurch man das Plasmid pSom7 Δ 2 Δ 4 erhält, dessen Transformation zu Escherichia coli Stamm 294 eine wirksame Bildung eines Fusionsproteins aus dem völlig rekonstituierten LE-Polypeptid und Somatostatin unter der Kontrolle des Tryptophan-Promotors/Operators ergibt.

F. Aufbau von linearer DNA mit einem Rest PstI am Ende 3' und einem Rest BglII am Ende 5' und einer Gen spezifizierenden Tetracyclinresistenz

Das Plasmid pBR322 wird mit HindIII verdaut, und die herausragenden Enden HindIII werden mit S1-Nuclease verdaut. Die Verdauung mit S1-Nuclease besteht in einer Behandlung von 10 μ g mit HindIII gespaltenem pBR322 in 30 μ l S1-Puffer (0,3 M NaCl, 1 mMol $ZnCl_2$, 25 mMol Natriumacetat, pH 4,5) mittels 300 Einheiten S1-Nuclease über eine Zeitdauer von 30 Minuten bei 15°C. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 μ l 30 x S1-Nuclease-Stopplösung (0,8 M Trisbase, 50 mMol EDTA) unterbrochen. Das Reaktionsgemisch wird mit Phenol extrahiert, mit Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt und dann in der oben beschriebenen Weise mit EcoRI verdaut. Das erhaltene Fragment, zu dem man nach dem oben beschriebenen PAGE-Verfahren unter anschließender Elektrolution gelangt, enthält ein klebriges Ende EcoRI und ein stumpfes Ende, dessen Codierungsstrang mit dem Nucleotid Thymin beginnt. Der durch S1 verdaute Rest HindIII, welcher mit Thymin beginnt, kann an einen mit Klenow-Polymerase I behandelten Rest BglII gebunden werden, um hierdurch nach erfolgter Ligation die Restriktionsstelle BglII wieder zu bilden.

Das nach Beispiel 13 C. hergestellte Plasmid pSOM7 Δ 2 wird daher mit BglII verdaut, und die erhaltenen klebrigen Enden BglII werden durch Behandlung mit Klenow-Polymerase I unter Verwendung aller vier Desoxynucleotidtriphosphate

doppelstranging gemacht. Die Spaltung des erhaltenen Produkts mittels EcoRI unter anschließender PAGE und Elektroelution des kleinen Fragments ergibt ein lineares Stück von DNA, das den Tryptophan-Promotor/Operator enthält und die LE'-Proximalsequenz aufwärts von der Stelle BglII ("LE'(p)") codiert. Das Produkt hat ein Ende EcoRI und ein stumpfes Ende, das von einer Füllung an der Stelle BglII herrührt. Die Stelle BglII wird jedoch durch Ligation des stumpfen Endes an das stumpfe Ende des obigen und mit S1 verdauten Fragments HindIII wieder hergestellt. Auf diese Weise werden die beiden Fragmente in Gegenwart von T_4 -DNA-Ligase unter Bildung des rezirkularisierten Plasmids pHKY10 aneinander gebunden, das durch Transformation zu Zellstämmen 294 von Escherichia coli propagiert wird. Die tetracyclinresistenten Zellen, die das Rekombinationsplasmid pHKY10 aufweisen, werden selektiert, und das Plasmid DNA wird extrahiert. Durch Verdauung mit BglII und PstI und anschließende Isolierung nach dem PAGE-Verfahren sowie Elektroelution des großen Fragments gelangt man zum gewünschten linearen Stück der DNA, welches klebrige Enden PstI und BglII aufweist. Das auf diese Weise aus pHKY10 gebildete DNA-Fragment enthält den Ursprung an Replikation und eignet sich daher als Komponente beim Aufbau von Plasmid pIA7 Δ 4 Δ 1, bei welchem sowohl die für das trp LE'-Polypeptidfusionsprotein codierenden Gene als auch die Tetracyclinresistenz vom trp-Promotor/Operator gesteuert werden.

G. Aufbau von linearer DNA mit dem trp-Promotor/Operator

Das nach Beispiel 13E. hergestellte Plasmid pSOM7 Δ 2 Δ 4 unterzieht man einer teilweisen Verdauung durch EcoRI und einer anschließenden Verdauung durch PstI. Das entstehende Fragment enthält den trp-Promotor/Operator und wird durch das PAGE-Verfahren unter anschließender Elektroelu-

tion isoliert. Eine teilweise Verdauung durch EcoRI ist zur Bildung eines Fragments erforderlich, das am Ende in Stellung 5' des Somatostatingens gespalten wird, jedoch nicht gespalten wird an der Stelle EcoRI zwischen dem ampicillinresistenten Gen und dem trp-Promotor/Operator. Die durch das PstI, welches in das ampicillinresistente Gen aufgeschnitten worden ist, verlorengegangene Ampicillinresistenz lässt sich wieder herstellen, indem man mit dem fertigen pKY10 lineares DNA-Derivat, welches nach obigem Beispiel 13 F. gebildet worden ist, bindet.

H. Isolierung des Strukturgens für die Insulin-A-Kette

Das Strukturgen für die Insulin-A-Kette erhält man durch die EcoRI und BamHI-Verdauung von Plasmid pIA1, dessen Aufbau in Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 106 (1979) beschrieben ist. Das gewünschte Fragment wird durch das PAGE-Verfahren sowie durch Elektroelution gereinigt und verfügt über die Enden EcoRI und BamHI.

I. Ligation des Strukturgens für die Insulin-A-Kette durch den trp-Promotor/Operator und des pKY10 linearen DNA-Fragments mit den Enden PstI und BglII.

Das Strukturgen für die Insulin-A-Kette, nämlich das lineare DNA-Fragment, welches den trp-Promotor/Operator enthält (hergestellt gemäß Beispiel 13G.) und das pKY10 lineare DNA-Fragment (hergestellt nach Beispiel 13F.) bindet man in geeigneter Orientierung, wie dies aus Fig. 3 hervorgeht, aneinander, wodurch sich das gewünschte Plasmid pIA7 Δ 4 Δ 1 ergibt. Das Plasmid pIA7 Δ 4 Δ 1 kann infolge der Wiederherstellung der Ampicillinresistenz und der Tetracyclinresistenz ohne weiteres selektiert werden.

B e i s p i e l 14

Aufbau von Rekombinationsplasmid pPR1

Das Plasmid pIA7 Δ 4 Δ 1 enthält eine einzige Restriktionsstelle BamHI, die die Insertion des das λ cI und λ rex enthaltenden 2,5 Kb BglIII-Fragments des Bakteriophagen λ enthält. Dies läßt sich praktisch nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren erreichen. Das gewünschte Plasmid pPR1 wird daher durch Ligation des Fragments λ BglIII in die Stelle BamHI von pIA7 Δ 4 Δ 1 gebildet.

