



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **306024**

(13) B1

(51) Int Cl⁶ C 12 N 15/53, 9/04, 1/19

Patentstyret

| | | | |
|------------------------------|--|--------------------------------------|----------------------------|
| (21) Søknadsnr | 19900770 | (86) Int. inng. dag og søknadsnummer | 20.06.1989, PCT/US89/02696 |
| (22) Inng. dag | 19.02.1990 | (85) Videreføringsdag | 19.02.1990 |
| (24) Løpedag | 20.06.1989 | (30) Prioritet | 21.06.1988, US, 209530 |
| (41) Alm. tilgj. | 23.04.1990 | | 19.06.1989, US, 366377 |
| (45) Meddelt dato | 06.09.1999 | | |
| (83) Mikroorganisme deponert | ATCC nr. 67731, 40619, 68012 | | |
| (73) Patenthaver | Chiron Corp, 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608-2916, US | | |
| (72) Oppfinner | Steven Rosenberg, Oakland, CA, US | | |
| (74) Fullmektig | Curo AS, 7231 Lundamo | | |

(54) **Benevnelse** **Rekombinant vektor omfattende gensekvens som koder for glykoseoksidase, transformert vertscelle, modifisert glukoseoksidase og produksjon av glykoseoksidase i rekombinante systemer**

(56) **Anførte publikasjoner** US 3701715

(57) **Sammendrag**

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer rekombinante polynukleotider som koder for glukose oksydase (GO). Det tilveiebringes også rekombinante ekspresjonssystemer som produserer, og om ønsket, utskiller aktivt GO og GO-analoger til det ekstacellulære medium.

Den foreliggende oppfinnelsen angår bruk av rekombinant DNA-teknologi til produksjon av proteiner for industriell anvendelse. Nærmere beskrevet er den foreliggende oppfinnelsen rettet mot rekombinante vektorer som inneholder et polynukleotid avledet fra sopp, som koder for et polypeptid med glukoseoksidase-aktivitet, mot vertsceller som er transformert med rekombinante polynukleotider, mot ikke-naturlige polypeptid og mot en framgangsmåte for framstilling av et rekombinant polypeptid.

Bakgrunn

Teknikkene innen genetisk manipulering er blitt anvendt med hell innen den farmasøytiske industri med flere nye produkter som resultat. I økende grad er det blitt åpenbart at de samme teknologier kan anvendes i stor skala til produksjon av enzymer som har verdi i andre industrier. Fordelene ved å oppnå kommersielt nyttige prosesser gjennom genetisk manipulasjon er forventet å inkludere kostnadsbesparelser i enzymproduksjon, produksjon av enzymer i organismer som generelt er gjenkjent som sikre ved anvendelse i matprodukter, og spesifikke genetiske modifikasjoner på gen-nivå for å forbedre enzymets egenskaper, slik som termisk stabilitet og utførelses-karakteristikker, så vel som de som ville lette rensing av enzymer.

Glukoseoksidase er det enzymet som katalyserer oksidasjonen av glukose til glukonsyre med den medvirkende produksjon av hydrogen peroksid. Enzymet har mange industrielle anvendelser, inkludert dets bruk i avsukring av egg, i fjerning av oksygen fra drikker, fuktige matprodukter, aroma, og hermetisert mat, og i identifisering og måling av glukose i industrielle løsninger, og i kroppsvæsker slik som blod og urin.

Glukoseoksidase ble først isolert fra celler av *Aspergillus niger* av Muller (*Biochemische Zeitschrift* (1928), 199, 136-170 og (1931), 232, 423-424), og ble også ekstrahert fra *A. niger* av Franke og Deffner (*Annalen der Chemie* (1939), 541, 117-150). Produksjonen av glukoseoksidase fra arter av *Penicillium chrysogenum*, *penicillium glaucum*, *Penicillium purpurogenum*, *Aspergillus niger* og *Aspergillus fumaricus* er beskrevet av Baker i US patentskrift nr. 2 482 724. En framgangsmåte for tilvirking av glukoseoksidase, der glukoseoksidase-produserende generasjoner av slektene *Aspergillus* og *Penicillium* er kultivert i medium med et lavt innhold av karbohydrater, er beskrevet i US patentskrift nr. 3 701 715. Enzymet fra *Aspergillus niger* (*A. niger*) er renset til en høy renhet, og er blitt rapportert med en molekylvekt på omtrent 150 000, et isoelektrisk punkt på 4.2 og et innhold av flavin adenin dinukleotid (FAD) på 2 FAD per mol. Pazur og Kleppe (1964), *Biochemistry* 3, 578-583. Aminosyre- sammensetningen i enzymet fra *A. niger*, så vel som

dets identitet som et glycoprotein er også kjent. Pazur et al. (1965), Arch. Biochem. Biosys. 111, 351-357. Imidlertid er verken aminosyresekvensen for glukoseoksidase eller nukleotidsekvensen som koder det kjent.

Et problem ved anvendelse av glukoseoksidase isolert fra dets naturlige kilde er at
5 organismene som produserer enzymet kan inneholde forurensninger som er ødeleggende for visse anvendelser av det ønskete protein. For eksempel er glukoseoksidase brukt ved den kommersielle tilvirking av matvarer. *A. niger*, som er en hovedkilde ved kommersielt produserte enzymer, er imidlertid sterkt allergifremkallende, og er ikke godkjent for bruk i mat. Høyeffektive rensemetoder kan være forholdsvis kostbare siden glukoseoksidase
10 primært er et intracellulært enzym. Disse problemene kunne løses ved produksjon av glukoseoksidase i rekombinante systemer.

Soppenzymer er blitt uttrykt fra rekombinante vektorer. Glykoamylase fra *Aspergillus* (Innis et al (1985), Science 228, 21-26) og endoglykanase I fra *Trichoderma reesei* (Van Arsdell et. al. (1987), Biotechnology 5, 60-64) er blitt uttrykt i *Saccharomyces cerevisiae*.

15

Referanser som er henvist i det etterfølgende

Barr et al (1986), Biotechniques 4, 428.

Boel et al (1984), Embo J. 3, 1581.

20 Botstein et al. (1979), Gene 8:17.

Broach (1981), i Molecular Biology Of The Yeast *Saccharomyces*, vol. 1, s. 445.

Chang et al. (1977), Nature 198, 1056.

Chirgwin et al. (1979), Biochemistry 18, 5294.

Clewell et al. (1969), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 1159.

25 Clewell et al. (1972), J. Bacteriol. 110, 667.

Cohen (1972), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110.

De Boer et al. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 292, 128.

Edge (1981), Nature 292, 756.

Ehrhart og Hollenberg (1983), J. Bacteriol. 156, 625.

30 Gate, ed. (1984), Oligonucleotide Synthesis.

Glisin (1974), Biochemistry 13, 2633.

Glover, ed. (1985), DNA Cloning: vol. 1 og vol. 2.

Goeddel et al. (1980), Nucleic Acids Res. 8, 4057.

Graham og Van der Eb (1978), Virology 52, 546.

- Grunstein og Hogness (1975), Proc.Natl.Acad.Sci. USA 73, 6961
- Hames & Higgins, forf. (1985), Nucleic Acid Hybridization
- Hammerling et al. (1981), Monoclonal Antibodies And T-cell Hybridomas.
- Hess et al. (1968), J. Adv. Enzym Reg. 7, 149.
- 5 Hinnen et al. (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929.
- Hitzemann (1980), J. Biol. Chem. 255, 2073.
- Holland (1978), Biochemistry 17, 4900.
- Holland (1981), J. Biol. Chem. 256, 1385.
- Huynh et al. (1985), DNA Cloning, A Practical Approach (D.M. Glover, IRL Press, S. 47-
10 78).
- Innis et al. (1985), Science 228, 21.
- Jay et al. (1984), J. Biol. Chem. 259, 6311.
- Kelley og Reddy (1986), J. Bact. 166, 269.
- Kennet et al. (1980), Monoclonal Antibodies.
- 15 Laemmli (1970), Nature 227, 680.
- Lei et al. (1987), J. Bacteriol 169, 1987.
- Malikkides og Weiland (1982), Biotech. Bioeng. 24, 1911.
- Maniatis et al. (1982), Molecular Cloning: A Laboratory Manual
- Maxam et al. (1980), Methods in Enzymology 65, 499.
- 20 Messing et al. (1981), Nucleic Acids Res. 9, 309.
- Messing (1983), Methods in Enzymology 101, 20-37
- Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.)
- Miller og Calos, (1987), Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J.H. Miller og M.P. Calos, Cold Spring Harbor Laboratory)
- 25 Nambair et al. (1984), Science 223, 1299
- Pazur og Kleppe (1964), Biochem. 3, 578.
- Perbal (1984), A Practical Guide To Molecular Cloning.
- Poznansky et al. (1980) i Drug Delivery Systems (R.L. Juliano, Oxford, N.Y. 1980).
- Poznansky et al. (1984), Phar. Revs. 36, 277.
- 30 Sanger et al. (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463.
- Schreier et al. (1980), Hybridoma Techniques.
- Scopes (1987), Protein Purification, Principles And Practice, 2. utg. (Springer-Verlag).
- Shimatake et al. (1981), NATURE 292, 128.
- Taylor et al. (1985), Nucl. Acids Res. 13, 8749.

Travis et al. (1985), J. Biol. Chem. 260, 4384-4389.

Urdea et al. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7461.

Warner (1984), DNA 3, 401.

Wood et al. (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1585.

