



HU000228206B1

(19) **HU**(11) Lajstromszám: **228 206**(13) **B1****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 02 02628**(22) A bejelentés napja: **2000. 09. 27.**(40) A közzététel napja: **2002. 12. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2013. 01. 28.**(51) Int. Cl.: **C12N 15/82** (2006.01)**A01H 5/00** (2006.01)**C12P 21/02** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/DE 00/03374

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 0125456

(30) Elsőbbségi adatok:

199 47 290.4**1999. 10. 01.****DE**

(73) Jogosult(ak):

**greenovation Biotech GmbH,
Freiburg/Breisgau (DE)**

(72) Feltaláló(k):

Reski, Ralf, Oberried (DE)**Gorr, Gilbert, Freiburg/Breisgau (DE)**

(54)

Eljárás fehérjeszerű anyagok előállítására

(57) Kivonat

A találmány tárgya eljárás heterológ fehérjeszerű anyagok előállítására növényi anyagban oly módon, hogy moha protonéma szövetet alkalmazunk növényi anyagként, és a termelt fehérjeszerű anyagokat a termelő szövetek vagy sejtek szétzúzása nélkül nyerjük ki a tenyésztő tápközegből.

P0202628

2010. 02. 10. 10:00 / 2010

MEGADÁS ALAPJÁUL
SZOLGÁLÓ VÁLTOZAT

Eljárási leírás fehérjeszerű anyagok előállítására



A találmány fehérjeszerű anyagok növényi anyagokban való előállításának tárgykörébe tartozik. Közelebbről, a találmány tárgya új eljárás kívánt fehérjeszerű anyagok előállítására mohákban.

A biotechnológiai eljárások termelési célokra való felhasználása fontos lehetőséget nyújt az emberiségnek olyan anyagok termelésére, amelyek más utakon (például kémiai szintézissel) nem termelhetők gazdaságosan vagy egyáltalán nem termelhetők, és amelyek nyersanyagként elégtelen mennyiségben állnak rendelkezésre a természetben. Bár több mint 10000 növényi eredű szekunder metabolit ismeretes, ezen vegyületek közül csak néhányat termelnek ipari léptékben növényi sejtenyészetek segítségével. Ezek az anyagok zömmel gyógyászatiilag aktív szekunder metabolitok. Ide tartoznak például a következők: a) berberin, ami bakteriosztatikus és fungicid hatóanyag (termelés 40000 literes léptékben) [Fujita Y. és Tabata M.: a „Plant tissue and cell culture, plant science” című sorozatban; szerkesztők: Green C. E. és munkatársai, kiadó: A. R. Liss Inc., New York (1987), 3. kötet, 169. oldal]; b) shikonin, ami antibiotikus és gyulladáscsökkentő hatással bír (750 literes lépték) [Tabata M. és Fujita Y.: a „Biotechnology in plant science” című szakkönyvben; szerkesztők: Day P. és munkatársai, kiadó: Academic Press, Orlando (1985); 207-218. oldal]; és c) paclitaxel, ami taxol néven is ismert és tumorellenes hatása van (7500 literes lépték) [Jaziri M. és munkatársai: Taxus fajta sejt-, szövet- és szervtenyészetek, mint a taxoid termelés alternatív forrásai: szakirodalmi felmérés [Taxus sp. cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: a literature survey], Plant Cell Tiss. Org. Cult. 46, 59-75 (1996)].

Egy további fontos biotechnológiai eljárás, amelyben növényi sejtenyészeteket használnak fel, a digitoxin biológiai transzformálása digoxinné, egy szívre és keringésre ható gyógyszerre. Ezt a sztereospecifikus hidroxilező reakciót sikeresen és nagy hozammal hajtják végre Digitalis lanata bioreaktor tenyészetében [Reinhard E. és Kreis W.: Növényi sejtek tenyésztése bioreaktorban (Kultivierung von pflanzlichen Zellen im Bioreaktor), Bio. Engin. 5, 135-136 (1989)] nagy kitermeléssel. A növényi sejtenyészetek biotechnológiai alkalmazásáról naprakész és kiterjedt áttekintést ad a következő szakkikk: Mühlbach H. - P.: Növényi sejtenyészete-

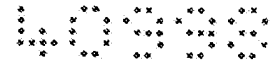


tek alkalmazása a biotechnológiában (Use of plant cell cultures in biotechnology), *Biotechnol. Annu. Rev.* 4, 113-176 (1998).

A magasabbrendű növények genetikai transzformációjára szolgáló eljárások kifejlesztése révén a nyolcvanas évek elején lehetővé vált a növények termelékenységeinek jelentős növelése egyes szekunder beltartalmi anyagokra nézve a szóbanforgó metabolikus utak fajlagos kulcsenzimjei génjeinek transzformálásával. Nemcsak transzgenikus ép növényeket, hanem növényi sejttenyészeteket is hasznosítottak. Példaként említjük a bakteriális lizin dekarboxiláz túl-expresszálását *Nicotiana tabacum* transzgenikus gyökérszövet tenyészteteiben, ami a kadaverin és anabazin biogén aminok termelésének akár 14-szeres növekedéséhez vezet [Berlin J. és munkatársai: Növény szekunder metabolizmus genetikai módosítása: a termelési szintek változása aminosav dekarboxilázok túl-expresszálásával (Genetic modification of plant secondary metabolism: Alternation of product levels by overexpression of amino acid decarboxylases), az *Advances in Plant Biology, Studies in Plant Science* című sorozatban; szerkesztők: Ryu D. D. Y. és Furasaki S., kiadó: Elsevier, Amsterdam (1994); 4. kötet, 57-81. oldal].

A DNS átvitelének lehetősége növényekben nemcsak a növényi beltartalmi anyagok mennyiségi és minőségi megváltoztatására nyitott lehetőséget, hanem a növények és növényi sejt tenyészetek is érdekessé váltak heterológ fehérjék előállítására [Moffat A. S.: A magas technológiájú növények új termékek bombatermését ígér (High-Tech plants promise a bumper crop of new products), *Science* 256, 770-771 (1992)], amire elvben két különböző megközelítés választható.

Az egyik megközelítés szerint transzgenikus teljes növényekben állítanak elő heterológ fehérjéket. A transzgenikus dohány növényekben való antitest termelésen kívül [Ma J. K. - C. és munkatársai: Kiválasztott antitestek kialakítása és összeállítása növényekben (Generation and assembly of secretory antibodies in plants), *Science* 268, 716-719 (1995)] humán szérum albumin expresszióját és helyes feldolgozását is leírták mind transzgenikus dohány növényekben, mind transzgenikus burgonya növényekben [Sijmons P. C. és munkatársai: Helyesen feldolgozott humán szérum albumin előállítása transzgenikus növényekben (Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants), *Bio/Tech.* 8, 217-221 (1990)]. Transzgenikus dohány növényekben humán epidermális növekedési



faktort (hEGF) is expresszáltak [Salmanian A. - H. és munkatársai: A humán epidermális növekedési faktor génjének szintézise és expressziója transzgenikus burgonya növényekben (Synthesis and expression of the gene for human epidermal growth factor in transgenic potato plants), *Biotechnol. Lett.* **18**, 1095-1098 (1996)]. Más növények szintén alkalmazhatók. Sikeresen állítottak elő Leu-enkefalint *Arabidopsis thaliana* és *Brassica napus* alkalmazásával [Krebbers E. és Vandekerckhove J.: Peptidek előállítása növényi magokban (Production of peptides in plant seeds), *Tibtech* **8**, 1-3 (1990)]. Ezen kívül transzgenikus *Vigna unguiculata* növényeket alkalmaztak vakcinaként szolgáló kiméra vírus részecskék expressziójára [Dalsgaard K. és munkatársai: Növényi eredetű vakcina védi a célállatokat vírusbetegség ellen (Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease), *Nat. Biotech.* **15**, 248-252 (1997)].

