



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **279 270 A5**

4(51) C 12 N 15/00

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 N / 326 369 0
(31) 4618624

(22) 08.03.87
(32) 22.12.88

(44) 30.05.90
(33) SU

(71) siehe (73)

(72) Baranov, Vladimir I.; Morozov, Igor J.; Spirin, Alexandr S., SU

(73) Institut Belka Akademii, Nauk SSSR, Puschino, SU

(74) Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

(54) Verfahren zur präparativen Genexpression in einem zellfreien System der konjugierten Transkription/Translation

(55) Genexpression, präparativ; System Transkription/Translation, konjugiert, zellfrei; Polypeptidsynthese; Arbeitsdauer, verbessert; Ausbeute, höher; Reaktionsproduktentfernung; Substratzufuhr

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur präparativen Genexpression in einem zellfreien System der konjugierten Transkription/Translation. Das Ziel der vorliegenden Erfindung besteht in der Entwicklung solch eines Verfahrens zur präparativen Genexpression in einem zellfreien System der konjugierten Transkription/Translation, das es ermöglicht, Polypeptide in präparativen Mengen durch Steigerung der Arbeitsdauer des Systems bereitzustellen. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Bedingungen des Prozesses im Verfahren zur Genexpression in einem zellfreien System der konjugierten Transkription/Translation zu ändern. In Übereinstimmung mit dem genannten Ziel und der genannten Aufgabe besteht die Erfindung darin, daß man die präparative Genexpression in einem zellfreien System der konjugierten Transkription/Translation durchführt, das als Substrate Aminosäuren, ATP, GTP, CTP und UTP enthält, unter Ausnutzung der Gene in Form von DNS-Molekeln. Dadurch entstehen im System Expressionsprodukte der Gene, die Polypeptide, AMP, ADP, GDP, UDP, Pyrophosphat und anorganisches Phosphat darstellen. Bei der Arbeit des zellfreien Systems der konjugierten Transkription/Translation im Maße des Verbrauches der Substrate unter Bildung der Produkte werden aus dem System Expressionsprodukte der Gene herausgeführt, die Polypeptide, AMP, ADP, GDP, CDP und UDP, Pyrophosphat und anorganisches Phosphat beinhalten. Gleichzeitig damit führt man in das System Substrate in Form von Aminosäuren, ATP, GTP, CTP, UTP zur Unterhaltung ihrer Ausgangskonzentration ein. Die vorliegende Erfindung kann in der Molekularbiologie, in der Medizin und Landwirtschaft ihre Anwendung finden.

Patentanspruch:

Verfahren zur präparativen Genexpression in einem zellfreien System der konjugierten Transkription/Translation, das als Substrate Aminosäuren, ATP, GTP, CTP und UTP enthält, unter Ausnutzung der Gene in Form von DNS-Molekeln, wodurch im System Expressionsprodukte der Gene, die Polypeptide, AMP, ADP, GDP, CDP, UDP, Pyrophosphat, anorganisches Phosphat gebildet werden, **dadurch gekennzeichnet**, daß während der Arbeit des zellfreien Systems der konjugierten Transkription/Translation im Maße des Verbrauches der Substrate unter Bildung der Produkte aus dem System Expressionsprodukte der Gene, die Polypeptide, AMP, ADP, GDP, CDP, UDP, Pyrophosphat und anorganisches Phosphat beinhalten, mit der gleichzeitigen Einführung von Substraten in das System in Form von Aminosäuren, ATP, GTP, CTP, UTP zur Unterhaltung ihrer Ausgangskonzentrationen herausgeführt werden.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Gebiete der Molekularbiologie und Biotechnologie, insbesondere betrifft sie Verfahren zur präparativen Genexpression in einem zellfreien System der konjugierten Transkription/Translation. Bekanntlich sind Expressionsprodukte der Gene Peptide oder Eiweiße. Die genannten Stoffe sind umfassend in der Medizin als Bioregulatoren der biologischen Prozesse, als Heilmittel sowie als Diagnosesysteme eingesetzt. Beispielsweise sind Peptide als Aktivatoren des Immunsystems, Peptide als Stimulatoren des Salzstoffwechsels, Eiweiße, die den Zuckergehalt des Blutes regulieren, und anderes mehr bekannt. Bekannt ist die Verwendung der Polypeptide in der Landwirtschaft als Biostimulatoren, beispielsweise Wachstumshormone.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Es ist bekannt ein Verfahren zur präparativen Expression des genetischen Materials der Zelle nach der Methode der Gentechnik, das in dem Eindringen in die lebende Zelle der fremden DNS, deren genetisches Material mit dem Apparat der Wirts-Zelle exprimiert wird, beruht. Diese Methode wird bei der großtechnischen Eiweißproduktion breit verwendet. Doch ist dieses Verfahren in seiner Verwendung begrenzt. Das ist mit der Kompliziertheit der Isolierung der Expressionsprodukte des Gens, mit der Letalität einiger Endprodukte für die Wirtszelle, mit der proteolytischen Degradation oder Aggregation des Expressionsproduktes eines fremden Gens verbunden. Der letzte Umstand ruft besondere Schwierigkeiten bei der Aussonderung der Polypeptide mit einer Länge von 15 bis 70 Aminosäureresten oder bei der Herstellung von Eiweißen mit künstlich abgeänderter Aminosäure-Sequenz hervor.