5 Zoller (1982), Nucleic Acids Res. 10, 6487.

Oppfinnelsen

Den foreliggende oppfinnelsen gir en cDNA-sekvens som koder glukoseoksidase (GO) fra en soppkilde av arten *Aspergillus*, og mere spesielt fra *A. niger*. Kunnskap om denne
10 sekvensen tillater uttrykking i rekombinante systemer av polypeptider som hovedsaklig er lik GO, inkludert GO, analoge av GO samt fragmenter av GO. Overraskende er relativt store mengder av enzymet produsert i og utskilt fra gjærceller, når cellene er transformert med en ekspresjonsvektor som koder GO, og dyrket under betingelser som tillater uttrykking av enzymet. Utskillelsen kan enten være under kontroll av gjærutskillel-
15 sekvenser eller prepro-sekvensen ved GO kodet i *A. niger*.

cDNA-sekvensen som er fremskaffet herunder tillater også isolering av GO-kodende sekvenser fra andre kilder, som også kan brukes i produksjon av rekombinant GO. Disse andre kildene kan være av enhver opprinnelse der enzymet kodes naturlig, men vil i særdeleshet være soppkilder, der den GO-kodende sekvensen inneholder minst 8 basepar,
20 fortrinnsvis 20 basepar, og enda mere foretrukket er minst 40 basepar som er sterkt homologe (dvs. har maksimalt en basefeil i komplementære sekvenser) med en sammenliknbar sekvens i figur 5b. Alternativt kan GO isolert fra kilder som er forskjellige fra *A. niger* ha en sekvens på minst omlag 4 aminosyrer, homolog med den fra *A. niger* GO-sekvens kodet i cDNA-sekvensen i figur 5b.

25 Polypeptidene uttrykt i gjær transformert med ekspresjonsvektorer som koder GO cDNA er blitt studert, og det overraskende resultatet som ble oppnådd var at produktene ble hyperglykosylert, og at hyperglykosyleringen av det rekombinant- produserte polypeptidet har liten eller ingen effekt på enzymatisk aktivitet, sammenliknet med naturlig GO, men at det rekombinante produkt framviste økt termostabilitet.

30 Et annet overraskende resultat er at fjerningen av karbohydrat-restene fra både rekombinant-produsert GO og naturlig GO tilsynelatende ikke hindrer enzymatisk aktivitet.

Nok et overraskende resultat er at selv om naturlig GO er tilstede i *A. niger* i relativt store mengder, er mRNA som koder det relativt sjeldent i *A. niger*-celler under log-fase vekst.

Et ytterligere overraskende resultat er at en analog av GO, dvs. et mutein, framviser økt termostabilitet i forhold til det naturlige molekylet fra *A. niger* og til dets rekombinante motpart uttrykt i gjær.

I henhold til dette er ett aspekt ved denne oppfinnelsen en rekombinant vektor som består av en polynukleotid-sekvens som koder et polypeptid hovedsakelig likt glukoseoksidase (GO), i det vesentlige fri for andre vektorer som ikke koder GO.

Et annet aspekt ved denne oppfinnelsen er en vertscelle transformert med et rekombinant polynukleotid bestående av en sekvens som koder et polypeptid som er praktisk talt likt GO.

10 Resultatet av dette er således et ikke-naturlig polypeptid som er praktisk talt likt GO ved:

(a) sørge for en populasjon av transformerte celler som inneholder en rekombinant vektor som består av en kodesekvens for et polypeptid som er hovedsakelig likt GO operativt lenket til sekvenser som tillater uttrykking av nevnte kodesekvens i nevnte celler;

(b) dyrke nevnte populasjon av transformerte celler under betingelser hvorved nevnte polypeptid som er hovedsakelig likt GO blir uttrykt; og

15 (c) gjenvinne nevnte polypeptid som er hovedsakelig likt GO.

Kort beskrivelse av tegningene

Figur 1 viser aminosyresekvenser av fragmenter av naturlig GO fra *A. niger*.

20 Figur 2 viser oligonukleotidprøver utformet fra aminosyresekvensen for naturlig GO fra *A. niger* for "screening" av sekvenser som koder GO.

Figur 3 viser 42-mer prøvens lengde 7 og 8, og deres forhold til lengde 6.

Figur 4a viser et restriksjonskart av GO cDNA isolert fra klon 4.

Figur 4b viser cDNA-sekvensen av GO i klon 4,

25 Figur 5a viser et restriksjonsenzym-kart av et sammensatt cDNA som koder GO fra *A. niger*.

Figur 5b viser cDNA-sekvensen av et sammensatt cDNA som koder GO fra *A. niger*, den avledete aminosyresekvens samt posisjonen for restriksjonsenzym-posisjonene.

Figur 6 viser likheten mellom fragmenter av naturlig GO fra *A. niger* og sekvenser avledet fra det sammensatte cDNA vist i figur 5b, og kodon-bruken.

Figur 7 viser nukleotid-sekvensen for region 5' til GO- genen i *A. niger*.

Figur 8 viser et flytskjema for konstruksjonen av ekspresjonsvektorene pAB24AGS_{GO}GO og pAB24_{alfa}GO.

Figur 9 er et kart over signifikante trekk ved skyttelvektoren pAB24.

Figur 10 viser en polysakkarid-gel hvorpå delvis rensset rekombinant GO ble underlagt elektroforese, når GO var behandlet i nærvær av og i fravær av endoglykosydase H.

Figur 11 er et kart over p@GO-1 som viser noen vesentlige trekk, inkludert restriksjonsenzym posisjoner.

- 5 Figur 12 er et kart over pSGO-2 som viser noen vesentlige trekk, inkludert restriksjonsenzym-posisjoner.

Figur 13 er et diagram som viser termostabilitet mot tid for GO polypeptidet uttrykt i gjær fra pAB24AGSGO sammenliknet med naturlig GO fra A.niger.

- 10 Figur 14 er et diagram som viser termostabilitet mot tid av muteinet kodet i C521S og uttrykt i gjær, sammenliknet med naturlig GO fra A.niger.

Figur 15 er et kart over restriksjonsenzym-posisjoner i klon pBRpGOXA11.

Figur 16 viser den partielle nukleotid-sekvens av et segment av genomen av P.amagasakiense i klon pBRpGOXA11; i tillegg er det også vist aminosyrene og restriksjonsenzym- posisjonene kodet deri.

- 15 Figur 17 viser en sammenlikning mellom aminosyrene kodet i fragmentet avledet fra P.amagasakiense genomen innført i pBRpGOXA11 og aminosyresekvensen i A.niger GO kodet i nukleotidsekvensen vist i figur 5b.

Definisjoner

- 20 I beskrivelsen av den foreliggende oppfinnelsen er følgende terminologi brukt i henhold til definisjonene som er gitt i det etterfølgende.

- "Glukoseoksidase" refererer her til et polypeptid som katalyserer oksidasjonen av glukose til glukonsyre med en ledsagende produksjon av hydrogen peroksid. Metoder for å bestemme glukoseoksidase-aktivitet er kjent innen faget, og inkluderer f.eks. en kolori-
25 metrisk analyse der glukoseoksidase- aktivitet er koplet til et peroksidase-o-dianisidin system. Denne typen analysesystem er diskutert i eksempel IV.

- Betegnelsen "rekombinant polynukleotid", som er brukt herunder til å karakterisere et polynukleotid, betegner et polynukleotid av genomisk cDNA av halvsyntetisk eller syntetisk opprinnelse som, i kraft av dets opprinnelse eller manipulasjon: (1) ikke er
30 assosiert med alt eller en del av polynukleotidet som det i naturen er assosiert med, og/eller (2) er bundet til et polynukleotid som er forskjellig fra det som det er bundet til i naturen, eller (3) ikke opptrer naturlig.

Betegnelsen "polynukleotid" henviser her til en polymerform av nukleotider med enhver lengde, enten ribonukleotider eller deoksyribonukleotider. Denne betegnelsen refererer kun

til den primære struktur av molekylet. Således inkluderer betegnelsen dobbelt- og enkelttrådet DNA, så vel som dobbel- og enkelttrådet RNA. Den inkluderer også modifiserte former, f.eks. ved metylering, fosforylering og/eller ved "capping", og umodifiserte former av polynukleotidet.

- 5 Et "replikon" er ethvert genetisk element, f.eks. et plasmid, kromosom eller virus som opptrer som en autonom enhet ved polynukleotid replikasjon i en celle; dvs. evne til replikasjon under dets egen kontroll.

En "vektor" er et replikon der et annet polynukleotid-segment er festet, for å iverksette replikasjonen og/eller uttrykkingen av det festete segmentet.

- 10 "Kontrollsekvens" refererer til polynukleotidsekvenser som er nødvendige for å effektivt uttrykke og/eller utskillelsen av de kodende sekvenser hvortil de blir bundet. Naturen til slike kontrollsekvenser varierer på basis av vertsorganismen; i prokaryoter inkluderer generelt slike kontrollsekvenser promotor, bindeposisjon på ribosomet og terminatorer; i eukaryoter inkluderer generelt slike

- 15 kontrollsekvenser promotorer, terminatorer og i noen tilfeller forsterkere. I tillegg kontrollerer ledersekvensene, i både prokaryoter og eukaryoter, utskillelsen av det uttrykte polypeptidet fra vertscellen. Betegnelsen "kontrollsekvenser" har til hensikt å inkludere i minimum alle komponenter hvis nærvær er nødvendig for uttrykking, og kan også inkludere ytterligere komponenter hvis nærvær er fordelaktige f.eks. for ledersekvenser.

- 20 "Operativt bundet" betyr her en sidestilling der de beskrevne komponentene er i et forhold som tillater at de virker på deres tilsiktede måte. En kontrollsekvens som er "operativt bundet" til en kodende sekvens er bundet på en slik måte at uttrykking av den kodende sekvensen blir oppnådd under betingelser som er sammenliknbare med kontrollsekvensene.

- 25 En "åpen leseblokk (open reading frame)" er en region av en polynukleotidsekvens som koder et polypeptid; denne regionen kan representere en del av en kodesekvens eller en total kodesekvens.

En "kodesekvens" er en polynukleotidsekvens som er transkribert inn i mRNA og/eller translateret inn i et polypeptid når satt under kontroll av passende regulerende sekvenser.

- 30 Grensene av kodesekvensen er bestemt ved et translasjons-startende kodon ved 3'-terminus. En kodesekvens kan inkludere mRNA, cDNA og rekombinante polynukleotidsekvenser.