A teljes növények (például a fent ismertetettek) alkalmazásának alapvető hátránya az, hogy a növényeket termesztetni kell, ami időtrábló és költséges, és az ipari léptékű termelés nagy természetterületet igényel. Ezen kívül a kívánt célanyagok teljes növényekből való elkülönítése általában komplex feldolgozási lépéseket igényel, különösen akkor, amikor a termékeknek egységesség és minőség szempontjából egyaránt magas követelményeket kell kielégíteniük (ez elsősorban gyógyászati vagy élelmezési célra felhasználandó anyagoknál fordul elő).

A második megközelítés szerint transzgenikus dohány sejttenyészeteket használnak fel antitestek termelésére. Leírták például antitestek expresszálasát és kiválasztását a tápközegbe [Magnuson N. S. és munkatársai: Kiválasztott emlős fehérje fokozott kinyerése genetikailag módosított dohánysejtek szuszpenziós tenyészetéből (Enhanced recovery of a secreted mammalian protein from suspension culture of genetically modified tobacco cells), *Prot. Expr. Pur.* **7**, 220-228 (1996)]. Mivel a heterológ fehérjék kinyerése sejtekből bonyolult művelet, lényeges javulást eredményez az, hogy a célfehérje a tápközegbe választódik ki. Biztonsági szempontok is szólnak a rekombináns, gyógyászatiilag fontos fehérjék sejttenyészetekben való termelése mellett, ugyanis a transzgenikus növényi sejtek kizárólag bioreaktorban képesek növekedni, és nem szükséges azokat szabaddá tenni. A szükséges tömegtenyésztés a heterotróf növényi sejtek nagyobb léptékű tenyésztésére alkalmas bioreaktorok kifejlesztésével vált lehetővé [lásd például Shuler M. L.



és munkatársai: A bioreaktor tervezés mint megvalósítást biztosító technológia biológiai sokféleség feltárására: a taxol esete (Bioreactor engineering as an enabling technology to tap biodiversity: The case of taxol), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **745**, 455-461 (1994)].

Ennek a második, növényi szuszpenziós tenyészetet alkalmazó megközelítésnek alapvető hátránya a kis növekedési sebesség, a szekunder metabolitok viszonylag lassú kialakulása, a termékképződés gátlása nagy sejtsűrűségeknél, ami kis térfogati termelékenységhez vezet, az aggregátumok és sejtfal-komponensek kialakulása, és a sejtek megnövelt érzékenysége a nyíróerőkre. Azt is számításba kell venni, hogy heterotróf sejttenyészetek alkalmazásakor mindig sok és esetenként drága komponensből álló komplex tápközeget kell használni. A megemlítendő legsúlyosabb hátrány azonban az, hogy a növényi *in vitro* sejttenyészetekben szomaklonális variációk alakulnak ki, ami mennyiségi és minőségi változásokat idéz elő a heterológ fehérjék termelésében [lásd például Jones M. G. K. és Lindsey K.: *Plant biotechnology, a Molecular biology and biotechnology* című szakkönyvben; szerkesztők: Walker J. M. és Gingold E. W., kiadó: Royal Soc. of Chem., Burlington House, London (1998); 2. kiadás]. A kialakult termék és működési jellemzőik heterogenitása különösen akkor elfogadhatatlan, ha ezeket gyógyszerekként vagy olyan más rendeltetésű anyagokként kívánjuk használni, amelyekre csak megfelelő minőségbiztosítás és standardizált termelési eljárás esetén adható forgalombahozatali engedély.

A találmány célja tehát az, hogy olyan eljárást biztosítson heterológ, fehérjeszerű anyagok standardizált előállítására növényi anyagokban, amellyel nemcsak a teljes növények alkalmazásának előzőekben leírt hátrányai, hanem a sejttenyészet-rendszerek alkalmazásának hátrányai is lényegében kiküszöbölhetők.

Ezt a célt a találmány szerint heterológ fehérjeszerű növényi anyagokban való anyagok előállítására szolgáló olyan új eljárással érjük el, amely szerint teljesen differenciált moha növényeket növesztünk standard körülmények között, és a termelt fehérjeszerű anyagokat lényegében a termelő szövetek vagy sejtek szétzúzása nélkül nyerjük ki a tenyésztő tápközegből.

A „fehérjeszerű anyag” kifejezés, ahogyan itt használjuk, magában foglalja a peptideket, polipeptideket és fehérjéket, valamint mindezek fragmentumait is, ame-



lyek elsősorban diagnosztikai, klinikai, gyógyászati és táplálkozási célokra használhatók. Ez a kifejezés magában foglalja továbbá azokat a molekulákat, amelyek peptid kötésekkel rendelkeznek, és amelyek növényi anyagokból transzlatálhatók.

A találmány egyik előnyös kiviteli módjában a kívánt heterológ fehérjeszerű anyag biológiailag aktív formájában kép ki a tenyésztő tápközegbe.

A „biológiailag aktív” kifejezésen a jelen leírásban azt értjük, hogy az adott céltermék rendelkezik a kívánt biológiai cél eléréséhez megkívánt vagy szükséges működési tulajdonságokkal. Ha például arra van szükség, hogy antitesteket állítsunk elő, a termelt fehérje vagy működőképes fragmentuma akkor biológiailag aktív, ha képes a várt specifikitással kötödni az antigénhez. Azok számára, akik a szakterületen járatosak, nyilvánvaló, hogy a teljes fehérje nem mindig szükséges az adott célra, hanem ki lehet kutatni azokat az epitópokat vagy kis molekulatömegű szerkezeteket, amelyek biztosítják a kívánt biológiai aktivitást vagy működőképességet. Így például egy enzim akkor aktív biológiailag, amikor képes átalakítani cél szubsztrátumát.

Egy találmány szerinti további előnyös kiviteli módban a növényi anyagot teljes moha növények formájában tenyésztjük tenyésztő tápközegben, amely lényegében mentes cukroktól, vitaminoktól és fitohormonoktól. Itt a cukrokon, vitaminokon és fitohormonokon ezek működőképes fragmentumait is értjük.

A találmány szerinti eljárás lehetőséget ad a teljesen differenciált növények fotoautotróf körülmények közötti standardizálható tenyésztésére, vagyis anélkül, hogy ehhez cukrok, vitaminok és fitohormonok és hasonlók hozzáadására lenne szükség, amint ezt igénylik a technika állása szerinti heterotróf szuszpenziós sejt-tenyésztő rendszerek. Mivel olcsó és egyszerű tenyésztő tápközegget alkalmazunk, a kívánt célanyagok kinyerésének és tisztításának lépései jelentősen könnyebbek lesznek.