Aus dem oben Dargelegten geht hervor, daß es die Methode der Gentechnik nicht möglich macht, die präparative Expression beliebiger Gene zu bewirken.

Es besteht noch ein Verfahren zur Expression der Gene, das auf der Ausnutzung eines zellfreien Systems der konjugierten Transkription/Translation beruht.

Diese Methode beruht auf der Ausnutzung der Zellextrakte, bei denen DNS-Molekeln verwendet werden. In solch einem System erfolgt die Vermehrung der MRNS von den DNS-Molekeln und deren anschließende Translation.

Die zellfreien Systeme der konjugierten Transkription/Translation sind zellspezifisch begrenzt und bewirken die Expression praktisch eines beliebigen Gens in Form einer erforderlichenweise konstruierten DNS-Molekel.

Die Wirksamkeit solcher Verfahren ist sehr niedrig.

Die Funktionierungsdauer solch eines Systems beträgt von 20 bis 60 Minuten, und die Menge des synthetisierten Polypeptide übersteigt 3–10 Picomol pro 1 ml Inkubationsgemisch nicht.

Bekannt ist, beispielsweise, ein Verfahren zur Genexpression in einem zellfreien System der konjugierten Transkription/Translation (Gene Vol. 6 1979).

100 µl zellfreies System der konjugierten Transkription/Translation enthält gemäß diesem Verfahren:

25 µl Extrakt S 30, 5 µg DNS-Molekel, 19 µg summarische RNS, 1,7 mMol ATP, je 1 mMol GTP, CTP, und UTP, 88 µMol cAMP, 0,5 µg Folsäure, 37 mMol Phosphoenolpyruvat, 2,6% Polyäthylenglykol 6000, 88 µMol [³⁵S]-Methionin, je 480 µMol übrige 19 Aminosäuren im Puffer folgender Zusammensetzung: 77 mMol Tris-Azetat, pH = 8,2, 13 mMol Magnesiumazetat, 13 mMol Kalziumazetat, 100 mMol Kaliumazetat, 50 mMol Ammoniumazetat, 2,4 mMol DTT.

Man führt die Genexpression bei einer Temperatur von 37°C durch. Bei der Synthese werden in dem System Expressionsprodukte der Gene gespeichert, die ein Endprodukt in Form von Polypeptid, Zerfallsprodukte in Form von AMP, ADP, GDP, CDP, UDP, Pyrophosphaten, anorganischen Phosphaten u. a. vorsehen, die Inhibitoren des Systems der Genexpression darstellen. Infolge der Inhibierung wird das System in 30 bis 60 Minuten zum Stillstand gebracht. Die Menge des synthetisierten Polypeptids in 100 µl solch eines Systems übersteigt 0,51 Picomol nicht.