B e i s p i e l 15

Transformation von Rekombinationsplasmid pPR1 zu Escherichia coli K12 C600R_k-M_k-

Die gewünschte Transformation wird praktisch wie in Beispiel 2 beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, daß man die Zellen von Escherichia coli mit der nach Beispiel 14 hergestellten DNA transformiert, und nicht mit der nach Beispiel 1 erhaltenen DNA. Die Transformanten werden als Escherichia coli K12 C600R_k-M_k-/pPR1 bezeichnet, entsprechend selektiert und gezüchtet. Die erhaltenen Kolonien werden bezüglich der erwarteten Phenotypen untersucht und zur Isolierung und Amplifizierung des Plasmids pPR1 verwendet. Durch Restriktionszymanalyse des Plasmids pPR1 ergibt sich, daß nicht das Gen λ cI, sondern das Gen λ rex am nächsten liegt zum Gen der trp E-Insulin-A-Kette. Plasmide mit der umgekehrten Orientierung lassen sich bei den oben produzierten Transformanten nicht finden.

B e i s p i e l 16

Amplifizierung, Isolierung und nachfolgende Transformierung von Plasmid pPR1 zu Escherichia coli K12 RV308

Die Amplifizierung und Isolierung des Plasmids DNA von Escherichia coli K12 C600 R_k-M_k -/pPR1 wird im wesentlichen nach dem in Beispiel 3 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die nachfolgende Transformierung des Plasmids pPR1 zu Escherichia coli K12 RV308 wird im wesentlichen nach dem in Beispiel 4 beschriebenen Verfahren durchgeführt, wodurch man zu dem gewünschten Transformanten Escherichia coli K12 RV308/pPR1 gelangt.

B e i s p i e l 17

Aufbau von Escherichia coli K12 RV308 λ cI90/pPR1 durch Lyso-
genisierung mit λ cI90

Der gewünschte Aufbau wird im wesentlichen nach dem in Beispiel 5 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Durch entsprechende Untersuchung der erhaltenen Kolonien von Escherichia coli K12 RV308 λ cI90/pPR1 kann man das Wachstum bei 32°C und die Sensitivität bei 42°C veranschaulichen.

B e i s p i e l 18

Transformierung von Rekombinationsplasmid pPR1 zu Escherichia coli K12 C600

Der gewünschte Aufbau wird im wesentlichen nach dem in Beispiel 4 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die überlebenden Kolonien lassen sich hinsichtlich der erwarteten Phenotypen untersuchen und bilden die gewünschten Transformanten von Escherichia coli K12 C600/pPR1.

B e i s p i e l 19

Aufbau von Escherichia coli K12 C600 λ cI90/pPR1 durch Lyso-
genisierung mit λ cI90

Der gewünschte Aufbau wird im wesentlichen nach dem in Beispiel 5 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die erhaltenen Kolonien von Escherichia coli K12 C600 λ cI90/pPR1 lassen sich untersuchen, um auf diese Weise das Wachstum bei 32°C und die Sensitivität bei 42°C zu verfolgen.

B e i s p i e l 20

Aufbau von Escherichia coli K12 C600R_k-M_k- λ cI90/pPR1
durch Lysogenisierung mit λ cI90

Der gewünschte Aufbau wird durch Herstellung von Escherichia coli K12 C600R_k-M_k-/pPR1 nach dem in Beispiel 14 beschriebenen Verfahren durchgeführt, wobei man die erhaltenen Transformanten dann mit Bakteriophag λ cI90 praktisch nach dem in Beispiel 5 beschriebenen Verfahren lysogenisiert. Die überlebenden Kolonien werden bezüglich der erwarteten Phenotypen untersucht und bilden den gewünschten Stamm.

B e i s p i e l 21

Aufbau von Plasmid pIB7 Δ 4 Δ 1

Das gewünschte Plasmid wird nach dem in Beispiel 13A.-I. beschriebenen Verfahren aufgebaut, mit der Ausnahme, daß bei der abschließenden Ligation das Strukturgen verwendet wird, welches die Insulin-B-Kette kennzeichnet, und nicht das Strukturgen für die Insulin-A-Kette. Das Strukturgen für die Insulin-B-Kette erhält man durch EcoRI- und BamHI-

Verdauung von Plasmid pIB1, dessen Aufbau in Proc. Nat. Acad. Sci. 76, 106 bis 110 (1979) beschrieben wird. Das die Insulin-B-Kette codierende DNA-Fragment wird nach dem PAGE-Verfahren sowie durch Elektroelution gereinigt und verfügt über die Enden EcoRI und BamHI.

Das Plasmid pIB7 Δ 4 Δ 1 ist in Fig. 5 dargestellt und läßt sich infolge der Wiederherstellung der Ampicillinresistenz und der Tetracyclinresistenz ohne weiteres selektieren.

B e i s p i e l 22

Aufbau von Rekombinationsplasmid pPR3

Die einmalige BamHI-Restriktionsstelle im Plasmid pIB7 Δ 4 Δ 1 erlaubt die Klonung des λ cI- und λ rex-Gens, welches das 2,5 Kb BglIII-Fragment des Bakteriophagen λ enthält, an das pIB7 Δ 4 Δ 1. Dies läßt sich im wesentlichen nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren erreichen. Durch Ligation des λ BglIII-Fragments in die BamHI-Stelle von pIA7 Δ 4 Δ 1 gelangt man hierdurch zum gewünschten Plasmid pPR3.

B e i s p i e l 23

Transformierung von Rekombinationsplasmid pPR3 zu Escherichia coli K12 C600R_k-M_k-

Die Transformierung wird im wesentlichen nach dem in Beispiel 2 beschriebenen Verfahren durchgeführt, mit der Ausnahme, daß die Zellen von Escherichia coli mit der nach Beispiel 22 hergestellten DNA transformiert werden, und nicht mit der gemäß Beispiel 1 erzeugten DNA.

Die Transformanten werden als Escherichia coli K12 C600R_k-M_k-/pPR3 bezeichnet und entsprechend selektiert sowie gezüchtet. Die erhaltenen Kolonien werden bezüglich der er-

warteten Phenotypen untersucht und zur Isolierung sowie Amplifizierung des Plasmids pPR3 verwendet. Durch Restriktionsenzymanalyse von Plasmid pPR3 ergibt sich, daß nicht das Gen λcI , sondern das Gen λrex zum Gen $trp E$ der Insulin-B-Kette am nächsten liegt. Plasmide mit umgekehrter Orientierung werden unter den oben gebildeten Transformanten nicht gefunden.

Beispiel 24

Amplifizierung, Isolierung und anschließende Transformation von Rekombinationsplasmid pPR3 zu Escherichia coli K12 RV308

Das Plasmid DNA von Escherichia coli K12 C600_{R_k-M_k}-/pPR3 wird im wesentlichen nach dem in Beispiel 3 beschriebenen Verfahren amplifiziert und isoliert. Die nachfolgende Transformation von Plasmid pPR3 zu Escherichia coli K12 RV308 unter Bildung von Escherichia coli K12 RV308/pPR3 wird praktisch nach dem in Beispiel 4 beschriebenen Verfahren durchgeführt.