Az alkalmazandó növényi anyag a találmány szerinti eljárásban előnyösen a lombos mohák és májmohák közül kiválasztott teljes mohanövény, amelyek közül különösen előnyösen a *Physcomitrella*, *Funaria*, *Sphagnum* és *Ceratodon* nemzetségekbe, továbbá a *Marchantia* és *Sphaerocarpos* nemzetségekbe tartozó fajok. A találmány szerinti eljárást legelőnyösebben a lombos mohák közé tartozó *Physcomitrella patens* alkalmazásával hajtjuk végre.



Egy további előnyös kiviteli módban a transzformáláshoz alkalmazott nukleinsav konstrukció nem csupán a kívánt fehérjeszerű anyagot kódolja, hanem egy tranzit peptidet is kódol az anyagnak a gazdasejtből a tenyésztő tápközegbe való kiválasztásához. Bármely autológ és heterológ nukleinsav szekvencia, amely szakemberek számára ismert, alkalmazható a találmány szerint, és alkalmazható egy expressziós kazetta kialakítására a termelő szövet transzformálásához. Endoplazmatikus retikulumhoz vagy celluláris transzporthoz különösen előnyös a szignál peptidek alkalmazása.

A jelen találmányhoz vezető munkánk azt igazolta, hogy sejttenyészetekben a szomaklonális változatok képződésével kapcsolatos fentebb leírt probléma nem létezik a mohák fotoautotróf folyékony tenyészteteiben. A találmány szerint alkalmazott mohák további előnye más rendszerekkel szemben az, hogy egymást világos sorrendben követő pontosan meghatározott differenciálódási lépései vannak (kloronéma, kaulonéma, rügy, gametofórák), amelyek növényi hormonok hozzáadásával befolyásolhatók (az indol-3-ecetsav indukálja a kaulonéma fejlődést, az izopentil-adenin indukálja a rügyek fejlődését) [lásd például Ashton N. W. és munkatársai: A gametofita fejlődés elemzése *Physcomitrella patens* mohában auxin- és citokinin rezisztens mutánsokat alkalmazva (Analysis of gametophytic development in the moss, *Physcomitrella patens*, using auxin and cytokinin resistant mutants), *Planta* 144, 427-435 (1979)]. Lehetségessé válik tehát heterológ fehérjék irányított, differenciálódás-specifikus expressziója bioreaktor-tenyészetekben, mimellett egy szinkronban osztódó, tiszta és így homogén kloronéma-tenyészet a bioreaktorban fellépő szabályozható, egységes fehérje termelése és hormonfüggő vagy differenciálódás-specifikus promóterekhez való felhasználhatósága alapján különösen előnyösen használható a találmány szerinti célokra.

Az ilyen expressziós rendszerek mellett indukálható promóter rendszer is alkalmazható a találmány szerint, különösen olyan fehérjék előállításához, amelyeknek rövid félélettartama van, vagy amelyek citotoxikusak; különösen előnyösen használható az alkalmazott *Agrobacterium tumefaciens* eredetű 1'-promóter.

A mohák találmány szerinti tenyésztése heterológ fehérjék termelésére gazdasági szempontokat figyelembevéve hatékonyan kivitelezhető például *Physcomitrella* alkalmazásával 20 ml és 6 l közötti vagy annál nagyobb (akár 10 liter



vagy azt is meghaladó) nagyságrendű térfogatban, rázott tenyészetekben vagy levegőztetett üvegtartályokban [lásd például Reski R.: A citokin-indukálható szövet differenciálódás és kloroplaszt osztódás sejt- és molekulárbiológiai kutatásai *Physcomitrella patens*ben (Hedw.) B. S. G.) (Zell- und molekularbiologische Untersuchungen der Cytokinin-induzierbaren Gewebedifferenzierung und Chloroplastenteilung bei *Physcomitrella patens* (Hedw.) B. S. G.), Doktori disszertáció, Hamburgi Egyetem (1990)]. Mivel itt differenciált, fotoautotróf növények tenyésztéséről van szó, a tápközegét sem növényi hormonokkal, sem vitaminokkal, sem cukrokkal nem kell kiegészíteni. Összehasonlítva azokkal a komplex tápközegekkel, amelyek például állati sejttenyészetekhez szükségesek, a költségek mintegy századára csökkennek. Azt tapasztaltuk, hogy a biológiailag aktív heterológ fehérje kitermelése a tenyésztő tápközegben mintegy 35-szörösére növekedhet PVP jelenlétében, ezért a PVP alkalmazása a tenyésztő tápközegben előnyös a találmány szerinti eljárásban.

A találmány szerint felhasználható lombos mohák, (mint például *Leptobryum pyriforme* és *Sphagnum magellanicum*) bioreaktorokban való tenyésztésére részletes információkat írnak le a technika állásában [lásd például Wilbert E.: Biotechnológiai tanulmányok mohák tömegtenyésztésével kapcsolatban, különös figyelemmel az arachidonsav mechanizmusra (Biotechnologische Studien Zur Massenkultur von Moosen unter besonderer Berücksichtigung des Arachidonsäurestoffwechsels), Doktori disszertáció, Mainzi Egyetem (1991); Rudolph H. és Rasmussen S.: Tanulmányok a bioreaktorokban tenyésztett *Sphagnum* szekunder metabolizmusáról (Studies on secondary metabolism of *Sphagnum* cultivated in bioreactors), *Crypt. Bot.* 3, 67-73 (1992)]. A jelen találmány céljaira különösen előnyös a *Physcomitrella* alkalmazása, különösen azért, mivel a szokásos molekuláris biológiai technikák mindegyike erre az organizmusra van alapozva [ennek áttekintésére lásd Reski R.: Mohák fejlődése, genetikai és molekuláris biológiája (Development, genetics and molecular biology of mosses), *Bot. Acta* 111, 1-15 (1998)].

Megfelelő transzformációs rendszert fejlesztettek ki *Physcomitrella* biotechnológiai felhasználáshoz heterológ fehérjék termelésére. Így például sikeres transzformálást hajtottak végre közvetlen DNS átvitelrel protonéma szövetbe a részecske puskát alkalmazva. Sikeres volt a PEG-közvetített DNS átvitel (transzfer) is moha



protoplasztokba. Ezt a transzformálási eljárást többször is leírták Physcomitrellához, és ezzel átmeneti és stabil transzformánsok egyaránt kialakíthatók [lásd például Reutter K. és Reski R.: Heterológ fehérje termelése teljesen differenciált moha növények bioreaktor tenyészetében; Szövettenyészet (Production of a heterologous protein in bioreactor cultures of fully differentiated moss plants; Tissue culture), *Biotech.* 2, 142-147 (1996)].

Bár a találmány alapvetően bármely fehérjeszerű anyag termelésére alkalmas, az alábbiakban gyógyászatilag fontos fehérje termeléséhez mutatjuk be ezt, a humán vaszkuláris endoteliális növekedési faktorra (VEGF) utalva.