Die Hauptursachen der kurzen Arbeitsdauer des zellfreien Systems der konjugierten Transkription/Translation bestehen in folgenden:

1. Das System enthält eine begrenzte Anzahl der Substrate, deren Gehaltserhöhung zur Inhibierung des jeweiligen Systems führt.
2. Die Zerfallsprodukte, die bei dem Funktionieren des Systems in Form von AMP, ADP, GDP, CDP, UDP, Pyrophosphaten und Phosphaten entstehen, sind Inhibitoren des Systems.
3. Das Endprodukt kann auch das zellfreie System der konjugierten Transkription/Translation inhibieren.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht in der Entwicklung solch eines Verfahrens zur präparativen Genexpression in einem zellfreien System der konjugierten Transkription/Translation, das es ermöglicht, Polypeptide in präparativen Mengen durch Steigerung der Arbeitsdauer des Systems herzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Bedingungen des Prozesses im Verfahren zur Genexpression in einem zellfreien System der konjugierten Transkription/Translation zu ändern. In Übereinstimmung mit dem genannten Ziel und der genannten Aufgabe wird ein solches Verfahren zur präparativen Genexpression in einem zellfreien System der konjugierten Transkription/Translation, das als Substrate Aminosäuren, ATP, GTP, CTP und UTP enthält, unter Ausnutzung der Gene in Form von DNS-Molekeln, wodurch im System Expressionsprodukte der Gene, die Polypeptide, AMP, ADP, GDP, CDP, UDP, Pyrophosphat, anorganisches Phosphat gebildet werden, vorgeschlagen, bei dem, erfindungsgemäß, während der Arbeit des zellfreien Systems der konjugierten Transkription/Translation im Maße des Verbrauches der Substrate unter Bildung der Produkte aus dem System Expressionsprodukte der Gene, die Polypeptide, AMP, ADP, GDP, CDP, UDP, Pyrophosphat und anorganisches Phosphat beinhalten, mit der gleichzeitigen Einführung von Substraten in das System in Form von Aminosäuren, ATP, GTP, CTP, UTP zur Unterhaltung ihrer Ausgangskonzentration herausgeführt werden.

Als Expressions-System der Gene können in dem erfindungsgemäßen Verfahren, sowohl prokaryotische als auch eukaryotische zellfreie Systeme der konjugierten Transkription/Translation verwendet werden. In dem erfindungsgemäßen Verfahren werden jene Verhältnisse der Komponenten im Reaktionsgemisch, Ionen- und Temperaturbedingungen der Syntheseführung angewendet, die für das gewählte System optimal sind. Der Bereich dieser Bedingungen ist breit und wird durch die Eigenschaften der Organismen, aus denen das zellfreie System hergestellt ist, ermittelt.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur präparativen Genexpression ist von den Begrenzungen der Methoden der Gentechnik frei und kann für die Expression der Gene beliebiger Peptide und Eiweiße eingesetzt werden. Diese Eigenschaft ist für die Erzielung der biologisch aktiven Peptide und Eiweiße mit künstlich veränderter Aminosäure-Sequenz von großer Bedeutung.

Das erfindungsgemäße Verfahren gewährleistet die Genexpression in dem zellfreien System der konjugierten Transkription/Translation mit einer konstanten hohen Geschwindigkeit innerhalb von 50 Stunden und mehr. Die Menge des Endproduktes beträgt dabei von 200 bis 400 µg pro 1 µl Reaktionsgemisch innerhalb von 50 bis 100 Stunden der Arbeit des Systems, was es ermöglicht, Produkte der Genexpression großtechnisch zu produzieren.

Ausführungsbeispiel

Nachstehend wird die Erfindung an Hand eines Ausführungsbeispiels mit Bezugnahme auf die beigegefügte Zeichnung erläutert, wo die Abhängigkeitskurve der Menge der synthetisierbaren Polypeptide von der Synthesezeit dargestellt ist.

Das Verfahren zur präparativen Genexpression in dem zellfreien System der konjugierten Transkription/Translation wird wie folgt durchgeführt.

Man stellt aus den Prokaryoten oder Eukaryotenzellen einen Extrakt her, der alle Komponenten des Transkriptions- und Translationsapparates enthält, aber von den endogenen mRNS und DNS frei ist. Man fügt diesem Extrakt niedermolekulare Komponenten der Transkription und Translation (Aminosäuren, ATP, GTP, UTP, CTP) sowie ein Gen in Form einer DNS-Molekel hinzu.