"Rekombinante vertsceller", "vertsceller", "celler", "cellekjeder", "cellekulturer" og andre uttrykk som betegner mikroorganismer eller høyere eukaryotiske cellekjetter kultivert som unicellulære enheter, er brukt utskiftbart, og refererer til celler som kan være, eller har blitt,

brukt som mottaker for rekombinant vektor eller andre overførings-nukleotider, og inkluderer avkommene av de originale cellene som er blitt transformert. Det er forstått at avkommene av en enkel modercelle ikke nødvendigvis trenger være identisk i morfologi eller genetisk eller totalt DNA-identisk med modercellen på grunn av tilfeldige eller stille
5 mutasjoner. Avkommene av modercellen som er tilstrekkelig lik modercellen kan karakteriseres ved den relevante egenskap, slik som nærværet av en nukleotidsekvens som koder et ønsket peptid, og er inkludert i avkommene som tiltenkt under denne definisjonen, og dekkes av de ovennevnte betegnelser.

"Transformasjon" betegner her innføringen av et exogent polynukleotid i en vertscelle
10 uavhengig av metoden som brukes for innføring, f.eks. direkte opptak, transduksjon, eller "f- mating". Det exogene polynukleotidet kan opprettholdes som en ikke-integrert vektor slik som et plasma, eller kan alternativt integreres inn i vertsgenomenet.

"Polypeptid" betegner her aminosyreproduktet av en sekvens som er kodet i et genomen og som ikke refererer til en spesifikk lengde av produktet; således faller peptider,
15 oligopeptider og proteiner innenfor definisjonen av polypeptid. Denne betegnelsen refererer heller ikke til post- uttrykingsmodifikasjoner av polypeptidet, f.eks. glukosyleringer, acetyleringer, fosforyleringer, silalyleringer og tilsvarende.

Uttrykket "polypeptid hovedsaklig likt glukoseoksidase eller GO" betegner her ikke-naturlig forekommende former av GO, slik som med hensyn til post-translasjonale
20 modifikasjoner som inkluderer glukosyleringer, fosforyleringer og tilsvarende, men som har den samme aminosyresekvensen som naturlig GO, analoge av GO, fragmenter av GO, og fusjons-polypeptider der GO eller en analog eller et fragment blir fusjonert til et annet polypeptid som det normalt ikke fusjoneres med i naturen. En "analog av GO" eller "en analog av et fragment av GO" er en der homologien med naturlig GO eller fra det
25 sammenliknbare fragmentet er større enn omlag 70% med hensyn til aminosyresekvensen, og er fortrinnsvis større enn omlag 80%. Analoge der en eller flere av de naturlig forekommende aminosyrer er substituert med en ikke-naturlig forekommende forbindelse som er kjent innen faget, f.eks. en ikke-naturlig forekommende aminosyre osv, er også inkludert i denne betegnelsen. Polypeptider som er fragmenter eller analoge av GO kan
30 eller trenger ikke være "aktive". Et "aktivt" polypeptid er et som med de passende ko-faktorer og substrater katalyserer reaksjonen som normalt er katalysert av det naturlige enzymet isolert fra *Aspergillus*. Et "inaktivt" polypeptid er et som mangler den naturlige aktivitet, eller der den opprinnelige aktivitet er blitt vesentlig endret med hensyn til forbindelsens anvendelse (type eller mengde), og/eller med hensyn til produktdannelse

(type eller mengde), men som har minst den ovennevnte grad av homologi i aminosyre-sekvensen med naturlig GO, eller ved et sammenliknbart fragment av GO. Metoder for å påvise ikke-naturlig forekommende former av GO og analoge av GO er kjent innen faget. Ikke-naturlig forekommende former av GO og analoge av GO kan påvises ved f.eks. deres
5 forandring i binding til og utvasking fra et utvalg av kromatografiske materialer, og ved deres migrering gjennom elektroforetiske geler. I tillegg kan analoge av GO detekteres ved f.eks. sammenlikning av aminosyresekvenser.

En type analoge av GO er et polypeptid deri et eller flere naturlig forekommende cystein residuer er fjernet eller substituert med andre aminosyrer; denne type polypeptider er
10 herunder referert til som et "mutein". Framgangsmåter for tilvirking av "muteiner" er kjent innen fagområdet.

"Hyperglykosylert GO" betegner her GO som inneholder ekstra karbohydratrester i forhold til mengde karbohydrat som er bundet til naturlig GO. Betegnelsen "underglykosylert GO" refererer her til GO som inneholder mindre karbohydratrester i
15 forhold til mengde karbohydrater som er bundet til naturlig GO. Teknikker for å bestemme enten et polypeptid inneholder mere eller mindre karbohydrater er kjent innen faget, og inkluderer f.eks. utvalget av teknikker som bestemmer forskjellen i molekylvekt til et modifisert polypeptid (f.eks. elektroforese med polyakrylamid-geler i nærvær av SDS, som beskrevet av Laemmli) og migrering gjennom kolonner som inneholder molekylsikt-
20 materialer (f.eks. Sephadex), så vel som teknikker som er basert på affinitet eller mangel på affinitet mellom karbohydratgrupper og materialer som binder karbohydrater.

Et "naturlig polypeptid" er et som har en identisk aminosyresekvens som sekvensen som er kodet i genomet av organismen som er kilden for den kodende sekvens.

"Naturlig GO" og tilsvarende betegnelser refererer til GO som er isolert fra soppkildene
25 der den normalt blir produsert i naturen fra et naturlig forekommende genom.

Et "ikke-naturlig polypeptid" refererer til et polypeptid som er produsert i en vert forskjellig fra den som det produseres i fra naturens side.

"Strengte betingelser" for hybridisering som brukt herunder er betingelser som vil tillate ikke mere enn 1 basefeil i hybridiseringen av to komplementære sekvenser. Hybridisering
30 og vaske-betingelser som har varierende grad av strenghet, er kjent av de som er alminnelig fagkyndige, og er diskutert f.eks. i Maniatis et al. (1982).

"Gjær" inkluderer her ascosporogene gjær (Endomycetaler), basidioporogene gjær og gjær som tilhører Fungi imperfecti (Blastomyceter). De ascosporogene gjær er inndelt i to familier, Spermophthoraceae og Saccharomycetaceae. Den sistnevnte omfatter fire under-

familier, Schizosaccharomycoideae (f.eks. slekten Schizosaccharomyces), Nadsoniidae, Lipomycoideae og Saccharomycoideae (f.eks. genera Pichia, Kluyveromyces og Saccharomyces). Basidiospro-beslektete gjær inkluderer genera Leucosproidium, Rhodosporium, Sporidiobolus, Filobasidium og Filobasidiella. Gjær som tilhører Fungi

5 Imperfecti er inndelt i to familier, Sprobolomycetaceae (f.eks. slektene Sporobolomyces, Bullera) og Cryptococcaceae (f.eks. slekten Candida). Av spesiell interesse for den foreliggende oppfinnelsen er arter innen slektene Pichia, Kluyveromyces, Saccharomyces, Schizosaccharomyces og Candida. Av spesiell interesse er Saccharomyces-artene *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. diastaticus*, *S. douglasii*, *S. kluyveri*, *S. norbensus* og *S.*

10 *oviformis*. Arter av spesiell interesse i slekten Kluyveromyces inkluderer *K. lactis*. Siden klassifiseringen av gjær kan forandres i framtiden, skal gjær som omfattes av den foreliggende oppfinnelsen defineres som beskrevet i BIOLOGY AND ACTIVITIES OF YEAST (F.A. Skinner, S.M. Passmore & R.R. Davenport 1980) (Soc. App. Bacteriol. Symp. Series No. 9). I tillegg til det ovennevnte er det antatt at de fagkyndige er familiære

15 med gjærens biologi og manipuleringen av gjærens genetik. Se f.eks. BIOCHEMISTRY AND GENETICS OF YEAST (M. Bacila, B.L. Horecker & A.O.M. Stoppani 1978); THE YEASTS (A.H. Rose & J.S. Harrison, 2. utgave, 1987) og THE MOLECULAR BIOLOGY OF THE YEAST SACCHAROMYCES (Strathern et al., 1981).

"Sopp" inkluderer her klassene Phycomyceter, Ascomyceter, Basidiomyceter og

20 Deuteromyceter. Representative grupper av Phycomyceter inkluderer f.eks. Rhizopus, Mucor og vann-Myogale. Representative grupper av Ascomyceter inkluderer f.eks. Neurospora, Penicillium, Aspergillus og de sanne gjær som nevnt ovenfor. Eksempler på Basidiomyceter inkluderer f.eks. sjampinjonger, rust på planter og brann på korn.

25 **Beskrivelse av oppfinnelsen**

Ved praktisering av oppfinnelsen er det anvendt, hvis ikke annet er nevnt, konvensjonelle teknikker innen molekylær biologi, mikrobiologi, rekombinant DNA, og enzymologi, som er innenfor fagområdet. Slike teknikker er utfyllende beskrevet i litteraturen. Se f.eks. Maniatis, Fitch & Sambrook, MOLECULAR CLONING; A LABORATORY MANUAL

30 (1982); DNA CLONING; VOLUM I OG II (D.N. Glover, 1985); OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (M.J. GAIT, 1984); NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (B.D. HAMES & S.J. Higgins, 1984); TRANSCRIPTION AND TRANSLATION (B.D. Hames & S.J. Higgins, 1984); ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney, 1986); B. Perbal, A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING (1984); avhandlingen METHODS

IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.) og spesielt vol. 154 og 155 (Wu og Grossman, og Wu, henholdsvis); GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (J.H. Miller og M.P. Calos, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Academic Press, London) og
5 Scopes, PROTEIN PURIFICATION; PRINCIPLES AND PRACTICE; 2. utgave (Springer Verlag, 1987).