A VEGF-et először Ferrara N. és Henzel W. J. izolálták [Hipofízis tüsző sejtek új heparin-kötő növekedési faktort választanak ki amely fajlagos a vaszkuláris endoteliális sejtekre (Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 851-858 (1989)] és azt normális fiziológiás körülmények között a szabályozott angiogenezishez és endoteliális sejtosztódáshoz szükséges szabályozó faktorként írták le [Ferrara N. és munkatársai: Polipeptidek vaszkuláris endoteliális növekedési faktor családjá (The vascular endothelial growth factor family of polypeptides), *J. Cell. Biochem.* 47, 211-218 (1991)]. A szerzők azt is kimutatták, hogy ez a növekedési faktor nagyon specifikusan hat a vaszkuláris endoteliális sejtekre, és más sejttípusokra nézve inaktív. A VEGF homodimer glikoprotein, amely diszulfid hidakkal van összekapcsolva. A humán VEGF-nek négy különböző formája ismeretes. A négy izoform 121, 165, 189 és 206 aminosav hosszúságú, és ezek a VEGF RNS alternatív összefonódásával alakulnak ki. A VEGF₂₀₆ csak a magzati máj cDNS-ben van bizonyítottan jelen, míg a VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, és VEGF₁₈₉ egy sor tumorsejtben és tumorszövetben van bizonyítottan jelen. Minden VEGF izoformnak van vezető (leader) szekvenciája a kiválasztáshoz, de csak a két legkisebb forma választódik ki hatékonyan [lásd például Martiny-Baron G. és Marmé D.: VEGF-közvetített tumor angiogenezis: új cél a rák terápiában (VEGF-mediated tumor angiogenesis: A new target for cancer therapy), *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 675-680 (1995)].

A jelenlegi tumorterápiás megközelítések továbbfejlesztése és javítása, valamint a VEGF jellemzése céljából megfelelő mennyiségű VEGF-re volt és van szükség. A találmánnyal összefüggően kivitelezett munkák korai szakaszában kizá-



rólág a VEGF rekombináns termelését ismertették rovarsejtekben Baculovirus expressziós rendszer segítségével [lásd például Fiebich B. L. és munkatársai: Funkcionálisan aktív humán vaszkuláris endoteliális növekedési faktor homodimerek szintézise és összeállítása rovarsejtekben (Synthesis and assembly of functionally active human vascular endothelial growth factor homodimers in insect cells), *Eur. J. Biochem.* 211, 19-26 (1993)]. A későbbiekben termelő organizmusokként *Saccharomyces cerevisiae* [Kondo S. és munkatársai: A *Saccharomyces cerevisiae* által termelt humán vaszkuláris endoteliális növekedési faktor/vaszkuláris permeabilitási faktor legrövidebb izoformja (VEGF/VPF₁₂₁) elősegíti mind az angiogenezist, mind a vaszkuláris permeabilitást (The shortest isoform of human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF₁₂₁) produced by *Saccharomyces cerevisiae* promotes both angiogenesis and vascular permeability), *Biochim. Biophys. Acta* 1243, 195-202 (1995)]. *Pichia pastoris* élesztő [Mohanraj D. és munkatársai: Biológiailag aktív humán vaszkuláris endoteliális növekedési faktor expressziója élesztőben (Expression of biologically active tumor vascular endothelial growth factor in yeast), *Growth Factors* 12, 17-27 (1995)] és *Escherichia coli* [Siemeister G. és munkatársai: A VEGF tumor angiogenezis faktor biológiailag aktív izoformjainak expressziója *Escherichia coli*-ban (Expression of biologically active isoform of the tumor angiogenesis factor VEGF in *Escherichia coli*), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222, 249-255 (1996)] használatát is ismertették. Ezen rekombináns rendszerek mindegyike biológiailag aktív VEGF-et termel. Az *E. coli* expressziós rendszer azonban bonyolult a fehérje tisztítását és helyreállítását illetően, mivel ez a fehérje zárványtestekbe van beágyazódva.

KIVITELI PÉLDÁK

Összefoglalás

A szabályozható *Physcomitrella patens* tömegtenyészetek [Reutter és Reski, előzőekben idézett munka] és a *Physcomitrella patens* lombos mohába való DNS-átviteli eljárás kidolgozása [Reutter K.: Heterológ gén expressziója *Physcomitrella patens* (Hedw.) B . S. G.-ben (Expression heterologer Gene in *Physcomitrella*



patens (Hedw.) B. S. G.), Doktori disszertáció, Hamburgi Egyetem (1994)] megteremtették az előfeltételeket ezen növény biológiai hasznosításához.

Az ezt követő munkák során a Reutter közleményéből [korábban idézett munka (1994)] ismert transzgenikus *Physcomitrella* vonalakat vizsgálva kimutattuk az integráció hosszútávú stabilitását. Például heterológ *nptII* és *gus* gének expressziója még négy év után is kimutatható.

A *Physcomitrella* bioreaktor tenyészetet optimalizáltuk. Olyan keverőt fejlesztünk ki, amely megvalósítja a protonemáták aprítását és így biztosítja a tenyészet kívánt homogenitását állandó, 300-500 fordulat/perc keverés mellett. Így lehetővé vált a standardizált mintavétel. Egyidejűleg a bejövő levegő sokkal egyenletesebben oszlik el a folyadéktenyészetben. Megállapítottuk, hogy ilyen körülmények között a biomassza- és fehérje-kifejlődés külső pH szabályozás nélkül ugyanúgy végbe megy, mint pH szabályozással; meglepő módon tehát ez utóbbi nem is szükséges. Félig folyamatos üzemben hetente literenként 500 mg biomasszát vagy 22 mg összes fehérjét kaptunk (száraz tömeg). Ez a biomassza termelésben ötszörös növekedést jelent egy hagyományos 5 literes lombiktenyészethez viszonyítva. A Knop tápközeg sókoncentrációját tizedére csökkentve hasonló értékekhez jutottunk, és így költségcsökkentést értünk el.

5 mmól/l ammónium-tartarát hozzáadása a lag fázis megrövidítése révén meggyorsította a biomassza kifejlődését. Egyidejűleg az ammónium-tartarát hozzáadása olyan tenyészetekhez vezetett, amelyek csaknem kizárólag klononéma sejteket tartalmaztak. Áramlási citometria segítségével kimutattuk, hogy a sejttenyészet sejtjeinek közel 100 %-a a sejtciklus G2/M fázisában van. Ezt az eredményt az auxinnal végzett további fiziológiai vizsgálatok és a *cal112* és *cal113* differenciálódás-specifikus mutánsokkal végzett vizsgálatok is alátámasztották, ami arra enged következtetni, hogy a kaulonéma sejtek az idő túlnyomó részében a G1/G0 fázisban vannak, míg a klononéma sejtek zömmel a G2/M fázisban vannak.

Egy promótert vizsgáltunk mohákban való indukálhatóságra; ehhez agrobakteriális 1'-promótert használtunk. A β -glukuronidáz (*gus*) gént alkalmaztuk marker génként. Az átmenetileg transzformált moha protoplasztokban (transzformálási arány = $3 \cdot 10^{-4}$) 5 mmól/l indol-3-ecetsavval való indukálás után a *gus* gén expresszióját észleltük. Expresszió nem észlelhető a kontrollok egyikében sem.