Man bringt das Reaktionsgemisch in einen Behälter, in dem der Prozeß der konjugierten Transkription/Translation vor sich geht, ein. Zum Vorbeugen des Prozeßstillstandes werden aus dem Behälter über eine semipermeable Membrane kontinuierlich Transkriptionsprodukte (anorganische Phosphate, ADP, GDP, CDP, UDP) und Translationsprodukte (synthetisiertes Polypeptid, AMP, GDP, anorganische Phosphate und Pyrophosphate) abgeleitet.

Gleichzeitig damit werden dem Behälter Aminosäuren, ATP, GTP, CTP, UTP zwecks Reduktion deren Ausgangskonzentration zugeführt. Das synthetisierte Polypeptid wird an der Säule mit einem Sorptionsmittel gespeichert und die Transkriptions- und Translationsprodukte werden in einem Sonderbehälter für deren anschließende Regeneration gespeichert.

Zu einem besseren Verständnis der vorliegenden Erfindung wird folgendes konkretes Beispiel angeführt.

Präparative Expression der Gene eines Plasmids pUD 18 in einem zellfreien System

Man stellt ein zellfreies Standardsystem der konjugierten Transkription/Translation her. Das Plasmid pUD 18 enthält Gene der β -Laktamase und Dihydrofolatreduktase.

Lösung (A) enthält 55 mMol Tris-Azetat (pH = 8,2), 11 mMol Mg Ac, 9,5 mMol CaCl₂, 76 mMol KAc, 1,5 mMol DTT, 1,5% Polyäthylenglykol 6000, 5 mMol Phosphoenolpyruvat, 1,2 mMol ATP, jeweils 0,8 mMol GTP, CTP und UTP, 5 mg/ml Folsäure, 100 µMol [³H]-Leuzin mit einer spezifischen Radioaktivität von 230 mCi/mMol und je 100 µMol übrige Aminosäuren. 1 ml Reaktionsgemisch, hergestellt auf einem Puffer (A), enthält 430 µl Extrakt S 30, 150 µg Plasmid pUD 18 und 200 µg summarische rRNS.

Durch Standardsystem der konjugierten Transkription/Translation synthetisierte man während 40 min Inkubation bei einer Temperatur von 37°C (Plateauwert) je 6 Picomol β -Laktamase und Dihydrofolatreduktase pro 1 ml Inkubationsgemisch. In einem parallel verlaufenden Experiment auf einer kontinuierlich arbeitenden Anlage führt man dem 1,0 ml Reaktionsgemisch eine Lösung (A) mit einer Geschwindigkeit von 3 ml/St oder 2 ml/St zu. Die Reaktionsprodukte werden aus dem Reaktionsgemisch mit dergleichen Geschwindigkeit über eine Ultrafiltrationsmembrane XM-100 der Firma „Amikon“, Holland, abgeführt. Die Kinetik der Genexpression der β -Laktamase und Dihydrofolatreduktase in solch einem System ist durch ein Diagramm auf der Zeichnung dargestellt, wo an der Abszissenachse die Dauer t der Synthese in Stunden und an der Ordinatenachse die Menge m des anfallenden Produktes in Mikrogramm abgelegt.

An den Abschnitten 1 der kinetischen Kurve wird die Lösung (A) mit einer Geschwindigkeit von 3 ml/ST und an dem Abschnitt 2 der kinetischen Kurve wird die Lösung (A) mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/St zugeführt. Wie aus dem dargestellten Diagramm hervorgeht, hängt die Geschwindigkeit der Synthese von Polypeptiden von der Zufuhrgeschwindigkeit der Lösung (A) ab, aber sie hängt von der Funktionierungszeit des Systems nicht ab.

Bei der Arbeit solch eines Systems im Verlaufe von 50 Stunden synthetisiert man in 1 ml Reaktionsgemisch je 4,1 Nanomol β -Laktamase und Dihydrofolatreduktase, was 212 μ g Eiweiße der β -Laktamase und Dihydrofolatreduktase betrug.

Dadurch bewirkt das erfindungsgemäße Verfahren die präparative Genexpression im zellfreien System, wobei die Synthese des Produktes um das mehr als 500fache gesteigert wird, als dies in dem zellfreien Standardsystem der konjugierten Transkription/Translation der Fall ist.