Alle patentskrifter, patentsøknader og publikasjoner som er nevnt herunder, både ovenfor og i det etterfølgende, er innarbeidet med henvisninger.

Et konstruert nukleotid som koder GO kan brukes i framgangsmåter for å produsere
10 enzymet ved rekombinante metoder.

DNA som koder GO, nærmere bestemt sopp-GO fra *Aspergillus niger*, ble isolert fra et cDNA bibliotek dannet ved revers transkripsjon av poly-A⁺ RNA isolert fra *A.niger* i log-fase vekst. Tilvirkingen av prøver for å gjennomføre biblioteket for sekvenser som koder GO var imidlertid problematisk. Data for både aminosyresekvensen og nukleotidsekvensen
15 manglet. Det overraskende resultatet ved at forsøkene på å avsløre enzymet isolert fra *A.niger* kun ga sekvensene av de ti første aminosyrene til det naturlige polypeptidet, nødvendiggjorde en overveielse av andre tilnærminger for å konstruere sekvenser som kunne brukes ved "screening" av GO-kodende sekvenser.

For å lage prøver som kunne være passende for bestemmelse av cDNA-sekvenser som
20 koder GO i et lambda gt10 bibliotek, ble oligopeptid-fragmenter av det naturlige enzymet fra *A.niger* rensert og aminosyresekvensene ble bestemt. Basert på sekvensene ble oligo-nukleotidprøver laget på to måter. Prøver med 17 til 23 nukleotider ble laget fra regionene med lavest degenerasjon. Alternativt ble unike lengre prøver gjettest fra kodon bias. Sekvensene av disse prøvene er vist i figur 2.

25 "Screening" av lambda gt10 *A.niger* cDNA biblioteket ga overraskende resultater. For det første var ingen av de første prøvene brukbare for bestemmelse av kloner som inneholdt GO cDNA. I tillegg, mens to 42-mer prøver kunne anvendes med hell for å påvise disse klonene, var en 72-mer prøve som 42-mer prøvene var under-sett av bortsett fra ett nukleotid, ikke brukbare for påvisningen. I figur 3 er 42-mer prøvene som kan brukes for å
30 påvise GO cDNA-inneholdende kloner vist.

Ved bruk av 42-mer prøvene ble kloner av lambda gt10 som inneholdt nukleotid-sekvenser som koder GO-polypeptidet eller fragmenter av dette oppnådd; cDNA i disse klonene ble underklonet og sekvensiert. Et sammensatt cDNA konstruert fra to av GO cDNA er vist i figur 5b. Aminosyresekvensen av GO var avledet fra nukleotidsekvensen som

- kodet den. Fra sekvensen kan det bestemmes at det ferdige proteinet består av 583 aminosyrer; aminosyresekvensen inneholder kun 3 cystein-rester og 8 overensstemmende glykosyleringsposisjoner. I aminosyresekvensen er det en preprosekvens av 22 aminosyrer, med en enkel grunnleggende splitt-posisjon ved begynnelsen av den ferdige sekvensen.
- 5 Det rekombinante polynukleotidet som er vist i figur 5b koder GO fra *A.niger*. Det kan imidlertid antas at GO fra andre kilder, spesielt andre sopp-kilder, og mere spesifikt fra andre arter av *Aspergillus*, inneholder regioner som er homologe med de fra GO fra *A.niger*. Regioner med homologi kan bestemmes ved å sammenlikne aminosyresekvensene i GO fra de andre kildene med den i GO fra *A.niger*; aminosyresekvensen avledet fra GO
- 10 cDNA- sekvensene er vist i figur 5b. Hvis aminosyresekvensen for hele polypeptidet ikke kan bestemmes, kan sekvensene av oligopeptid- fragmenter sammenliknes med sekvensen av *A.niger* GO. Informasjon på kodon-biasen i kilden kan også sammenliknes; kodon-bias i *A.niger* er representert i figur 6. Således kan prøver konstrueres fra sekvensen i figur 5b som er nyttige ved "screening" av cDNA-biblioteker fra andre kilder for å påvise GO-
- 15 kodende sekvenser fra disse kildene. Parametre for konstruksjon av prøver er kjent for de alment fagkyndige, og noen er anvendt i eksemplene. Prøvene vil vanligvis inneholde minst 8 baser, fortrinnsvis 20 baser eller helst 40 baser som er identisk med en sekvens i cDNA-sekvensen i figur 5b. Identiteten kan være ved enten den kodende eller ikke- kodende streng av cDNA. Disse prøvene vil hybridiseres under strenge betingelser med den passende
- 20 streng av DNA duplekset inneholdende GO-kodende sekvens(er) som skal isoleres. Strenge hybridiseringsbetingelser er kjent innen fagområdet og er diskutert f.eks. i Maniatis et al. (1982), og i *Methods in Enzymology*. De GO-kodende sekvenser som er blitt påvist med prøven(e) kan dermed klones og isoleres ved anvendelse av teknikker som er kjent for de fagkyndige. Se for eksempel Maniatis (1982), B. Perbal (1984) og Glover (1985).
- 25 Isoleringen av en sekvens som koder en del av GO fra *Penicillium*, nærmere bestemt *P. amagasakiense*, er beskrevet i eksemplene. Isoleringen ble utført ved å anvende en prøve avledet fra GO cDNA lokalisert i en rekombinant vektor beskrevet herunder. Ved å anvende fragmentet som koder *Penicillium* GO til framskaffelse av prøver, er det mulig å avlede hele sekvensen av polynukleotid som koder dette sopp- enzymet fra cDNA eller genomen
- 30 biblioteker dannet fra *Penicillium*-kilden.

Selv om en framgangsmåte for tilvirking av et DNA som koder *A. niger* GO basert på dannelsen av et cDNA bibliotek er blitt beskrevet, er tilvirking av slike DNA i den foreliggende oppfinnelsen ikke begrenset til slike metoder. Ved anvendelse av sekvensinformasjonen som er gitt herunder, kan andre framgangsmåter for tilvirking av

polynukleotid-konstruksjonen som koder GO overveies. For eksempel kan nukleotid-sekvensen som koder GO syntetiseres ved anvendelse av automatisert DNA-syntese. Se f.eks. Edge (1981), Nambair et al. (1984) og Jay et al. (1984). Alternativt kan oligonukleotider som inneholder en del av sekvens-informasjonen syntetiseres; disse kan dermed
5 brukes som prøver for "screening" av genomiske DNA biblioteker og cDNA biblioteker. De grunnleggende strategier for tilvirking av oligonukleotid-prøver og DNA biblioteker, så vel som deres "screening" ved nukleinsyre hybridisering, er velkjente for de alment fagkyndige. Se f.eks. D.P.Glover (1985); B.D. Hames & S.J. Higgins (1985); M.J. Gate (1984); Maniatis et al. (1982) og B. Perbal (1984).

10 Straks en sekvens som koder GO er blitt laget eller isolert, kan den klones inn i ethvert passende replikon til å danne en vektor, og derved holdes i en sammensetning som er hovedsaklig fri for vektorer som ikke inneholder GO-genet (f.eks. andre kloner avledet fra biblioteket). Tallrike klonevektorer er kjent for de fagkyndige, og utvelgelsen av en passende klonevektor er snakk om et valg. Eksempler på vektorer som er passende for
15 kloning av rekombinant DNA og vertsceller som de kan transformere inkluderer bacteriophage lambda (E. coli), pBR322 (E. coli), pACYC177 (E. Coli), pKT230 (gram negative bakterier), pGV1106 (gram negative bakterier), pLAFR1 (gram negative bakterier), pME290 (ikke-E. coli gram negative bakterier), pHV14 (E. coli og B. subtilis), pBD9 (Bacillus), pIJ61 (Streptomyces), YIp5 (Saccharomyces), YCp19 (Saccharomyces) og bovin papilloma
20 virus (mammaliaceller). Se generelt T. Maniatis et al. (1982), B. Perbal (1984) og Glover (1985).

Polynukleotid-sekvensen som koder GO er uttrykket ved å innføre sekvensen i et passende replikon som derved skaper en ekspresjonsvektor, transformere forenelige vertsceller med den resulterende ekspresjonsvektor og dyrke vertscellene under betingelser som tillater
25 vekst og uttrykking.

Ved tilvirkingen av en ekspresjonsvektor er den GO-kodende sekvensen lokalisert i vektoren slik at den er operativt bundet med de passende kontrollsekvenser for uttrykking, og muligens for utskillelse. Ved et minimum inneholder kontrollsekvensene en promotor, og transkripsjonale og translasjonale stopp- kodoner. Posisjoneringen og orienteringen av
30 den kodende sekvensen med hensyn til kontrollsekvensene er slik at den kodende sekvensen er transkribert under "kontroll" av kontrollsekvensene: dvs. at promotoren vil kontrollere transkripsjonen av mRNA avledet fra den kodende sekvensen, og stopp-kodonet som brukes til å terminere translasjon vil være oppstrøms for det transkripsjonale termineringskodon.

I tillegg til kontrollsekvenser kan det være ønskelig å tilsette regulerende sekvenser som tillater regulering av uttrykkningen av GO i forhold til veksten av vertscellen. Dette er i særdeleshet en sannhet når GO skal uttrykkes i celler som er dyrket i glukoseholdige media, siden hydrogen peroksidet dannet ved GO kan være giftig for cellen. Eksempler på

5 regulerende systemer er de som forårsaker uttrykkningen av et gen som skal slås på eller av fra respons av kjemiske eller fysiske stimuli, inkludert nærværet av en regulerende forbindelse. I prokaryotiske systemer ville de inkludere lac og trp-virkende systemer. I gjær kunne disse inkludere f.eks. ADH2- systemet. I eksemplene er uttrykkningen av GO i *S.cerevisiae* under den regulerende hybrid promotor, ADH2/GAP. Andre eksempler på

10 regulerende sekvenser er de som tillater gen- forsterkning. I eukaryotiske systemer inkluderer disse dihydrofolat reductase-genet som er forsterket i nærvær av methotrexat, og metallothionein gener, som er forsterket ved tungmetaller. I disse tilfellene ville sekvensen som koder GO være plassert i tandem med det regulerende element.