Az emberi vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF₁₂₁) 121 aminosavas összefonódási formájának génjét $0,5 \cdot 10^{-5}$ és $3,3 \cdot 10^{-5}$ közötti transzformálási arányokkal *Physcomitrella*-ba vittük át. Ebből a célból a gént a konstitutív 35S promóter mögé és a növényekhez használható pRT99 transzformációs vektorba klónoztuk. Egy második megközelítésben a megfelelő humán ER tranzit peptidet kódoló szekvenciát is klónoztuk. A kapott stabil transzformánsok Southern elemzésével igazolni tudtuk a heterológ DNS integrációját, és le tudtuk írni az integráció típusát. A Northern elemzés ezekben a transzformánsokban az nptII és a két VEGF átírat jelenlétét igazolta. A VEGF₁₂₁ mohasejtekben való expresszióját indirekt immunfluoreszcenciával igazoltuk. Konfokális lézer tapogató mikroszkóp segítségével egyértelműen kimutattuk, hogy a fehérje a sejtekben lokalizálódik. Ezek a vizsgálatok a tranzitpeptid nélküli transzformánsoknál azt mutatták, hogy a fehérje főleg a citoplazmában lokalizálódik. Azokban a transzformánsokban, amelyek még az ER tranzit peptidet is tartalmazzák, a fehérje a magterületekben és a csúcs sejtek csúcsterületeiben található igen nagy ER-tartalmú helyek. A találmány szerint előállított heterológ fehérje biológiai aktivitását ELISA vizsgálattal és két működési vizsgálattal igazoltuk, amiket a tenyésztő tápközegből kapott VEGF fehérjén hajtottunk végre.

Anyagok és eljárások

Hacsak a leírásban mást nem közlünk, az alkalmazott vegyszerek analitikai minőségűek voltak, és azokat az alábbi cégektől szereztük be: Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) és Sigma (Deisenhofen).

Az oldatokat tisztított, pirogénmentes vízzel készítettük, amit a továbbiakban mindig H₂O-val jelölünk; ezt a vizet Millipore-Q víztisztító rendszerből (Millipore, Eschborn) nyertük.

A restrikciós endonukleázokat, DNS-módosító enzimeket és molekuláris biológiai készleteket az alábbi cégektől szereztük be: AGS (Heidelberg), Amersham (Braunschweig), Applied Biosystems (Weiterstadt), Biometra (Göttingen), Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden),





Stratagene (Heidelberg) és Novagen (Madison, Wisconsin, USA). Hacsak mást nem közlünk, ezeket a gyártó útmutatásai szerint használtuk fel.

Vektorok és konstrukciók.

A pCYTEXP-VEGF₁₂₁ plazmid a pCYTEXP1 [Belev T. N. és munkatársai: Teljesen moduláris vektor rendszer a gén expresszió optimalizálásához *Escherichia coli*ban (A fully modular vector system for the optimization of gene expression in *Escherichia coli*), *Plasmid* 26, 147-150 (1991)] származéka, amelyben a humán VEGF₁₂₁ cDNS-e integrálva van *E. coli*ban való expresszióhoz. A VEGF₁₂₁ cDNS-t Nde I és Sal I restrikciós endonukleázokat alkalmazva kimetesszük a pCYTEXP-VEGF₁₂₁-ből, tisztítjuk, tompa végűvé tesszük, és a pRT101 [Töpfer R. és munkatársai: Növényi expressziós vektorok készletei transzkripciós és transzlációs fúziókhoz (A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions), *Nucleic Acids Res.* 15, 5890 (1987)] Sma I hasítási helyébe klónozzuk, a 35S promóter és a CaMV poliadenilező szekvenciája közé. Az így kapott kazettát Hind III-at alkalmazva kimetesszük, és a pRT99 transzformáló vektor Hind III restrikciós hasító helyébe klónozzuk. A pRT99 egy többszörös klónozó helyen kívül a neomicin foszfortranszferáz gént is tartalmazza a 35S promóter és a CaMV megfelelő poliadenilező szekvenciája szabályozása alatt [Töpfer R. és munkatársai: Sokoldalú klónozó vektorok átmeneti gén expresszióhoz és közvetlen génátvitelkor növényi sejtekben (Versatile cloning vectors for transient gene expression and direct gene transfer in plant cells), *Nucleic Acids Res.* 16, 8725 (1988)]. Ez a gén a stabilan transzformált növényekben G418 antibiotikum-rezisztenciát biztosít. A plazmidokat *Escherichia coli* DH5 α törzsben többszörözzük [Sambrook J. és munkatársai: *Molecular cloning: a laboratory manual*; kiadó: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)].

Az eredetileg VEGF₁₂₁ rovarsejtekben való expresszáására kialakított pVE-121 vektorból, ami a VEGF₁₂₁ szekvencián kívül még azt a természetes tranzit peptidet kódoló DNS-t is tartalmazza, amely állati sejtszervekben az endoplazmatikus retikulumon keresztül közvetíti a kiválasztást a tápközegbe [Fiebich és munkatársai: Funkcionálisan aktív humán vaszkuláris endoteliális növekedési faktor homodimerek szintézise és összeállítása rovarsejtekben (Synthesis



and assembly of functionally active human vascular endothelial growth factor homodimers in insect cells), Eur. J. Biochem. 211, 19-26 (1993)], Bam HI és Bgl II restriktációs enzimeket alkalmazva kimetsszük a cDNS-t, majd ezt pRT101 felhasználásával pRT99-be klónozzuk, és ellenőrizzük ennek megtörténtét.

A pNA201 plazmid a pBI101 binér vektor [Jefferson A. R. és munkatársai: Kiméra gének vizsgálata növényekben: a GUS gén fúziós rendszer (Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system), Plant Mol. Rep. 5, 387-405 (1987)] származéka. Ez tartalmazza az nptII gént a nopalín szintetáz promóter alatt mint szelekciós markert növények számára. A gus gént, amely szintén jelen van, az *Agrobacterium tumefaciens*-ből származó 1'-promóter szabályozza. A pNA201 alkalmas a *Physcomitrella patens* közvetlen transzformálására.

Antitestek

A VEGF fehérje ellen két különböző antitestet alkalmazunk. Az első antitest egy nyúl-anti-VEGF antitest, és a natív humán VEGF 1-20 aminosavjainak megfelelő szintetikus peptid ellen irányul [Fiebich és munkatársai: előzőekben idézett munka (1993)]. A második antitest egy monoklonális egér antitest, amely a humán VEGF₁₂₁ fehérje ellen irányul (R & D Systems, Wiesbaden).

Növényi anyagok

A *Physcomitrella patens* (Hedw.) B. S. G. lombos moha vad típusú törzsét alkalmazzuk, amely a Genetics Group at the Department of General Botany, Hamburgi Egyetem, gyűjteményéből származik. Ennek eredete a 16/14 törzs, amelyet a H. L. K. Whitehouse in Gransden Woodban (Huntingdonshire, Anglia) gyűjtöttek, és amelyet spórából altenyésztettek.

A vad típusú törzsét vagy folyékony tenyészetben tenyésztjük Knop tápközeggel (Reski R. és Abel W. O.: Csírázás indukciója a *Physcomitrella patens* moha klonemátáin- és kaulonemátáin izopentenil-adenint alkalmazva (Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine), *Planta* 165, 354-358 (1985), vagy 1% Oxoid-agart (Unipath, Basingstoke, Anglia) tartalmazó szilárd Knop tápközegen tenyésztjük. A

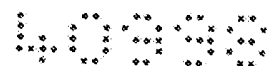


folyékony tenyésztést Reski módszerével végezzük [lásd korábban idézett munka (1990)].