Beispiel 25

Transformation des Rekombinationsplasmids pPR3 zu Escherichia coli K12 C600

Die Transformation von pPR3 zu Escherichia coli K12 C600 unter Bildung von Escherichia coli K12 C600/pPR3 wird praktisch nach dem in Beispiel 4 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die überlebenden Kolonien lassen sich bezüglich der erwarteten Phenotypen untersuchen und bilden die gewünschten Transformanten von Escherichia coli K12 C600/pPR3.

B e i s p i e l 26

Aufbau von Escherichia coli K12 RV308 λ cI90/pPR3 durch Lysogenisierung mit λ cI90

Der gewünschte Aufbau wird durch Lysogenisierung von Escherichia coli K12 RV308/pPR3 mit Bakteriophag λ cI90 nach praktisch dem in Beispiel 5 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die erhaltenen Kolonien von Escherichia coli K12 RV308 λ cI90/pPR3 können entsprechend untersucht werden, um hierdurch das Wachstum bei 32°C und die Sensitivität bei 42°C zu verfolgen.

B e i s p i e l 27

Aufbau von Escherichia coli K12 C600 λ cI90/pPR3 durch Lysogenisierung mit λ cI90

Der gewünschte Aufbau wird durch Lysogenisierung von Escherichia coli K12 C600/pPR3 mit Bakteriophag λ cI90 nach praktisch dem in Beispiel 5 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die erhaltenen Kolonien von Escherichia coli K12 C600 λ cI90/pPR3 lassen sich entsprechend untersuchen, um hierdurch das Wachstum bei 32°C und die Sensitivität bei 42°C zu verfolgen.

B e i s p i e l 28

Aufbau von Escherichia coli K12 C600R_k-M_k- λ cI90/pPR3 durch Lysogenisierung mit λ cI90

Der gewünschte Aufbau wird durch Herstellung von Escherichia coli K12 C600R_k-M_k-/pPR3 nach dem in Beispiel 21 beschriebenen Verfahren und durch anschließende Lysogenisierung der Transformanten mit Bakteriophag λ cI90 praktisch

nach dem in Beispiel 5 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die erhaltenen Kolonien von *Escherichia coli* K12 C600_{R_k-M_k}- λ cI90/pPR3 werden entsprechend untersucht, um hierdurch das Wachstum bei 32°C und die Sensitivität bei 42°C zu verfolgen.

Beispiel 29

Verfahren zur Bestimmung der Stabilitäten von Wirtszellen, die das Rekombinationsplasmid pPR3 enthalten, und zwar mit oder ohne Selektion

Die bezüglich der Plasmidretention zu untersuchenden Stämme hält man in logarithmischem Wachstum in nichtselektiven Medien (L-Brühe) durch periodische Subzüchtung in frischen Medien. Das Ausmaß der Plasmidretention wird nach dem in Beispiel 12 beschriebenen Verfahren ermittelt.

Zu Beispielen für andere Stämme, die sich nach den oben beschriebenen Verfahren aufbauen lassen, gehören folgende:

| Beispiel-Nr. | Name |
|--------------|---|
| 30 | <i>Escherichia coli</i> K12 RV308 λ cI857/pAR1 |
| 31 | <i>Escherichia coli</i> K12 C600 λ cI90/pAR1 |
| 32 | <i>Escherichia coli</i> K12 C600 _{R_k-M_k} - λ cI90/pAR1 |
| 33 | <i>Escherichia coli</i> K12 C600/pAR1 |
| 34 | <i>Escherichia coli</i> K12 C600/pAR2 |

Die Stabilitäten der Rekombinationsplasmide werden nach den oben beschriebenen Beispielen 12 und 29 gemessen. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse gehen in Prozentwerten für die Stämme *Escherichia coli* K12 RV308 λ cI90/pAR2 und *Escherichia coli* K12 RV308/pIA2 aus der folgenden Tabelle II und für die Stämme *Escherichia coli* K12 C600_{R_k-M_k}- λ cI90/pPR3 und *Escherichia coli* K12 C600_{R_k-M_k}-/pPR3 aus der sich daran anschließenden Tabelle III hervor.

TABELLE II

Stabilitäten von Rekombinationsplasmiden

| Anzahl der Kultur- doppelungen | Prozentuale Plasmidretention | |
|-----------------------------------|--|---------------------------------|
| | Escherichia coli K12 RV308 λ CI90/pAR2 | Escherichia coli K12 RV308/pIA2 |
| 9 | 100 | 100 |
| 14 | 100 | 36 |
| 23 | 100 | 22 |
| 32 | 83 | 13 |
| 40 | 82 | 9 |

TABELLE III

Stabilitäten von Rekombinationsplasmiden

| Anzahl der Kultur- doppelungen | Prozentuale Plasmidretention | |
|-----------------------------------|---|---|
| | Escherichia coli K12 C600R _k -M _k -λCI90/pPR3 | Escherichia coli K12 C600R _k -M _k -pPR3 |
| 0 | 100 | 100 |
| 34 | 100 | 0 |

Die in den Tabellen II und III angegebenen Ergebnisse zeigen deutlich die Überlegenheit des selektiven Systems, durch welches sich Rekombinationsplasmide in Bakterienpopulationen halten lassen. Etwa 78 % der Zellen in der Kultur von *Escherichia coli* K12 RV308/pIA2 sind plasmidminus nach 23 Kulturdoppelungen, während etwa 100 % der Zellen in der Kultur von *Escherichia coli* K12 C600R_k-M_k-/pPR3 plasmidminus sind nach 34 Kulturdoppelungen. Darüber hinaus ist nach 23 Kulturdoppelungen oder nach 34 Kulturdoppelungen keine der Zellen in den Kulturen von *Escherichia coli* K12 RV308λcI90/pAR2 und *Escherichia coli* K12 C600 R_k-M_k-λcI90/pPR3, deren selektives System sich an Ort und Stelle befand, plasmidminus. Nach weiterem intensivem Wachstum läßt sich eine geringe Plasmidsegregation sehen. Diese Ergebnisse reflektieren möglicherweise jedoch eine Rekombination zwischen dem Prophagen und dem Plasmid.

Die Plasmidstabilität im aufgebauten Stamm *Escherichia coli* K12 C600R_k-M_k-λcI857/pAR1 wird bestimmt, indem man den Stamm über Nacht in L-Brühe getrennt bei 42°C (restriktive Bedingungen) und bei 32°C (zulässige Bedingungen) züchtet. Die Häufigkeit der Frequenz der Zellen von Plasmid⁺ ergibt sich aus dem Verhältnis der Kolonien bei 42°C und der Gesamtanzahl an Kolonien, die bei 32°C wachsen. Dieses Verhältnis wird in Form eines Prozentwerts ausgedrückt. Die Ergebnisse zeigen, daß etwa 46 % der in der Kultur unter zulässigen Bedingungen gewachsenen Zellen, und somit unter nicht erfindungsgemäßen Bedingungen, plasmidminus sind, während keine der in der Kultur unter restriktiven und somit erfindungsgemäßen Bedingungen gewachsenen Zellen in diesem Züchtungsstadium plasmidminus sind. Dies zeigt klar, daß das erfindungsgemäße Verfahren eine brauchbare und wirksame Möglichkeit bietet, um Rekombinationsplasmide in Bakterienpopulationen zu halten.

Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur Stabilisierung und Selektierung von Wirtszellen, die rekombinierende DNA enthalten, welche ein funktionelles Polypeptid ausdrückt, d a d u r c h g e - k e n n z e i c h n e t , daß man
- a) die Wirtszellen mit einem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor transformiert, der sowohl ein Repressorgen als auch ein Gen enthält, welches ein funktionelles Polypeptid ausdrückt, und
 - b) die transformierten Wirtszellen mit einem lysogenen Organismus lysogenisiert, der einen Präger enthält, welcher in den Wirtszellen letal oder konditionell letal ist, der aber in den transformierten Wirtszellen durch das in dem rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor enthaltene Repressorgen repressiert wird,
- mit der Maßgabe, daß der rekombinierende DNA-Klonierungsvektor ein Replikon und einen Promotor enthält, welche für den Repressor nicht sensitiv sind, und mit der weiteren Maßgabe, daß bei Lysogenisierung der transformierten Wirtszellen mit einem lysogenen Organismus, der ein Gen enthält, welches konditionell letal ist, die erhaltenen Wirtszellen unter restriktiven Bedingungen kultiviert werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man als Gen, das ein funktionelles Polypeptid auspreßt, ein natürlich vorkommendes Gen, ein nicht natürlich vorkommendes Gen oder ein Gen verwendet, welches teilweise natürlich und teilweise synthetisch oder nichtnatürlich vorkommt.
3. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man als Gen, welches ein funktionelles Polypeptid ausdrückt, ein Gen verwendet, das codiert für Humaninsulin, Humanpräproinsulin, Humanproin-

sulin-A-Kette, Humaninsulin-B-Kette, Nichthumaninsulin, Humanwachstumshormon, Nichthumanwachstumshormon, Humaninterferon, Nichthumaninterferon, Viralantigen, Urokinase, irgendein Polypeptid oder irgendein Peptidhormon oder Enzym.

4. Verfahren nach Punkt 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß man als Repressorgen einen chromosomalen DNA-Replikationsmutationsrepressor, Zellwandsynthesemutationsrepressor, Ribosommutationsrepressor, RNA-Polymerasemutationsrepressor, tRNA-Mutationsrepressor, Aminoacyl-tRNA-Synthetasemutationsrepressor, Zellteilungsmutationsrepressor oder einen widersinnigen Mutationsrepressor verwendet.

5. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man als Repressorgen cI das Gen $cI857$ verwendet.

6. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man ein temperaturempfindliches Repressorgen verwendet, welches bei oder oberhalb einer Temperatur innerhalb eines bestimmten Temperaturbereichs inaktiviert wird.

7. Verfahren nach Punkt 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Temperaturbereich zwischen 38 und 44°C liegt.

8. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man als Repressorgen ein Repressorgen cI von Bakteriophag λ verwendet.

9. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 4, da -

d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man als Re-
pressorgen das Gen λ cro von Bakteriophag λ verwendet.

10. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 9, d a -
d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man als re-
kombinierenden DNA-Klonierungsvektor ein Plasmid verwendet.

11. Verfahren nach Punkt 10, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , daß man als Plasmid pAR2 ver-
wendet.

12. Verfahren nach Punkt 10, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , daß man als Plasmid pAR1 ver-
wendet.

13. Verfahren nach Punkt 10, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , daß man als rekombinierenden DNA-
Klonierungsvektor Plasmid pPR1 verwendet.

14. Verfahren nach Punkt 10, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , daß man als rekombinierenden DNA-
Klonierungsvektor Plasmid pPR3 verwendet.

15. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 14, d a -
d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man einen
lysogenen Organismus verwendet, der ein bakteriophages
Gen λ cI enthält.

16. Verfahren nach Punkt 15, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , daß man als lysogenen Organis-
mus das Bakteriophag λ cI90 verwendet.

17. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 14, d a -
d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man als ly-
sogenen Organismus das Bakteriophag λ cI857 verwendet.

18. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man Wirtszellen von Prokaryotes verwendet.

19. Verfahren nach Punkt 18, dadurch gekennzeichnet, daß man Wirtszellen von Bakterien verwendet.

20. Verfahren nach Punkt 19, dadurch gekennzeichnet, daß man als Bakterien Escherichia coli, Escherichia coli K12, Escherichia coli K12 RV308, Escherichia coli K12 C600, Escherichia coli K12 C600R_k-M_k-, Bacillus, Bacillus subtilis, Staphylococcus, Streptococcus, Actinomycetes, Streptomyces, Serratia, Pseudomonas oder Agrobacterium verwendet.

21. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man als Wirtszellen freilebende Eukaryotes verwendet, die einer Züchtung zugänglich sind.

22. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Wirtszellen Pilze verwendet.

23. Verfahren nach Punkt 22, dadurch gekennzeichnet, daß man als Pilze Neurospora, Cephalosporium, Aspergillus, Penicillium oder Hefe verwendet.

24. Verfahren nach Punkt 21, dadurch gekennzeichnet, daß man Wirtszellen verwendet, die vom Gewebe eines multizellularen Organismus stammen und einer Züchtung zugänglich sind.

233848 5 - 58 -

25. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als rekombinierenden DNA-Klonierungsvektor ein Bakteriophag verwendet.

Hierzu 9 Seiten Zeichnungen

FIG. 1

RESTRIKTIONSSTELLE UND FUNKTIONSPLAN VON PLASMID pIA2
(11,0 kb) Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung

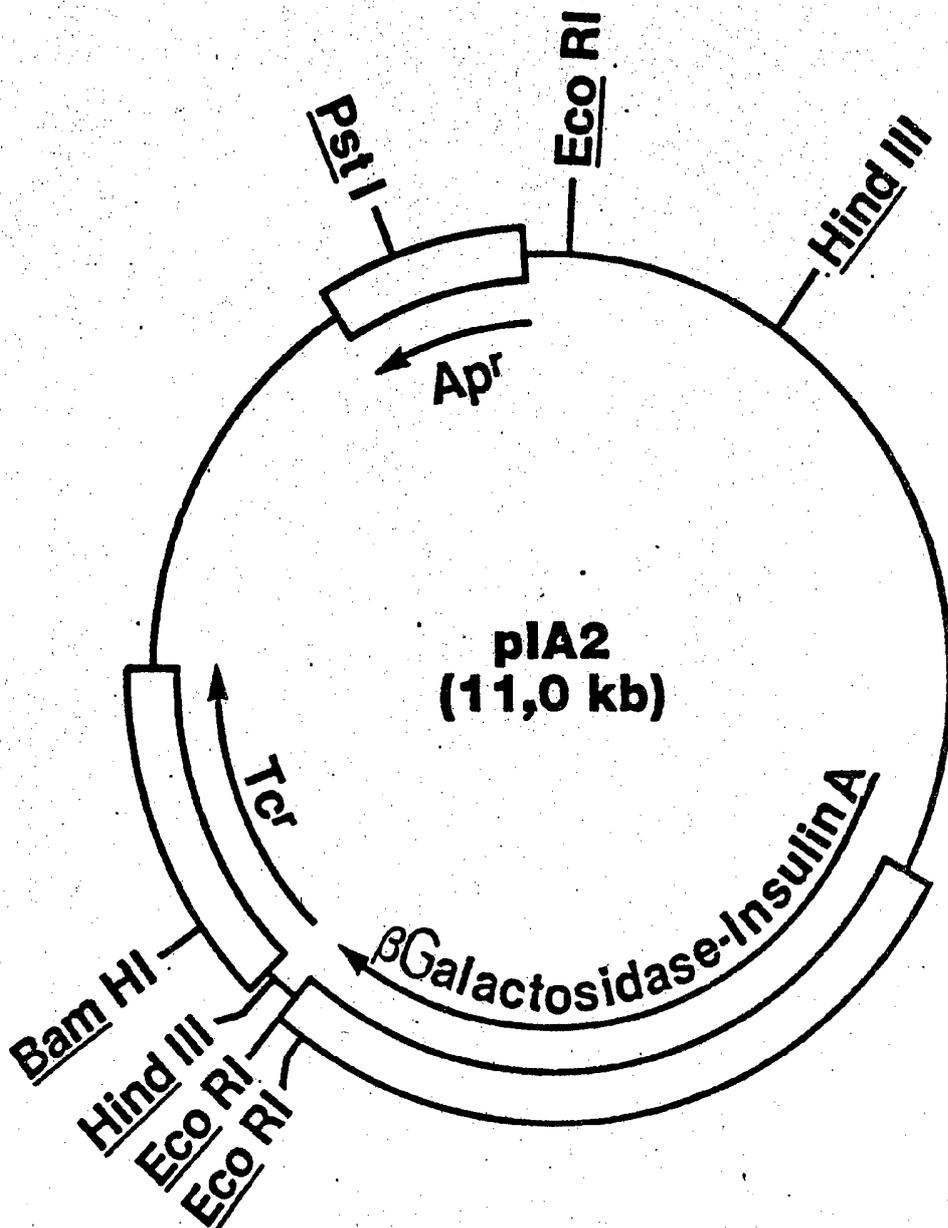
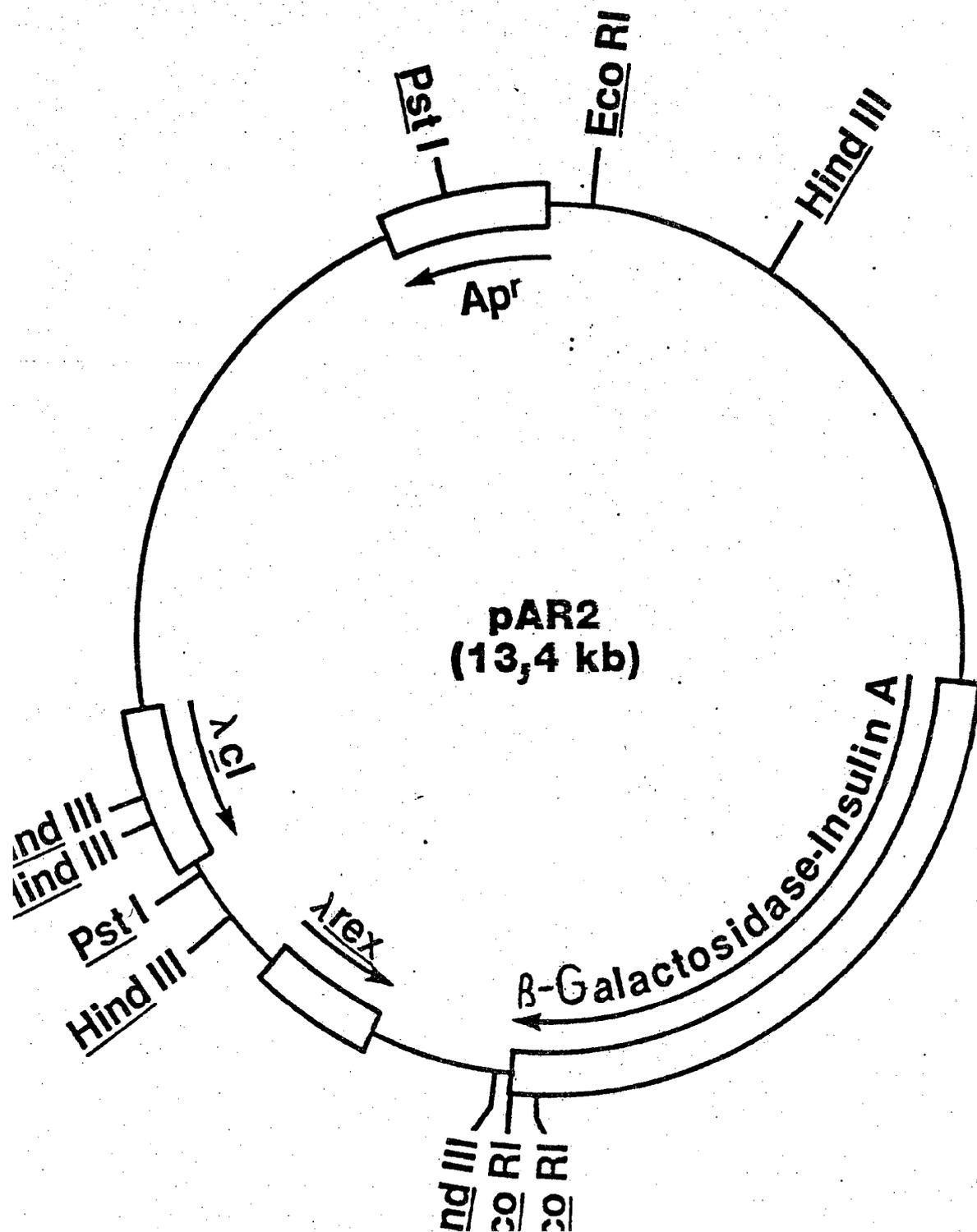


FIG. 2

RESTRIKTIONSSTELLE UND FUNKTIONSPLAN VON PLASMID pAR2
(13,4 kb) Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung

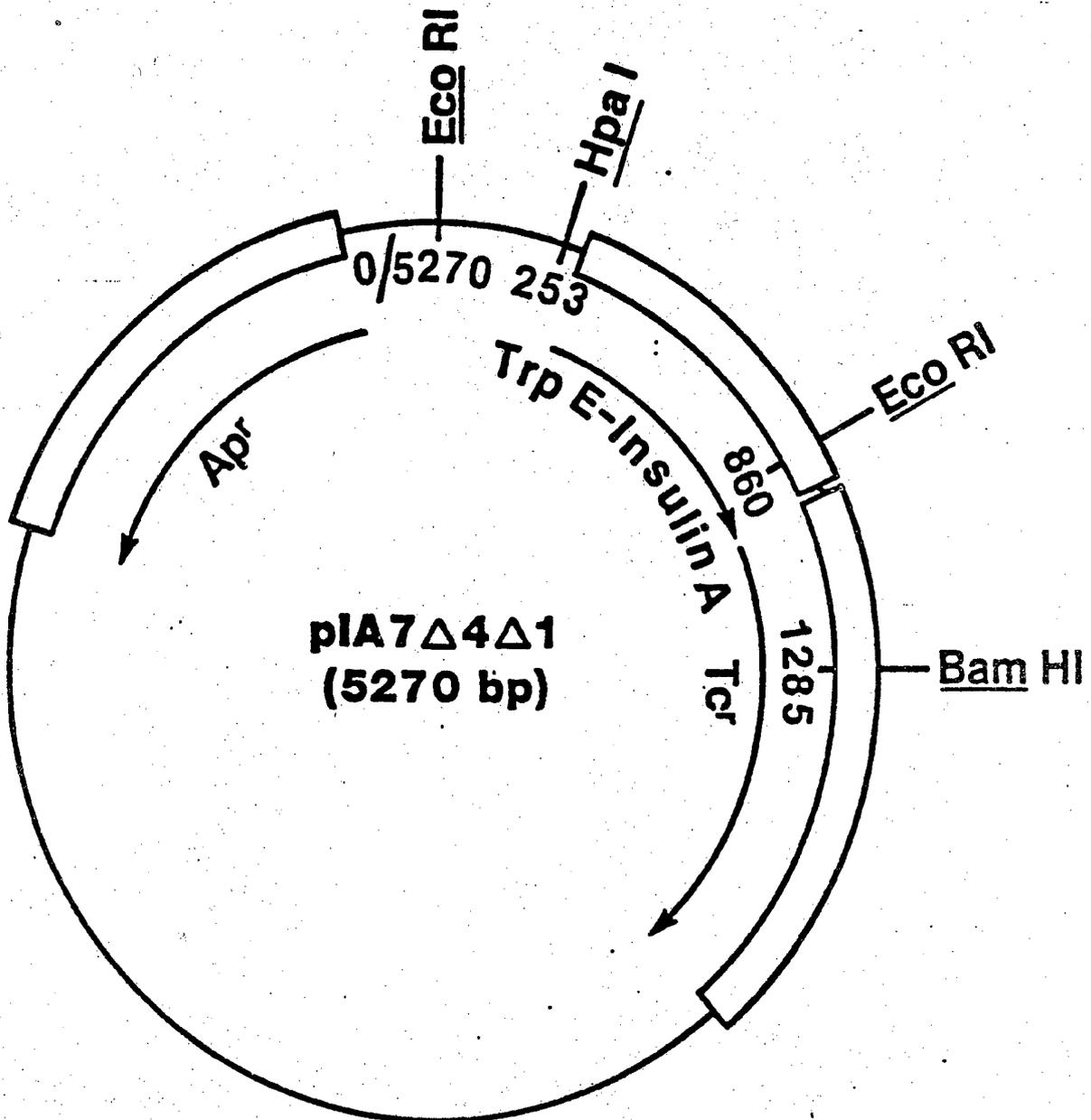


233848 5

-61-

FIG. 3

RESTRIKTIONSSTELLE UND FUNKTIONSPLAN VON PLASMID pIA7 Δ 4 Δ 1
(5270 bp) Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung

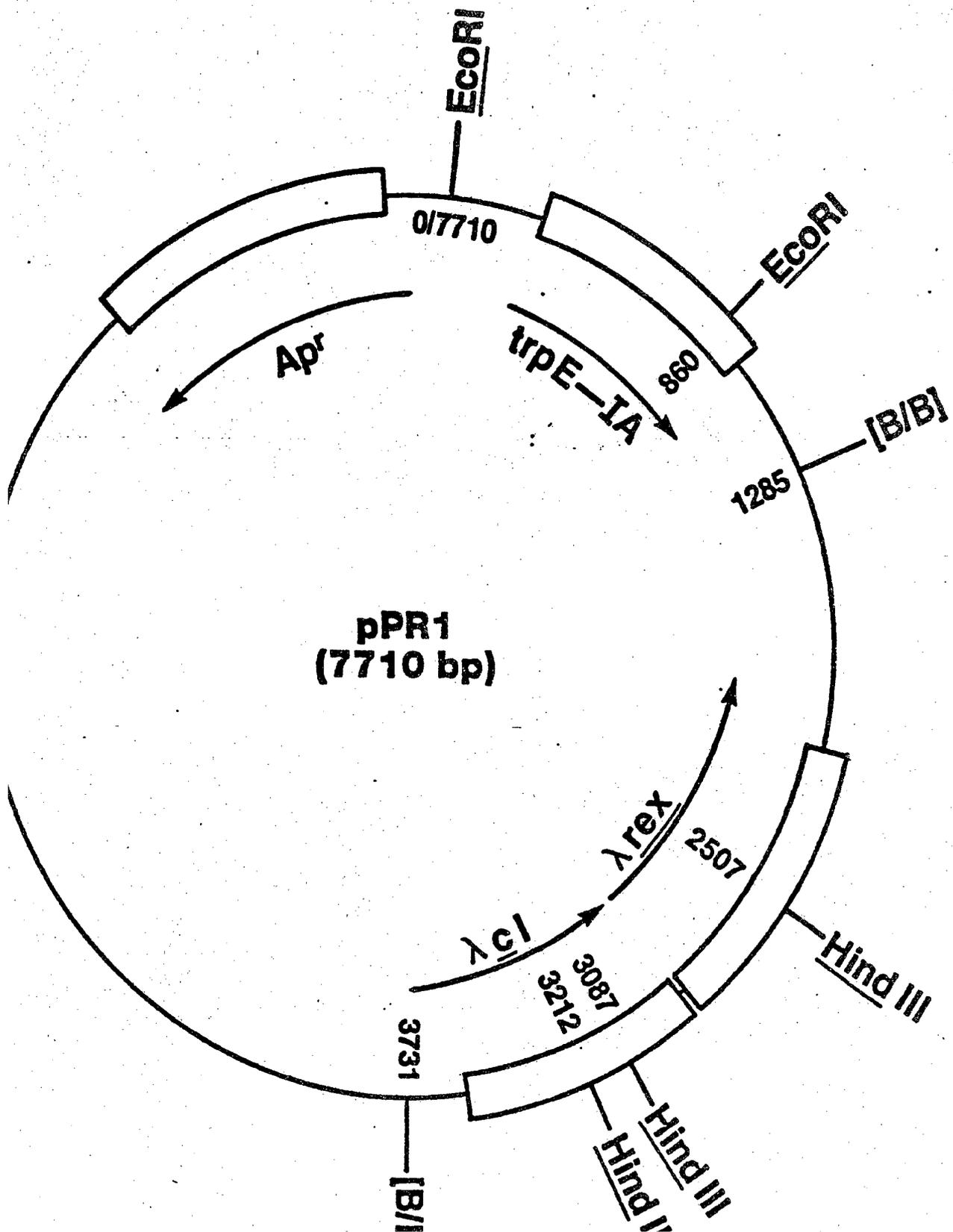


233848 5

-62-

FIG. 4

RESTRIKTIONSSTELLE UND FUNKTIONSPLAN VON PLASMID pPR1
(7710 bp) Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung



233848 5

-63-

FIG. 5

RESTRIKTIONSSTELLE UND FUNKTIONSPLAN VON PLASMID pIB7 Δ 1 Δ 4
(5295 bp) Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung

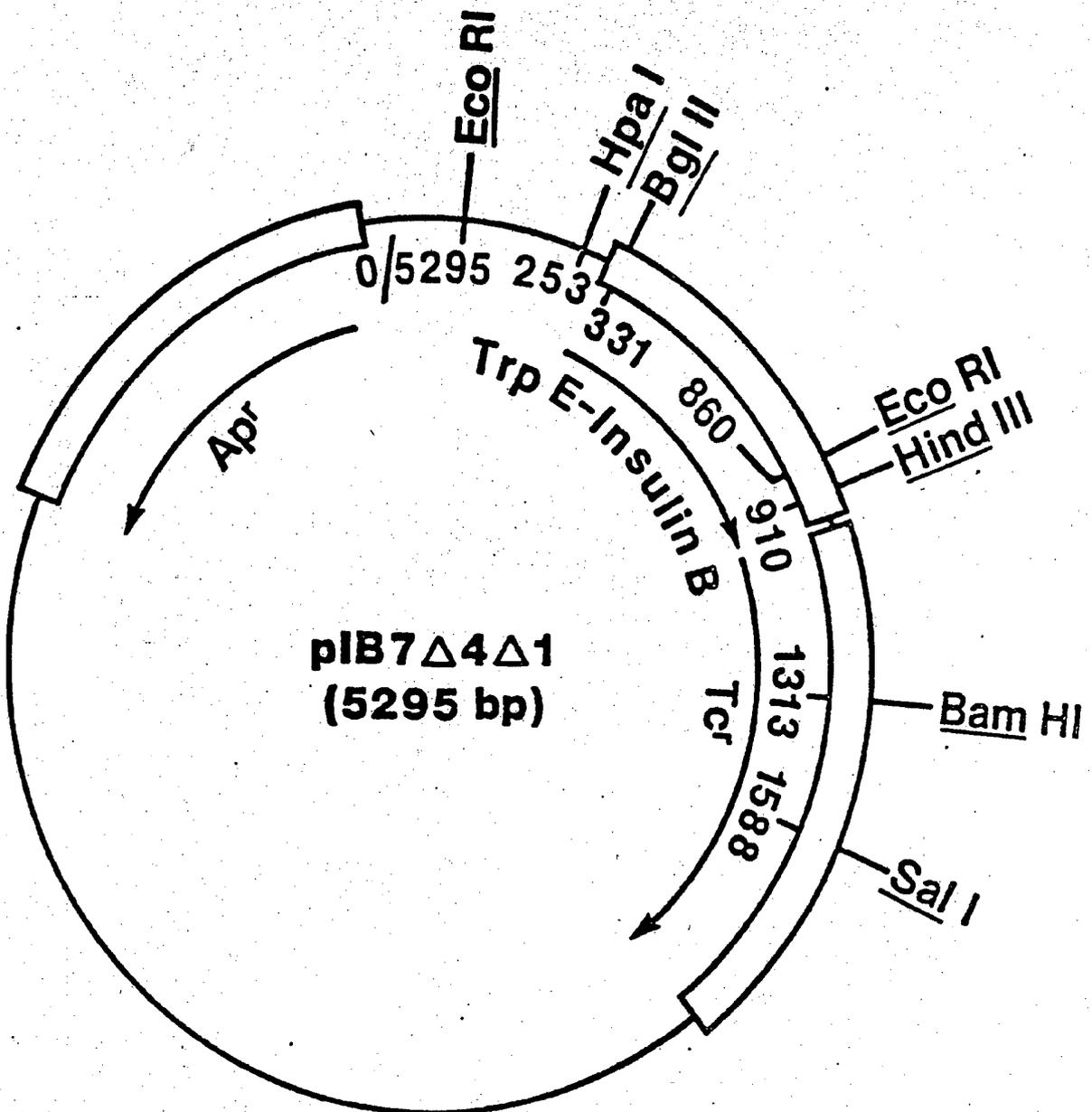


FIG. 6

RESTRIKTIONSSTELLE UND FUNKTIONSPLAN VON PLASMID pPR3
(7740 bp) Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung

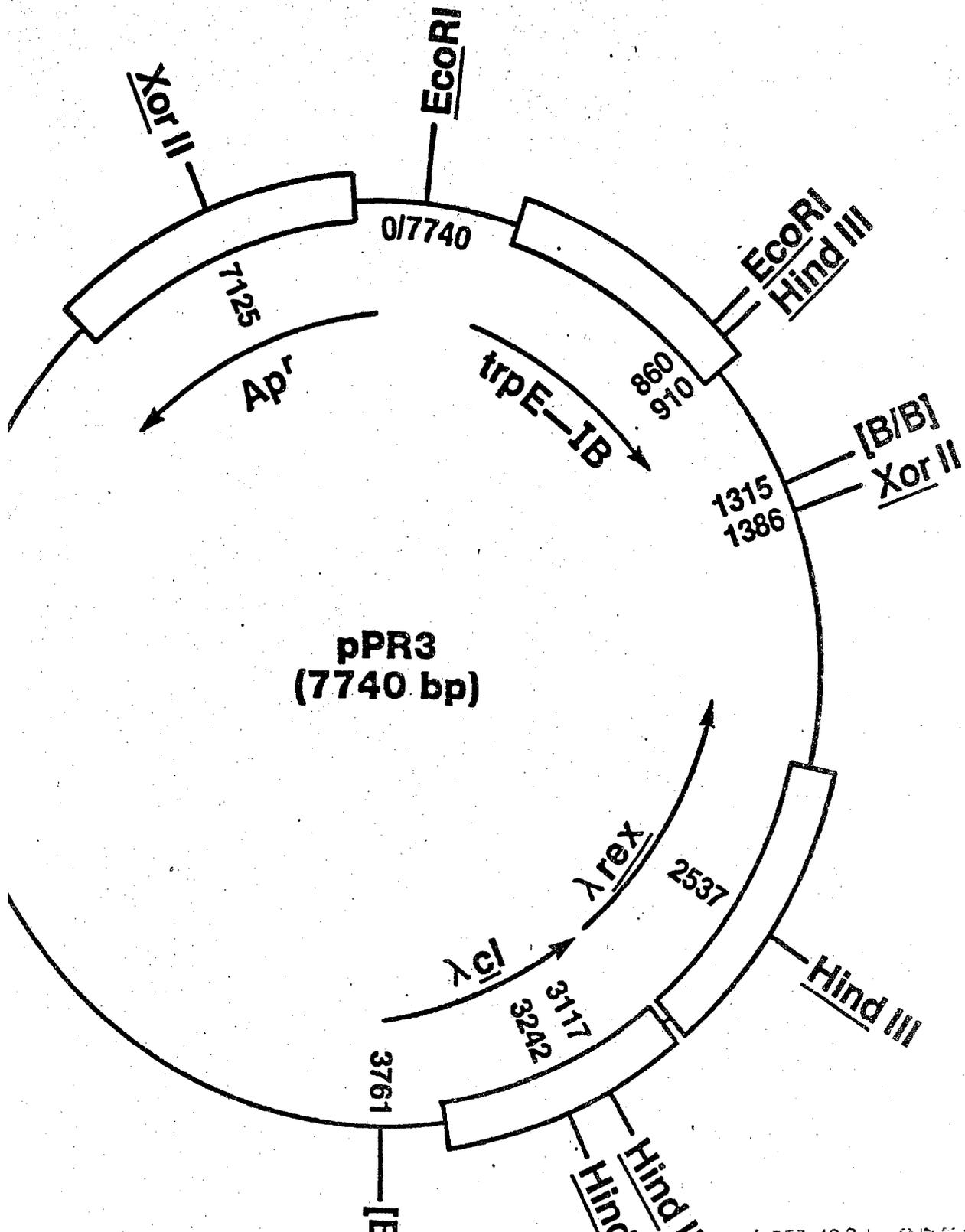


FIG. 7

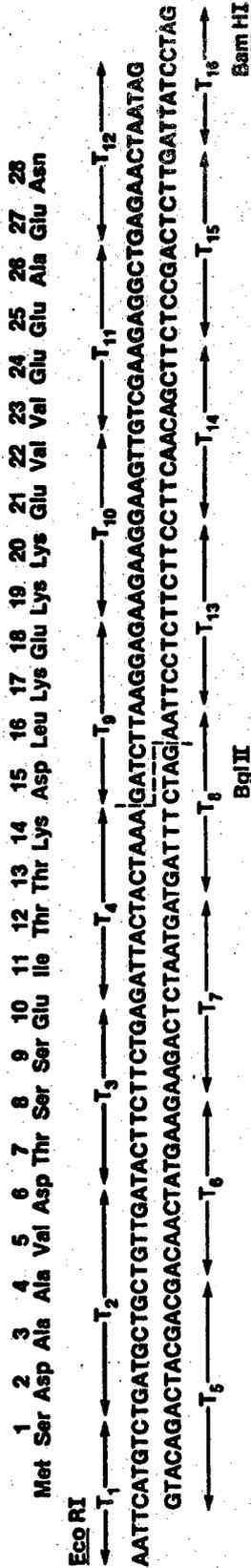


FIG. 8

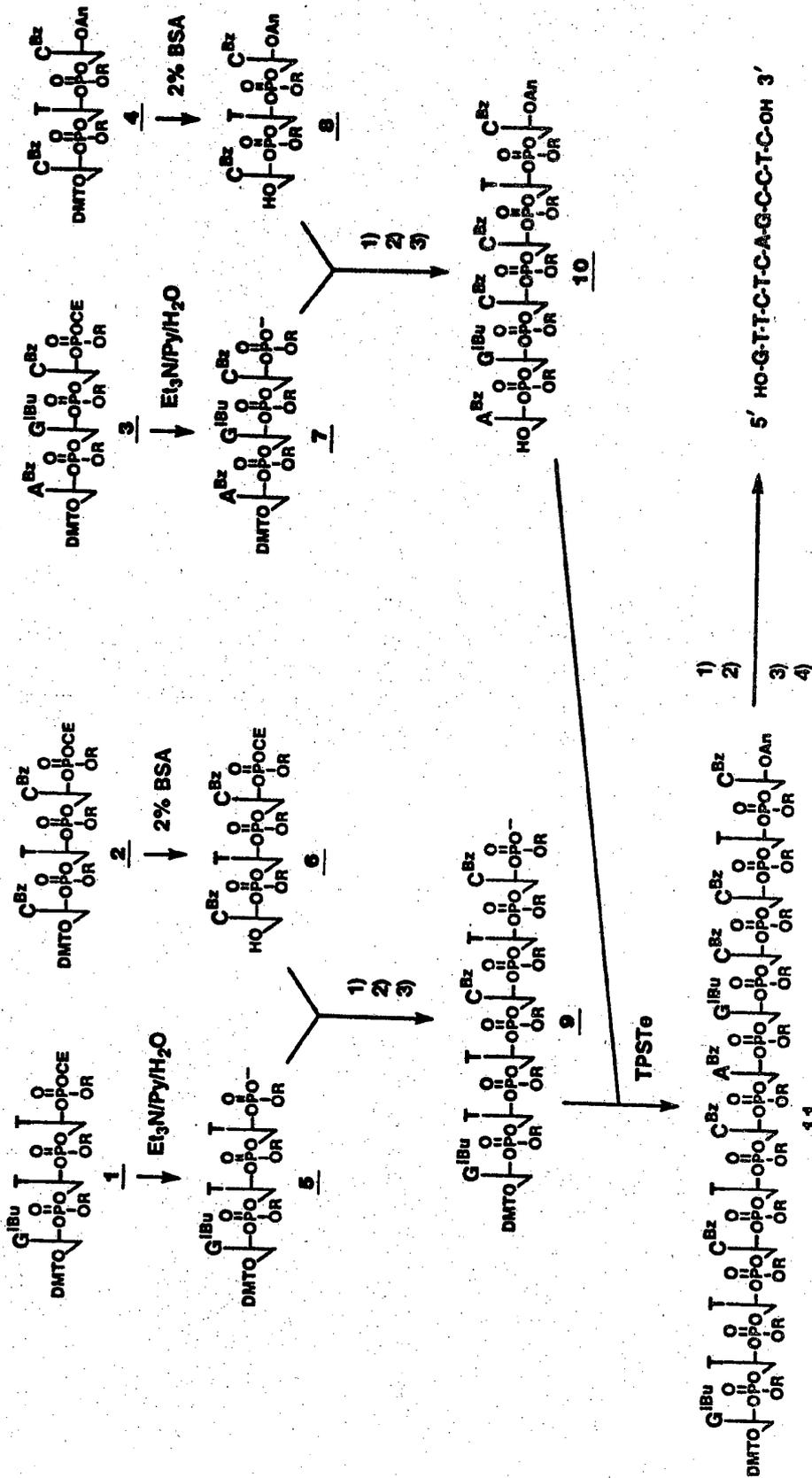


FIG. 9