Andre typer regulerende elementer kan også være tilstede i vektoren, dvs. de som ikke

15 nødvendigvis trenger være i tandem med sekvensen som koder GO. Forbedrende sekvenser slik som SV40 sekvensen er av denne type. En forbedrende sekvens ved dens blotte nærvær forårsaker en forbedring av uttrykking av gener distalt til denne.

Modifisering av sekvensen som koder GO, forut for eller etter dens innføring i replikonet, kan være ønskelig eller nødvendig avhengig av uttrykkssystemet som velges.

20 Det kan f.eks. i noen tilfeller være nødvendig å modifisere sekvensen slik at den vil ha den passende orientering når den er festet til kontrollsekvensene. I noen tilfeller kan det være ønskelig å tilsette eller forandre sekvenser som forårsaker utskillelsen av polypeptidet fra vertsorganismen, med etterfølgende splitting av utskillelses-signalet. I eksemplene ble ekspresjonsvektorer dannet som hadde enten den naturlige prepro-sekvens for *A.niger* GO,

25 eller der alfa-faktor fra gjær ble brukt som utskillelses-signalet. I tillegg kan det i noen tilfeller være ønskelig å fjerne "introns" fra sekvenser isolert fra genomiske biblioteker, for å tillate uttrykking i systemer slik som prokaryotiske systemer som ikke har evne til fjerningen av "intron"-sekvensene, eller som ikke vil tillate uttrykking av de kodende sekvenser som inneholder "intron(er)". Et eksempel på det sistnevnte er diskutert i Innis et

30 al. (1985). Teknikkene for modifisering av nukleotidesequenser ved anvendelse av kloning er velkjent innen faget. De inkluderer f.eks. bruken av restriksjons-enzymmer, eller enzymmer slik som Ba131 for å fjerne overflødige nukleotider, og av kjemisk syntetiserte oligo-nukleotider for bruk som adaptorer, for å erstatte tapte nukleotider og i plassrettet mutagenese. Se f.eks. Maniatis et al (1982), Glover (1985) og Hames og Higgins (1984).

Modifisering av sekvensen som koder GO kan også være nødvendig for syntesen av polypeptider som er hovedsaklig lik GO. Disse polypeptidene er forskjellige i konstruksjon fra enzymet isolert fra dets naturlige kilde. For eksempel, hvis et fragment av GO er det søkte produktet, ville sekvensen som koder enzymet vært modifisert for å fjerne de

5 uønskete sekvenser som samsvarer med aminosyrene som skal fjernes. Hvis et aktivt fragment av GO er det søkte produktet, ville de fjernete sekvensene mest sannsynlig være i regionene for amino- og karboksy-terminus.

Alternativt kan polypeptider som hovedsaklig er lik GO syntetiseres ved uttrykking av det naturlige genet i en vert som forårsaker en modifikasjon i prosesseringen og/eller

10 foldingen av polypeptidet. I eksemplene er det vist uttrykking av en rekombinant sekvens som koder A.niger GO i gjær som leder til hyperglykosylerte arter som opprettholder deres aktivitet. Overraskende har imidlertid det gjæruttrykte polypeptidet større termostabilitet enn det naturlige enzymet, som kan øke dets anvendelse i kommersielle prosesser.

Det kan også være av interesse å syntetisere analoge av GO. Slike analoge kan f.eks.

15 variere i deres spesifikke aktivitet, og/eller lettheten som de uttrykkes med, og/eller lettheten ved rensingen av disse. Det er kjent f.eks. at høyglykosylerte polypeptider ofte er vanskelige å rense. Verdiene i eksemplene gir det overraskende resultat at fjerning av karbohydratrestene fra GO avledet fra A.niger ikke påvirker den enzymatiske aktivitet av polypeptidet. Således kan det være ønskelig å variere f.eks. antall glykosyleringsposisjoner.

20 I tillegg kan cys-rester være mutert for å hjelpe foldingen av rekombinante og/eller modifiserte polypeptider eller for å endre andre egenskaper for å lage et protein med større kommersiell anvendelse. Det er for eksempel vist i del IV.I at substitusjon av serin for cystein ved posisjon 521 øker termostabiliteten for den gjæruttrykte GO avledet fra A.niger.

25 I eksemplene er det vist rekombinant produksjon av analoge av det naturlig type A. niger GO, som framviser GO enzymatisk aktivitet.

Det kan også være av interesse å syntetisere analoge av fragmenter av GO. Slike analoge som kan inkludere inaktive analoge kan være nyttige ved f.eks. produksjon av antistoffer for GO.

30 Det kan også være av interesse å syntetisere analoge av fragmenter av GO som skiller seg ut i deres hydrofobitet, som tillater større eller mindre samvirke med membraner eller med liposomer. Dette kan tillempes ved substitusjon av hydrofobe aminosyrer med hydrofile aminosyrer i noen av eksterne områder av polypeptidet, eller omvendt. Slike endringer i

hydrofobitet tillempes ved modifisering av sekvensene som koder de spesifikke aminosyrer som skal substitueres.

I tilfeller der GO skal brukes i produksjon av matvarer kan det være ønskelig å fjerne immunogene regioner av polypeptidet som gir en økning i allergiske reaksjoner, spesielt for 5 mennesker. Metoder for testing av allergireaksjoner er kjent for de fagkyndige.

Polypeptider som er praktisk talt lik GO eller dets fragmenter, men som inneholder en endring i den aktive posisjon, kan også syntetiseres. I dette tilfellet ville sekvensen som koder enzymet blitt modifisert slik at disse kodoner som koder aminosyrene i den aktive posisjon ville blitt endret eller fjernet.

10 Polypeptider som praktisk talt er like GO eller dets fragmenter inkluderer også polypeptider der en del av hele GO- sekvensen er fusjonert med en sekvens som koder et annet polypeptid. Fusjoneringen kan skje enten ved N-terminus eller C- terminus av GO polypeptidet eller fragmentet. Teknikker for å skape fusjonsproteiner er kjent innen fagområdet og inkluderer f.eks. binding av de åpne lesemodulene som koder polypeptidene slik at de er 15 i posisjon, og slik at uttrykkningen av det fusjonerte polypeptidet er under regulering av en enkelt promotor og terminator. Fusjonering kan også skapes på kjemisk vis ved etteruttrykkete polypeptider. Kjemiske metoder for fusjonering (eller binding) av polypeptider er kjent for de fagkyndige. Se for eksempel *Methods in Enzymology*.

De ovennevnte er eksempler måten GO kan modifiseres på ved modifisering av 20 sekvensen som koder GO. Disse eksemplene er ikke ment å være uttømmende, og en fagkyndig ville med letthet finne fram til andre modifikasjoner som ville vært nyttige. Alle disse modifikasjonene kan tillempes ved bruk av teknikkene og referansene som er gitt i det ovennevnte og i det etterfølgende angående modifisering av nukleotidsekvenser.

Sekvensen som koder et polypeptid som er hovedsaklig likt GO, inkludert naturlig 25 forekommende GO-typer, kan bindes til kontrollsekvensene til å danne en uttrykkskasset forut for innføringen til replikonet som vil danne en ekspresjonsvektor. Alternativt kan den kodende sekvens klones direkte til en ekspresjonsvektor som allerede inneholder kontrollsekvensene og en passende restriksjonsposisjon.

Kontrollsekvensene i vektoren vil velges slik at de er forenelige med den transformerte 30 verten, for å tillate uttrykking og/eller utskillelse av molekylet. Disse kontrollsekvensene kan være av blandet opprinnelse. For eksempel, i ett av eksemplene i det etterfølgende, var uttrykkningen av A. niger GO i *S.cerevisiae* under kontroll av totalt heterologe sekvenser, dvs. de gjær-regulerte gjær- promotorer ADH2/GAP, gjærens alfa-faktor for utskillelse og gjær GAP-terminatiren. I et annet eksempel var kontrollene kun delvis heterologe, dvs. at

utskillelse ble regulert ved prepro- sekvensen fra *A.niger*, mens resten av uttrykkningen ble kontrollert av gjærsekvenser. I tilfeller der GO er uttrykt i prokaryotiske systemer vil sekvensen som koder enzymet være fritt for "introns".

Et utvalg av replikoner som kan brukes for å konstruere prokaryotiske ekspresjonsvektorer er kjent innen faget. Se f.eks. US patentskrifter 4 440 859, 4 436 815, 4 431 740, 4 431 739, 4 428 941, 4 425 437, 4 418 149, 4 422 994, 4 366 246 og 4 342 832. Replikoner som kan brukes for å konstruere gjær ekspresjonsvektorer er også kjent innen fagområdet. Se US patentskrifter 4 446 235, 4 443 539, 4 430 428 og de etterfølgende eksempler. Et eksempel på et replikon som kan brukes til å konstruere en ekspresjonsvektor for mammalia 10 vertsceller er beskrevet i US patentsøknad 921 730.

Et foretrukket system for uttrykking av rekombinant GO er gjær, fortrinnsvis *S. cerevisiae*. Som beskrevet i de etterfølgende eksemplene uttrykker dette systemet relativt høye nivå av GO, i særdeleshet når sekvensen som koder det naturlige type *A.niger* enzymet er under kontrollen av gjærpromotoren ADH2/GAP, gjær alfa-faktoren og gjær GAP-terminatoren. 15

Avhengig av uttrykks-systemet og verten som er valgt blir det produsert et polypeptid som er praktisk talt likt GO, inkludert GO, eller analoge til GO, eller et fragment av GO ved dyrking av vertsceller som er transformert med en ekspresjonsvektor som beskrevet ovenfor under betingelser der polypeptidet uttrykkes. Det syntetiserte polypeptidet blir deretter 20 isolert fra vertscellene og renses. Hvis uttrykks-systemet skiller ut enzymet i vekstmediet kan proteinet renses direkte fra mediet. Hvis det rekombinante polypeptidet ikke utskilles blir det isolert fra cellelysatet. Utvelgelsen av de passende vekstbetingelsene og isoleringsmetodene er innenfor fagområdet.