Bioreaktor-tenyészet

Tömegtenyésztés céljára a növényi anyagot bevezetjük egy kettős köpennyel ellátott, 7 literes, kerekfenekű üveglombik bioreaktorba (Applikon Biotek, Knüllwald). Ebbe a bioreaktor-rendszerbe a fedélben kialakított furatokon keresztül a tenyésztőtérbe nyúlóan sav, bázis és tápközeg bejuttatására szolgáló használt levegő kondenzátort, levegőztető csövet, pH elektródot (Conducta, Gerlingeng), hőmérséklet érzékelőt, keverő szerkezetet, mintavevő csövet és bevezető csöveket illesztünk. A tenyésztést 25°C hőmérsékleten végezzük, és a hőmérsékletet a kettős köpennyel összekapcsolt, megfelelően beállított vízfürdő segítségével szabályozzuk. Azokban a kísérletekben, amelyeket pH szabályozással végzünk, a pH-t állandóan 5,8 értéken tartjuk egy titráló egység segítségével. A hőmérsékletmérést és a pH szabályozást Biocontroller ADI 1030 berendezéssel (Applikon Biotek, Knüllwald) hajtjuk végre. A keverési sebesség ADI 1012 motorszabályozó (Applikon Biotek, Knüllwald) segítségével változtatható. A tenyésztő tápközegét állandóan levegőztetjük 10^5 Pa levegővel, amit porózus injektáló elemen keresztül juttatunk be. Abból a célból, hogy biztosítsuk a sterilitást a tenyésztő edényben, az összes levegő bevezető és kivezető nyílást sterilizáló szűrővel (Midisart, 0,2 μm ; Sartorius, Göttingen) látjuk el. A bioreaktoros tenyésztést oldalról megvilágított (fehér fény; Osram L 40 W/20; maximum $100 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) tenyésztőfülkében végezzük. A tenyészeteket 1 liter a bioreaktor-térfogatra számítva 0,5 -1 g nedves tömegű növényi anyaggal inokuláljuk steril körülmények között. A mintavevő cső a keverővel azonos szinten van elhelyezve, így a kevertetés közben biztosítható az egyenletes mintavétel. A kis mintamennyiségeket (<100 ml) steril fecskendővel vesszük Luer reteszcsatlakozáson keresztül, míg a nagy mintatérfogatokat például 501 RI fejjel ellátott 302/3A típusú perisztaltikus szivattyúval (Sartorius, Göttingen) vesszük.

A Knop tápközeghez 5 mmól/l ammónium-tartarátot adva alakítjuk ki a vad típus kloronéma tenyészeit.



Ha polivinilpirrolidon (PVP) stabilizálószer van jelen a tenyésztő tápközegben, jelentősen növelhető a kiválasztódott biológiailag aktív heterológ fehérje hozama.

A kaulonéma differenciálódása, amely a protonéma kifejlődése során megy végbe, indukálható és növelhető fiziológiai mennyiségű auxin külső hozzáadásával; a megfelelő koncentráció például $5 \mu\text{mol/l}$ indol-3-ecetsav (IAA) lehet.

A transzformánsok folyékony tenyészetének szelekciós nyomás alatti létrehozásához 50 mg/l G418 antibiotikumot (Calbiochem, Bad Soden) adunk a Knop tápközeghez. Ebből a célból a tenyészetet minden tízedik napon közvetlenül az aprítás előtt $100 \mu\text{m}$ -es steril szűrőkön szűrjük át (Wilson Sieves, Nottingham, Anglia) és átvisszük egy szelekciós tápközeggel töltött Erlenmeyer lombikokba.

A tápsó-vizsgálatokhoz a Knop tápközéget 1:10 arányban hígítjuk vízzel.

Transzformálás

Transzformálási eljárásként a Reutter és Reski által ismertetett [az előzőekben idézett munka (1996)] PEG-közvetített, protoplasztokba történő közvetlen DNS átvitelt választottuk. $50 \mu\text{g}$ plazmid DNS-t alkalmazunk $3 \cdot 10^5$ protoplaszthoz minden transzformálásban. Ha mást nem közlünk, a protoplaszt regenerálására és a stabil transzformánsok kiválasztására Reutter és Reski módszerét [az előzőekben idézett munka (1996)] használjuk.

Közvetett immunfluoreszcencia

Puffer: MSB: 100 mmol/l PIPES; $5\text{-}10 \text{ mmol/l}$ EGTA, 5 mmol/l MgSO_4 , pH 6,8;

F-MSB: MSB + 5% DMSO;

E-MSB: MSB + 5% DMSO + 5% Nonidet;

W-MSB: MSB, 1:2 arányban hígítva vízzel (mosó puffer).

Enzim oldat: 1 % celluláz, 1% pektináz, 2% drizeláz

MSB-ben, pH 5,6 (minden enzim a Sigma

cégtől,

Deisenhofen, Németország).



A moha protonemátát F-MSB-ben levő 1,25% glutáraldehidben (térfogat/térfogat) rögzítjük, legfőljebb 10 percig inkubáljuk, és rövid ideig mossuk W-MSB-vel. Ezután a protonemátát MSB-ben levő 2%-os (térfogat/térfogat) paraformaldehiddel 40 percen át inkubáljuk, és háromszor mossuk W-MSB-vel (öblítés 1x, mosás 2x 5-5 percen át).

A ki nem mosható szabad aldehideket MSB és egy spatulahegynyi szilárd bórhidrid hozzáadásával redukáljuk 10 perces inkubálási idővel. A bórhidridet három mosással távolítjuk el W-MSB-vel.

A következő lépésben az enzimoldattal végzett 10 perces kezeléssel a sejtfalakat áteresztővé tesszük. Az enzimikus reakciót a pH változtatásával állítjuk le (MSB; pH 6,8). A keveréket ismét háromszor mossuk W-MSB-vel.

A klorofilket detergens oldattal végzett 120 perces inkubálással extraháljuk. Az oldatot ezután W-MSB-vel végzett háromszori mosással eltávolítjuk.

Ez után az előkészítési munkamenet után a moha protonemátákat már inkubálhatjuk a primer antitesttel (anti-VEGF; hígítás: 1/50). Ezt 37°C hőmérsékleten végezzük 45 percen át. W-MSB-vel végzett három mosás után hozzáadjuk a jelzett szekunder antitestet [anti-nyúl és anti-egér; hígítás: 1:30; jelzés fluoreszcein izotiocianáttal (FITC) (Molecular Probes, Leiden, Hollandia)] és az elegyet 45 percig 37°C hőmérsékleten inkubáljuk. Az előzőek szerinti 3 mosási lépésen kívül a keveréket egyszer mossuk W-MSB+0,1% tritonnal. A protonemátát ezt követően felvesszük W-MSB-ben és 4°C hőmérsékleten tároljuk legalább egy éjszakán át.

Az anyagot TCS 4D típusú konfokális lézer tapogató mikroszkóppal (CLSM; (Leica Lasertechnik, Heidelberg), Scanware 5.0 szoftver (Leica, Heidelberg) segítségével értékeljük.

CLSM vizsgálat céljára a mintákat montírozó oldatban (Dabco, Sigma, Deisenhofen) tárgylemezre helyezzük. A szekunder antitesthez kapcsolt FITC fluoreszcens festék gerjesztését argon-kripton lézer segítségével végezzük 448 nm hullámhossznál. A FITC a fényt 528 nm-nél emittálja.



ELISA vizsgálat

A megfelelően transzformált moha növényekben kialakult és a tenyésztő tápközegben megjelent VEGF fehérje minőségi és mennyiségi meghatározását hagyományos ELISA vizsgálattal végezzük, az előzőekben leírt antitesteket alkalmazva. Az ELISA-teszthez közvetlenül 200 μ l tenyésztő tápközéget adunk.