Isolering av det nylig syntetiserte polypeptidet avhenger av et prøvesystem hvorved 25 polypeptidet kan påvises. Disse prøvesystemene vil være åpenbare for en fagmann. For eksempel hvis det nylig syntetiserte polypeptidet framviser GO enzymatisk aktivitet kan polypeptidet påvises ved testing av den enzymatiske aktivitet. Tester for enzymatisk aktivitet er beskrevet under i eksemplene.

Det er også mulig å påvise det nylig syntetiserte polypeptidet ved immunotester ved bruk 30 av antistoffer for polypeptider som praktisk talt er lik GO, inkludert GO. I dette tilfellet vil typen antistoff som brukes i prøven gjenspeile det forventete nærvær eller fravær av spesifikke kjente epitoper. Teknikkene for immunologiske tester er velkjente for de fagkyndige, og polyklonale antistoffer for GO fra *A.niger* er kommersielt tilgjengelige.

Det uttrykte polypeptidet kan isoleres og renses i den grad som er påkrevet for dets tiltenkte bruk. Rensingen kan foregå ved teknikkene som er kjent innen fagområdet slik som salt-fraksjonering, kromatografi på ionebytterharpikser, affinitets-kromatografi, sentrifugering og tilsvarende. Se for eksempel "Methods in enzymology" og Scopes (1987) 5 for et utvalg av metoder for rensing av proteiner.

Generelt kan rekombinant produksjon av GO gi vesentlige mengder sammensetning av dette enzymet som er praktisk talt fri for forurensende proteiner, det vil si en renhet på minst 90%. Evnen til å framskaffe vesentlige mengder av polypeptidet med høye renhets- 10 grader er et resultat av rekombinante uttrykks- systemer som tillater at det rekombinant- produserte polypeptidet utskilles til mediet. Således, ved å anvende konvensjonelle teknikker på rekombinante kulturer kan en oppnå GO-sammensetninger i betydelige mengder og med en god renhet.

Det bør bemerkes at med de sekvensielle data fra den foreliggende oppfinnelsen er produksjon av GO ikke begrenset til rekombinante metoder. Det kan også syntetiseres ved 15 kjemiske metoder slik som fast fase peptidsyntese. Slike framgangsmåter er kjent for de fagkyndige.

De rekombinante polypeptidene som er vesentlig lik GO, inkludert GO, kan brukes til å produsere antistoffer, både polyklonale og monoklonale. Hvis polyklonale antistoffer ønskes blir et utvalgt pattedyr (slik som mus, kanin, geit, hest osv.) immunisert med rensset 20 GO eller fragmenter av dette, eller analoge av dette, eller fragmenter av analoge av dette. Serum fra det immuniserte dyret blir samlet og behandlet i henhold til kjente prosedyrer. Hvis serum som inneholder polyklonale antistoffer for GO inneholder antistoffer for andre antigener, kan de GO polyklonale antistoffer renses ved immunoaffinitet.

Monoklonale antistoffer for GO kan også med letthet produseres av fagkyndige. Den 25 generelle metodebruk for tilvirking av monoklonale antistoffer ved hybridomase er velkjent. Se f.eks. Schreier et al. (1980), Hammerling et al. (1981), Kennet et al. (1980). Paneler av monoklonale antistoffer produsert mot GO kan underlegges "screening" for ulike egenskaper; dvs. isotyp, epitop, affinitet osv.

Monoklonale antistoffer rettet mot spesifikke epitoper er nyttige ved definering av veksel- 30 virkningen av GO. I tillegg er monoklonale antistoffer nyttige ved rensing, ved bruk av immunoaffinitet-teknikker, av naturlig eller rekombinant produsert GO.

Hvis GO eller polypeptider som er hovedsaklig lik GO skal brukes terapeutisk kan det være ønskelig å binde polypeptidmolekylet til et effektivt system for å levere GO til den passende posisjon, og som også vil beskytte polypeptidet mot proteolyse, og som på samme

tid forårsaker en kontrollert levering av polypeptidet. Systemer for levering av molekyler er kjent for fagfolkene, og er vist i f.eks. Poznansky et al. (1980). Leverings-systemer for medikamenter kan f.eks. være liposomer eller antistoffer rettet mot spesifikke målceller.

5 III. Generelle metoder

De generelle metoder som er brukt ved ekstraksjon av polynukleotider fra kildecellene, tilvirking og undersøkning av et cDNA og/eller genomisk bibliotek, sekvensiering av kloner, konstruksjon av ekspresjonsvektorer, transformering av celler og tilsvarende er fagmessige metoder, og laboratoriemanualer er tilgjengelige som beskriver disse teknikkene. Som en
10 generell regel vil det etterfølgende vise noen kilder som ofte er tilgjengelige for slike prosedyrer, og materiale som er nyttig ved utførelsen av disse.

III.A. Vertsceller og uttrykks-kontrollsekvenser

Både prokarotiske og eukaryotiske vertsceller kan brukes for uttrykking av ønskete
15 kodesekvenser når det blir brukt passende kontrollsekvenser som er forenelige med den tiltenkte vertscellen. Blant prokaryotiske vertsceller blir E.coli oftest brukt. Uttrykks-kontrollsekvenser for prokaryoter inkluderer promotorer, valgfritt inneholdende operatørposisjoner, og ribosombindende punkter. Overføringsvektorer som er forenelige med prokaryotiske vertsceller er vanligvis avledet fra f.eks. pBR322, et plasmid som inneholder
20 "operons" som gir ampicillin- og tetracyclin-motstand, og de ulike pUC-vektorene, som også inneholder sekvenser som gir antibiotiske motstandsmarkører. Disse markørene kan brukes for å oppnå vellykkete transformanter ved utvelgelse. Vanlig brukte prokaryotiske kontrollsekvenser inkluderer beta-laktamase (penicillinase) og laktose promotor-systemer (Chang et al., 1977), tryptophan (trp) promotor-systemet (Goeddel et al., 1980), og den
25 lambda- avledete P_L-promotor og N gen ribosombindende posisjon (Shimatake et al., 1981) og hybrid tac-promotoren (De Boer et al., 1983) avledet fra sekvenser av trp og lac UV5 promotorene. Sekvenser som når de er fusjonert med en kodesekvens som forårsaker utskillelsen av det uttrykte polypeptidet fra E.coli er også kjent, og inkluderer det bakterielle pelB-genet (pectat lyase) fra Erwinia carotovora (Lei et al., 1987). De foregående
30 systemene er spesielt forenelige med E.coli; hvis det er ønskelig kan imidlertid andre prokaryotiske vertsceller slik som generasjoner av Bacillus eller Pseudomonas brukes, med tilsvarende kontrollsekvenser.

Eukaryotiske verter omfatter gjær og celler av pattedyr i kultiveringssystemer. S.cerevisiae og S.carlsbergensis er de vanligste vertscellene og er lettvinde sopp-verter.

Gjær- forenelige vektorer som bærer markører som tillater utvelgelse av framgangsrike transformanter ved å gi prototropi til auxotropiske mutanter eller motstand mot tungmetaller i ville generasjoner. Gjær-forenelige vektorer kan anvende 2 mikron- opprinnelsen for replikasjon (broach et al., 1983), kombinasjonen av CEN3 og ARS1 eller andre midler for å sikre replikasjon, slik som sekvenser som vil resultere i innkorporering av et passende fragment inn i vertscellens genomen. Kontrollsekvenser for gjærvektorer er kjent innen fagområdet og inkluderer promotorer for syntesen av glykolytiske enzymer (Hess et al., 1968; Holland et al., 1978), inkludert promotoren for 3 fosfoglycerat kinase (Hitzeman, 1980). Terminatorer kan også inkluderes slik som de som er avledet fra enolase-genet (Holland, 1981), eller fra glyceraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAP) (se eksemplene). Spesielt nyttige kontrollsystemer er de som består av GAP- promotoren eller alkohol dehydrogenase regulerbar promotor, eller hybrider av denne (se eksemplene), terminatorer avledet fra GAP, og hvis utskillelse er ønsket, ledersekvenser fra gjærens alfa-faktor. I tillegg kan den transkripsjonelle regulatorregion og den transkripsjonelle initieringsregion som er operativt bundet være slik at de ikke er naturlig assosiert i den ville organisme. Disse systemene er beskrevet i detalj i US patentsøknader 468 589/1983, 522 909/1983, 760 197/1985, 868 639/1986, 073 381/1987, 081 302/1987 og 139 682/1987 og er innarbeidet herunder med referanser.

Pattedyrceller som er tilgjengelige som verter for uttrykking er kjent innen fagområdet og omfatter mange immortaliserte cellekulturer som er tilgjengelig fra ATCC, inkludert HeLa-celler, Kinesisk hamster eggstokkceller (CHO), nyreceller fra hamsterunger (BHK) og flere andre cellyper. Passende promotorer for pattedyrceller er også kjent innen fagområdet og inkluderer virale promotorer slik som den fra Simian virus 40 (SV40), Rous sarcoma virus (RSV), adenovirus (ADV) og bovin papilloma virus (BPV). Pattedyrceller kan også kreve terminatorsekvenser og poly A adenylerings-sekvenser; sekvenser som øker uttrykkingen kan også inkluderes, og sekvenser som forårsaker forsterkning av genet kan også være ønskelig. Disse sekvensene er kjent innen faget. Vektorer som er passende for replikasjon i pattedyrceller kan inkludere virale replikon, eller sekvenser som sikrer integrering av de passende sekvenser inn i vertens genomen.