Funkcionalitási vizsgálatok

A tenyésztő tápközegből kapott, rekombináns módon kialakult VEGF biológiai aktivitását mitogén vizsgálattal [Miyazono és munkatársai: Humán vérlemezkékből való endoteliális sejt növekedési faktor tisztítása és tulajdonságai (Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets), *J. Biol. Chem.* **262**, 4098-4103 (1987)] és „13. napi choricallontoin-membrane angiogenezis” vizsgálattal („Day-13 choricallantoic-membrane angiogenezis assay”) [Willing és munkatársai: A nyúl szaruhártya vizsgálat morfológiai tanulmányai (A morphological study of the rabbit corneal assay), *Anat. Embryol.* **183**, 1167-1174 (1991)] ellenőrizzük. A tenyésztő tápközéget előzőleg ultraszűrésnek vetjük alá, majd liofilizáljuk és újra szuszpendáljuk pufferban. Kivánt esetben további tisztítási lépést is végezhetünk kation oszlopot alkalmazva.

Az 1'-promóter indukálása

Az 1'-promóter auxinnal való indukálhatóságát 5 μ mól/l indol-3-ecetsavval (IAA) vizsgáljuk. 5 nappal a transzformálás után a pNA201-gyel végzett transzformálási reakció 100 μ l-es protoplaszt alikvotjait átvisszük egy 96 üreges mikrotitráló lemez (Nunc, Wiesbaden, Németország) üregeibe. A protoplaszt szuszpenziókat 5 órán át inkubáljuk IAA-val, (végkoncentráció = 5 μ mól/l). Az indukációs kísérleteket közvetlenül az inkubációs időszak után értékeljük minőségi β -glukuronidáz vizsgálat segítségével.

Minőségi β -glukuronidáz vizsgálat

A β -glukuronidáz aktivitást minőségi vizsgálattal határozzuk meg [Jefferson A. R.: Kiméra gének vizsgálata növényekben: GUS gén fúziós rendszer (Assaying



chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system), Plant Mol. Rep. 5, 387-405 (1987)].

Szubsztrátum puffer: mmól/l $K_3Fe(CN)_6$; 50 mmól/l Na_2HPO_4 ;
mmól/l $K_4Fe(CN)_6$; 1% (térfogat/térfogat)
triton X-100; 50 mmól/l NaH_2PO_4 ; 10 mmól/l
EDTA (pH 7,0); 4 mg/ml PVP (molekulatömeg 10 000).
Festő oldat: 12,5 mg 5-bróm-4-klór-3-indolil-glukuron-sav (Biomol,
Hamburg, Németország), feloldva 250 μ l N,N-dimetil-
formamidban /50 ml szubsztrátum puffer.

Moha protonemátát és moha protoplasztokat Knop- vagy regeneráló tápközegben inkubálunk maximum 72 órán át 37°C hőmérsékleten azonos térfogatú festő oldatban, és közvetlenül ezután értékeljük mikroszkóp alkalmazásával.

Eredmények

A bioreaktor-tenyészet homogenitása; mintavétel

Sejttenyészet esetén csak homogén tenyészetekből vehető minta standardizált módon. A protonéma hosszú sejtrostokká való növekedése hosszabbodott tenyésztési idő után gyakran sejt-aggregátumok képződéséhez vezet, és ekkor a növényi anyag inhomogénean oszlik el a folyékony tenyészetekben. Abból a célból, hogy elkerüljük az ilyen aggregálódást, a protonémákat adott időközönként aprítjuk (ezt bioreaktorban a 10. nap elteltével minden második napon, rázatott tenyészetben minden 12. napon végezhetjük), nagy forgási sebességű keverőket/homogenizálókat alkalmazva. Abból a célból, hogy a bioreaktorban még hosszú termesztési időtartalom során is a körülmények folyamatosan fenntarthatóak legyenek és ugyanakkor a standardizált mintavétel is elérhető legyen, célszerű a három keverőlapátos turbina keverőt úgy módosítani, hogy a keverőlapátok éleit leköszőrüljük, és így ezeket nyírólapátokká alakítjuk. Az állandó 300-500 fordulat/perc sebességű „kevertetés” lehetővé teszi, hogy homogén bioreaktor-tenyészetek alakuljanak ki.



A biomassza fejlődés [szárazanyag (mg/l)] 35 napos időtartam (840 óra) alatt a turbinakeverővel 500 fordulat/perc sebességgel kevert a kontroll tenyészetekben azonos a nyírólapátos keverővel kevertetett bioreaktor-tenyészetekben elért értékkel.

A tenyészet homogenitását úgy becsüljük meg, hogy minden esetben hat párhuzamos mintát hasonlítunk össze. Összehasonlításra a 100 ml mintában lévő növényi anyag száraz tömegét határozzuk meg. Amikor módosítatlan turbina-keverőt használunk a biomassza koncentrációjának növekedésével nő a standard eltérés. A nyírólapátos keverővel végzett kevertetés következményeképpen a kivett minták standard eltérése kicsiny marad. Ez azt a következtetést teszi lehetővé, hogy a módosított keverőt használva 35 napos időtartam során egységesen homogén tenyészet kapható.

Az 1'-promóter indukálhatóságának vizsgálata

A pNA201 plazmidban az 1'-promóter a gus géntől „felfelé” (upstream) helyezkedik el és szabályozó elemként működik. Mohán végzett indukciós vizsgálatokban az ismert β -glukuronidáz vizsgálat alkalmas az expresszió kimutatására. A transzgenikus dohánnyal végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy nagy auxintartalmú szövetekben az 1'-promóter β -glukuronidáz expressziójához vezet, így ez a promóter auxin-függőnek tekinthető. *Physcomitrella patens*-ben az 1'-promóter auxinnal való indukálhatóságát ideiglenesen transzformált protoplasztokon vizsgáljuk.

A transzformációs reakciókeverékeket 5 $\mu\text{mol/l}$ indol-3-ecetsavval (IAA) végzett 5 órás inkubálás után inkubálás nélkül vetjük alá β -glukuronidáz vizsgálatnak. A kontrollokban IAA hozzáadása nélkül a mikroszkóp alatti vizsgálat a reakciókeverékek egyikében sem tár fel kék protoplasztokat. Ezzel ellentétben az auxinnal inkubált protoplasztok vizsgálata a gus gén expresszióját igazolja. A kék protoplasztokra alapozva $3 \cdot 10^{-4}$ transzformációs arányt érünk el. Ez világosan jelzi, hogy átmenetileg transzformált moha protoplasztokban az 1'-promóter indukálható az auxin növényi hormon révén.



Vektorok kialakítása a VEGF transzformálásokhoz

Abból a célból, hogy a vezető szekvencia nélküli VEGF₁₂₁ cDNS-ét (amelyeket a továbbiakban VEGFC-nek nevezünk) és a vezető szekvenciát tartalmazó VEGF₁₂₁ cDNS-ét (amelyet a továbbiakban VEGFP-nek nevezünk) *Physcomitrella*-ba transzformáljuk, a szekvenciákat egy növények számára alkalmas promóter/terminátor egység közé kell klónozni. Erre a célra 35S CaMV promótert és a megfelelő poliadenilező szignált választottunk. A megfelelően előkészített VEGF cDNS szekvenciákat a pRT101 vektor többszörös klónozó helyének Sma I restrikciós hasító helyébe klónozzuk.