III.B. Transformasjon

Transformasjonen kan være enhver kjent metode for å introdusere polynukleotider inn i en vertscelle, inkludert f.eks. pakking av nukleotidet i et virus og transduksjon av en

vertscelle med viruset, og ved direkte opptak av polynukleotidet. Transformasjonsproseduren som brukes er avhengig av verten som skal transformeres. For eksempel er transformasjon av *S.cerevisiae* med ekspresjonsvektorer som koder GO diskutert i det etterfølgende. Bakteriell transformasjon ved direkte opptak anvender generelt behandling med kalsium eller tubidiumklorid (Cohen, 1972; Maniatis, 1982). Gjærtransformasjon ved direkte opptak kan utføres ved bruk av metodene til Hinnen et al. (1978). Pattedyrtransformasjoner ved direkte opptak kan utføres ved bruk av kalsiumfosfat bunnfellingsmetoden til Graham og Van der Eb (1978), eller de ulike kjente modifikasjoner av denne.

10 III.C. Vektorkonstruksjon

Vektorkonstruksjon anvender teknikker som er kjent innen fagområdet. Posisjonsspesifikk DNA-splitting blir utført ved behandling med passende restriksjons-enzym under betingelser som generelt er spesifisert av produsenten av disse kommersielt tilgjengelige enzymene. Generelt blir omlag 1 mikrogram plasmid eller DNA-sekvens splittet ved 1 enhet enzym i en omlag 20 mikroliter bufferløsning ved inkubasjon i 1-2 timer ved 37°C. Etter inkubasjonen med restriksjonsenzymet blir proteinet fjernet ved fenol/kloroform-ekstraksjon, og DNA gjenvinnes ved bunnfelling med etanol. De oppsplittede fragmenter kan separeres ved bruk av polyakrylamid eller agarose-gel elektroforese-teknikker i henhold til de generelle prosedyrer som finnes i Method in Enzymology (1980) 65:499-560.

"Blunt ended" splitt-fragmenter kan ved bruk av *E.coli* DNA polymerase I (Klenow) i nærvær av de passende deoksynukleotid trifosfater (dNTP) som er tilstede i blandingen. Behandling med S1 nuklease kan også anvendes, med hydrolyse av enhver enkeltrådet DNA-del som resultat.

Ligasjoner blir utført ved bruk av standard buffer og temperaturbetingelser ved bruk av T4 DNA ligase og ATP; "sticky end" ligasjoner krever mindre ATP og mindre ligase enn "blunt end" ligasjoner. Når vektorfragmenter blir brukt som en del av en ligasjonsblanding er ofte vektorfragmentet behandlet med bakteriell alkalisk fosfatase (BAP) eller kalv intestinal alkalisk fosfatase for å fjerne 5'-fosfatet og således forhindre religasjon av vektoren; alternativt kan restriksjonsenzym oppbryting av uønskete fragmenter brukes for å hindre ligasjon.

Ligasjonsblandinger blir transformert inn i passende kloneverter slik som *E.coli*, og vellykkete transformanter utvalgt ved f.eks. antibiotisk motstand, og underlagt "screening" for den korrekte konstruksjon.

III.D. Konstruksjon av ønskete DNA-sekvenser

Syntetiske oligonukleotider kan lages ved bruk av en automatisert oligonukleotid-bygger som beskrevet av Warner (1984). Om ønskelig kan de syntetiske strenger merkes med ^{32}P , ved behandling med polynukleotid-kinase i nærvær av ^{32}P -ATP ved bruk av standard-
5 betingelser for reaksjonen.

DNA-sekvenser, inkludert de som er isolert fra cDNA- biblioteker, kan modifiseres ved kjente teknikker, inkludert f.eks. posisjonsorientert mutagenase, som beskrevet av Zoller (1982). Kort sagt blir DNA som skal modifiseres pakket inn i bakteriofaget som en enkelt-trådet sekvens, og konvertert til et dobbelt-trådet DNA med DNA-polymerase ved bruk av
10 et syntetisk oligonukleotid som er komplementært med den del av DNA som skal modifiseres, og som har den ønskete modifikasjon inkludert i dets egen sekvens. Det resulterende dobbelt-trådede DNA blir transformert inn i et bakteriofag som bæres av verts-bakterien. Kulturer av den transformerte bakterien, som inneholder replikasjoner av hver tråd av bakteriofaget, blir "plated" i agar for å oppnå "plaques". Teoretisk inneholder 50%
15 av de nye "plaques" bakteriofager som har den muterte sekvensen, og de resterende 50% inneholder den opprinnelige sekvensen. Kopier av "plaques" blir hybridisert til merkete syntetiske prøver ved temperaturer og betingelser som tillater hybridisering med den korrekte tråden, men ikke med den umodifiserte sekvensen. Sekvensene som har blitt identifisert ved hybridisering blir gjenvunnet og klonet.

20

III.E. Hybridisering med probe

DNA-biblioteker kan prøveres ved bruk av prosedyrene til Grunstein og Hogness (1975). Kort sagt, i denne prosedyren blir det DNA som skal prøveres immobilisert på nitro-cellulose-filtre, denaturert, og prehybridisert med en buffer som inneholder 0-50%
25 formamid, 0.75M NaCl, 75 mM Na-sitrat, 0.02% (vekt/volum) hver av bovin serum albumin, polyvinyl pyrrolidon, og Ficoll, 50 mM Na-fosfat (pH 6.5), 0.1% SDS, og 100 mikrogram/ml bærer denaturert DNA. Prosentandelen av formamid i bufferen, så vel som tiden og temperaturbetingelsene for prehybridiseringen og etterfølgende hybridiseringstrinn avhenger av de påkrevete restriksjoner. Oligomeriske prøver som krever mindre strenge
30 betingelser er generelt brukt med lave prosentandeler av formamid, lavere temperaturer og lengre hybridiseringstider. Prøver som inneholder mere enn 30 eller 40 nukleotider slik som de som er avledet fra cDNA eller genomiske sekvenser anvender generelt høyere temperaturer, f.eks. omlag 40-42°C, og en høy prosentandel formamid, f.eks. 50%. Etterfølgende prehybridisering blir $5'$ - ^{32}P -merket oligonukleotid-prøve tilsatt til bufferen, og

filterene blir inkubert i denne blandingen under hybridiseringsbetingelser. Etter vasking blir de behandlede filterene underlagt autoradiografi for å vise lokaliseringen av den hybridiserte prøven; DNA i korresponderende lokaliteter på de originale agar-platene blir brukt som kilden for det ønskete DNA.

5

III.F. Verifisering av konstruksjon og sekvensiering

For rutinemessige vektorkonstruksjoner blir ligasjonsblandinger transformert i *E.coli*-generasjonen HB101 eller andre passende verter, og vellykkete transformanter velges ut ved antibiotisk motstand eller andre markører. Plasmider fra transformantene blir deretter laget i henhold til metoden av Clewell et al. (1969), vanligvis etterfølgende kloramfenicol-forsterkning (Clewell, 1972). DNA blir isolert og analysert, vanligvis ved restriksjons-enzym-analyse og/eller sekvensiering. Sekvensiering kan utføres ved dideoksey-metoden til Sanger et al. (1977) som er ytterligere beskrevet av Messing et al. (1980). Problemer med bånd-kompresjon, som noen ganger observeres i GC-rike regioner, ble overvunnet ved bruk av T-deazoguanosin i henhold til Barr et al. (1986).

IV Eksempler

I lys av den foreliggende beskrivelse vil ulike anvendelser innenfor kravenes ramme være åpenbare for de fagkyndige. Prosedyrene som er vist i f.eks. de etterfølgende eksemplene kan om ønskelig repeteres som teknikker tilgjengelig for konstruksjon av de ønskete nukleotidsekvensene basert på informasjonen gitt innen oppfinnelsen. Uttrykking er eksemplifisert i *Saccharomyces cerevisiae*; andre systemer er imidlertid tilgjengelige som vist i IIIa.

Alle DNA-manipuleringer ble utført i henhold til standard- prosedyrer hvis annet ikke er nevnt. Se Maniatis et al. (1982). Enzymer forskjellig fra GO ble anvendt etter produsentens eller leverandørens retningslinjer. Enzymer, hvis annet ikke er nevnt, ble skaffet fra enten New England Biolabs eller Bethesda Research Laboratories. Gjær ble transformert og dyrket ved bruk av flere medier, inkludert selektivt medium (gjær nitrogen base uten leucin); YEPD medium inneholdende 1% (vekt/volum) gjærekstrakt, 2% (vekt/volum) pepton; og 2% (vekt/volum) glukose, samt andre som beskrevet under. I tilfellet med "plating" medium inneholdt det 2% (vekt/volum) agar og for transformasjon, 3% topp agar med 1M sorbitol.

E.coli-generasjoner som er nyttige for transformasjon inkluderer CH1776; K12 generasjon 294 (ATCC nr. 31446); RR1, HB101 og D1210. Gjær-generasjoner som er nyttige for transformasjon inkluderer AB110 og GRF 180.

Gjær-generasjonen AB110 er av genotype Mat alfa, ura3-52, leu2-04, eller både leu2-3 og leu2-112, pep4-3, his4-580, cir°. En prøve av denne generasjonen som inneholdt et forskjellig heterologt plasmid ble deponert hos ATCC den 9 mai 1984 under aksessnr. 20709. Se EPO publikasjonsnummer 164 556.

5 Gjær-generasjonen GRF180 er av genotype leu2-3, leu2-112, his3-11, his3-15, CAN, cir°. Denne generasjonen kan framskaffes ved herding av generasjonen GRF18 (framskaffet som beskrevet i EP patentsøknad 858701070.9 (publiseringsnummer 0 184 575)) av dets endogene 2 millimikron plasmid ved bruk av pC1/1 eller et relatert plasmid som beskrevet av Erhard og Hollenberg (1983).