A kapott vektorokat (pRT101 VEGFC 3 és VEGFP 21) szekvencia elemzésnek vetjük alá a 35S promóter terminális területéről levezetett primerrel, és vizsgáljuk az integráció helyességét a promóter és a poliadenilező hely között.

A kapott kazettákat Hind III restrikciós enzimmel kimetsszük, és a pRT99 tényleges transzformációs vektor Hind III hasítási helyébe klónozzuk (pRT99 VEGFC 3 és VEGFP 21). A kazetták NPTII kazettához viszonyított orientációját Sma I-vel és Hinc II-vel végzett hatással határozhatjuk meg. Promóter → poliadenilező szignál orientáció esetében egy 5250 bp-s (VEGFC) és egy 5380 bp-s (VEGFP) fragmentumot kapunk, miközben az ellenkező orientáció egy 1100 (VEGFC)/1230 (VEGFP) bp-s és egy 4150 bp-s (VEGFC és P) fragmentumot ad. A restrikciós elemzés csak egy 5250/5380 bp-s fragmentumot tár fel, tehát a pRT99 nptII génjéhez viszonyított promóter → poliadenilező szignál orientációban megtörtént a VEGFC/P kazetták beépülése.

VEGFC transzformációk *Physcomitrella*-ba

A VEGFC konstrukció transzformálásának abszolút transzformációs aránya vad típusú protoplasztokban állandó transzformáns-stabilitás mellett, többszöri Knop tápközeg/szelekciós tápközeg váltás után $0,5 \cdot 10^{-5}$.

A transzformált plazmid integrációjának kimutatása

A növényi genomba való integrálás megtörténtét Southern hibridizálással mutattuk ki.



Próbákként egyrészt a pRT99-ből származó nptII gén Nco I fragmentumát, másrészt a pCYTEXP-VEGF₁₂₁-ből származó VEGFC Nde I/Sal I fragmentumát használtuk.

A transzformánsok hasítatlan teljes DNS-ében kimutatott szignálok igazolják a plazmid DNS sikeres integrációját a növényi genomba. Azt, hogy a 35S VEGFC poli-A kazetta integrálódás után teljes maradt-e, Hind III-mal végzett hasítással vizsgáljuk. Ha integráció után a kazetta ép marad, ez a restriktív enzim a teljes DNS-ből egy 1100 bp-s fragmentumot hasít ki.

A VEGFC próbával vizsgált hibridizációs mintánál transzformánsnál egy 1100 bp-s fragmentum mutatható ki. Ezt az igazolja, hogy megtörtént a teljes VEGFC expressziós egység integrálódása, ami a VEGF₁₂₁ mohában való helyes transzkripciójának és expressziójának előfeltétele.

A heterológ gének transzkripciójának kimutatása

A transzformánsok VEGFC és NPTII heterológ génjeinek átíratát nem-radioaktív DIG kimutató rendszerrel mutatjuk ki, a VEGF és az NPTII próbákat alkalmazva. A fluorogramban kimutatott átíratok mérete 760 nukleotid a VEGFC átíratnál és 1100 nukleotid az NPTII átíratnál, tehát ezek a várható nagyságrenden belül vannak. Amint várható, a két heterológ átírat egyike sem mutatható ki a WT kontrollban.

A transzformánsok elemzése humán tranzit peptiddel

50 µg pRT99P 21 plazmid PEG-közvetített DNS átvitele transzformációs reakciónként olyan transzformánsokat alakít ki, amelyek tartósan stabilak szelekciós tápközegen. Ebből a stabil transzformációs arány $3,3 \cdot 10^{-6}$ -nak adódik.

A transzformált plazmid integrálódásának kimutatása

Az előzőekben leírt transzformánsok integrációját tranzit peptiddel az előzőekben leírt Southern hibridizációval mutatjuk ki, a leírt próbákat alkalmazva. A Hind III-mal hasított teljes DNS hibridizálása a VEGF próbával egy 1230 bp-s fragmentumot mutat ki, ami azt igazolja, hogy a teljes 35S VEGFP poli-A kazetta integrálódott.



A heterológ gének transzkripciójának kimutatása

Mind az NPTII, mind a VEGF átíratok kimutathatók az előzőekben körvonalazott eljárással.

A humán VEGF₁₂₁ kimutatása transzgenikus mohasejtekben konfokális lézer tapogató mikroszkópot alkalmazva

Ebben az eljárásban a vizsgálandó fehérjét közvetlenül jelezzük rögzített sejtekben. Az értékelést konfokális lézer tapogató mikroszkóp alatt végezzük, ami a szokásos fénymikroszkóphoz képest javított felbontóképességgel rendelkezik.

A rekombináns VEGF₁₂₁ fehérjének – ha kimutatható a mohasejtekben – a citoplazmában kell felhalmozódnia a VEGFC transzformánsokban. VEGFP transzformánsok esetén ennek az ER kell kimutathatónak lennie rendszerben, ha a tranzit peptid szignálként működik a mohában.

A közvetett immunfluoreszcenciás eljárás és a számítógéppel értékelt konfokális lézer tapogató mikroszkópos adatok a humán VEGF₁₂₁ expresszióját igazolják transzgenikus mohasejtekben. Az adatok azt is igazolják, hogy transzgenikus mohában a VEGF₁₂₁ sikeresen szállítódik át az endoplazmás retikulumba a megfelelő humán tranzit peptid jelenlétében.

A VEGF jelenlétének vizsgálata a tenyésztő tápközegben

A tenyésztő tápközeg 200 µl-es alikvotját PVP jelenlétében ELISA-val vizsgáljuk. Ez a vizsgálat azt mutatja, hogy a tranzit peptid kódoló szekvenciát magában foglaló expressziós kazettával transzformált moha növények képesek VEGF-et kibocsátani a tápközegbe. A pozitív eredmények arra engednek következtetni, hogy egy működőképes VEGF fehérje van jelen.

A biológiai aktivitás vizsgálata

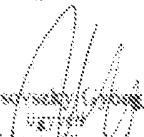
Mindkét vizsgálat, amelyet a tenyésztő tápközegbe kibocsátott VEGF fehérje biológiai aktivitásának igazolására alkalmazunk, pozitív eredményeket ad, és igazolja, hogy a találmány szerint előállított VEGF kinyerhető a tenyésztő tápközegből a kívánt biológiai aktivitással.



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás heterológ fehérjeszerű anyagok előállítására növényi anyagban azzal jellemezve, hogy moha protonéma szövetet alkalmazunk növényi anyagként, és a termelt fehérjeszerű anyagokat a termelő szövetek vagy sejtek szétzúzása nélkül nyerjük ki a tenyésztő tápközegből.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a tenyésztő tápközegbe kibocsátott fehérjeszerű anyag egy antigénhez specifikusan kötődni képes anyag vagy egy enzimaktivitással rendelkező anyag.
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy olyan tenyésztő tápközegét alkalmazunk, amely mentes cukroktól, vitaminoktól vagy fitohormonoktól.
4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy mohaszövetként lombos moha- vagy májmoha-szövetet használunk.
5. A 4. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy mohaszövetként a lombos mohák közé tartozó Physcomitrella, Funaria, Sphagnum vagy Ceratodon mohaszövetet használunk.
6. A 4. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy mohaszövetként a májmohák közé tartozó Marchantia vagy Sphaerocarpos mohaszövetet használunk.

A meghatalmazott:


Dr. László Csörgő
1093 Budapest, Kőenyák u. 24.
Tel: 718-0148 Fax: 218-4508