10 GO-aktivitet ble målt ved å kople peroksidase-o-dianisidin- systemet til de GO-katalyserte reaksjonene. Analyser for GO som er basert på dette koplete systemet er beskrevet i litteraturen med ledsagelse av kommersiell tilvirking av GO levert av Sigma Corp., og av Worthington Corp. Generelt blir reaksjonen utført i en vannløsning i nærvær av en buffer med pH 5.0-6.0, beta-glukose, pepperrot peroksidase, og o-dianisidin.

15 Oksidasjonen av fargestoffet med hydrogen peroksidet dannet i reaksjonen blir overvåket ved økningen i optisk densitet ved 450 nm eller 500 nm. En enhet GO-aktivitet er definert som den mengde enzym som frigjør ett mikromol hydrogen peroksid per minutt under de spesifikke reaksjonsbetingelser.

20 **IV.A. Tilvirking, isolering og sekvensiering av cDNA som koder GO fra A.niger**

Generelt ble GO-kodende cDNA fra A.niger framskaffet ved utvelgelse av et cDNA-bibliotek konstruert i lambda gt10 med oligonukleotid prober som ble utviklet på grunnlag av aminosyresekvensene i peptidfragmentene i rensset GO.

25 **IVA.1. Tilvirking av et cDNA bibliotek som inneholder GO- kodende sekvenser fra A.niger**

For å definere en kilde av nukleinsyrer som koder GO, ble generasjoner av A.niger skaffet fra ATCC undersøkt med hensyn til GO-produksjon. En generasjon i særdeleshet, A.niger 9029, ble brukt som kilde for mRNA hvorfra cDNA-biblioteket kunne lages siden det var bestemt at denne generasjonen produserte GO og skilte det ut i mediet. For å bestemme om GO ble produsert, ble generasjonen dyrket i YEPD-medium, og GO-aktivitet i de kondisjonerte media ble bestemt. GO-aktivitet ble målt ved å kople peroksidase-o-dianisidin-systemet til GO-systemet.

Nærværet av GO i det kondisjonerte mediet ble bekreftet ved Western "blot"-analyse ved bruk av et preparat av kanin anti-GO antistoff, som ble skaffet fra Accurate Chemicals.

cDNA-biblioteket ble laget fra poly A⁺_RNA som var isolert fra mycelia av *A.niger* 9029, som var i log-fasevekst i YEPD- medium. Først ble totalt RNA isolert ved en modifisering
5 av prosedyren til Chirgwin et al. (1979). Denne metoden involverer nedbrytning av celler i 4M guanidin tiocyanat og 0.1M merkaptoetanol for å denaturere proteiner og bryte disulfidbindinger. RNA ble deretter separert fra DNA og proteiner ved ultrasentrifugering gjennom en 5.7M CsCl buffer som beskrevet av Glisin (1974), bortsett fra at en vertikal rotor (VTi50, Beckman) ble brukt i stedet for en svingende turbinrotor. Poly A⁺_RNA fraksjonen
10 ble isolert som beskrevet av Maniatis et al. (1982) ved bruk av to passasjer over oligo-dT cellulose. Syntesen av cDNA fra poly A⁺_RNA, og dannelsen av et cDNA-bibliotek fra *A.niger* 9029 poly A⁺_RNA i lambda gt10 ble utført i henhold til en metode beskrevet av Huynh (1985); cDNA-syntesen var ved revers transkriptase ved bruk av tilfeldige primere. Kompleksiteten av biblioteket var 1.6×10^6 .

15

IV.A.2 Tilvirking av prøver og undersøking av bibliotek

For å konstruere prøver som kunne være passende til å undersøke lambda gt10 biblioteket for bakteriofag inneholdende GO-kodende cDNA (GO cDNA), ble aminosyresekvensen i oligopeptidfragmenter av rensset GO bestemt. Dette programmet ble fulgt siden
20 forsøk på å oppnå aminosyresekvensen fra hele polypeptidet overraskende var mislykket, og ga en sekvens for kun de 10 første aminosyrene.

Kommersiell GO ble videre rensset ved elektroforese på en polyakrylamidgel i nærvær av natrium dodecylsulfat (SDS) under betingelsene beskrevet av Laemmli (1970). Proteinet ble vasket fra gelen, og ble fragmentert ved nedbrytning med trypsin eller med cyano-
25 bromid (CNBr), hvis prosedyrer er standardmetoder innen proteinkjemi. CNBr-nedbrytningen skjedde i 70% maursyre. Trypsin-nedbrytningen ble utført etter behandlingen av GO med metylmaleinsyre anhydrid som spesifikt blokkerer lysinrester, for derved å redusere spesifiteten i trypsin for de umodifiserte argininrester. Proteinet ble typisk redusert og karboksymetylert ved bruk av merkaptoetanol og iod-eddiksyre forut for disse
30 behandlingene for å bryte alle disulfidbindinger.

De resulterende peptider ble separert og rensset ved HPLC. Flere metoder ble brukt. Både nøytrale og sure revers-fase systemer ved bruk av acetonitril-gradienter ble anvendt. Innledningsvis ble fragmenter separert i størrelsesklasser ved bruk av Bio-Gel P-10 i 30% maursyre, eller separert i ladningsklasser ved bruk av ionebytterkromatografi i 6M urea

buffersystemer; FPLC Mono-S og Mono-Q ble brukt for å ytterligere separere fragmenter for sekvensanalyse. For å være sikker på at peptidfragmentene som skulle analyseres var rene, ble rensingen på HPLC typisk utført to ganger; dvs. at det rensede fragmentet ble underlagt ytterligere rensing ved å gjenta HPLC-prosedyren. Aminosyresekvensene i

5 peptidfragmentene i GO ble bestemt ved bruk av en gassfase "sequenator" (Applied Biosystems), i henhold til produsentens retningslinjer. Sekvensene av fragmentene som resulterte fra denne analysen er vist i figur 1. I figuren indikerer parentesene uregelmessigheter i sekvensen som lest fra kromatogrammer med unntak av Arg eller Met-restene ved N-termini som er antatt å være fra splittingsreagenset (trypsin eller CNBr).

10 Oligonukleotidprøver ble laget på to måter. Prøver på 17 til 23 nukleotider ble laget fra regioner med minst degenerasjon. Alternativt ble unike prøver basert på gjetninger av kodon-farge. Prøver som ble laget for "screening" av lambda gt10-biblioteket inneholdende sekvenser som koder GO fra *A.niger* er vist i figur 2. Figuren viser aminosyresekvensen i fragmentene, og prøvene avledet fra sekvensene. Størrelsen på den oligomeriske prøve og

15 graden av degenerasjon for de kortere prøvene er også vist.

Lambda gt10 biblioteket ble "screened" for GO cDNA-holdige kloner ved bruk av de ovennevnte prøvene. Prøvene ble laget ved kjemisk syntese i henhold til konvensjonelle prosedyrer ved bruk av fosforamid-kjemi som beskrevet i Urdea et al. (1983). De syntetiske prøvene ble merket med ^{32}P ved bruk av T_4 polynukleotid kinase i nærvær av ^{32}P -ATP.

20 Metodene for merking av prøver er beskrevet i Maniatis et al. (1982).

"Screeningen" av lambda gt10 biblioteket med prøvene var hovedsaklig som beskrevet av Huynh (1985). Filtere ble hybridisert over natta i romtemperatur med 100 000 dpm/ml av hver av prøvene lengde 6, lengde 7 og lengde 8 i 4 x SSC, 50 mM Na-fosfat, pH 6.8, 2 x Denhardt's løsning, og 0.3 mg/ml "sonicated" laksesperm DNA. De ble deretter vasket ved

25 47°C i 3.0M tetrametylammoniumklorid i henhold til Wood et al. (1985), og autoradiografert i 6 dager. Ingen av de korte prøvene var brukbare for detektering av kloner som inneholdt GO cDNA. Biblioteket ble også "screened" med prøver lengde 6, lengde 7, og lengde 8 som et pool; etter 6 dagers eksponering ble det oppnådd 4 lette dobbel-positive fra 4×10^5 bakteriofaget som ble "screened". Ved gjentatt "screening" med bassenget var fortsatt

30 disse fire klonene positiv for GO cDNA. Bakteriofaget ble deretter replatert i triplikat, og "screened" med de tre prøvene med individuell lengde. De fire klonene hybridiserte med prøvene lengde 7 og lengde 8. Ingen av klonene hybridiserte imidlertid med lengde 6. Dette resultatet var overraskende siden prøvene lengde 7 og 8 er under-sett av lengde 6, med unntak av en enkel baseendring. (se figur 3)

Nærværet i de fire positive klonene av cDNA som binder lengdene 7 og 8 ble bekreftet ved Southern "blot" analyse av DNA. DNA som var isolert fra hver klon ble behandlet med EcoRI, og analysert ved Southern "blot" analyser som beskrevet av Maniatis et al. (1982, ved bruk av en blanding av prøver lengde 7 og 8. I hver klon hybridiserte kun et enkelt bånd med prøvene. Størrelsen på cDNA i båndene var henholdsvis 0.9 kB, 0.9 kB, 0.3 kB og 0.7 kB for klon 1-4.

Bevis på at cDNA i klon 4 overlappet det i de tre andre klonene ble framskaffet ved å vise at cDNA-innføringen isolert fra klon 4 hybridiserte med cDNA-innføringene i klone 1, 2 og 3 under strenge betingelser. Innføringen i cDNA fra klone 4 ble fjernet med EcoRI, isolert ved gel elektroforese og $^3\text{2}_p$ -merket ved "nick"-translasjon. Metoden for "nick"-translasjon var som beskrevet av Maniatis (1982). De andre tre klonene ble oppbrutt med EcoRI, underlagt elektroforese på en 1% agarosegel og "blotted" på nitrocellulose. Den "nick"-translaterte klon 4 prøve ble denatureert og hybridisert til "Southern blot" under betingelsene som beskrevet ovenfor for "screening" av cDNA- biblioteket bortsett fra at blandingen inneholdt 50% formamid og at inkubasjonen ble utført ved 42°C over natta. Filteret ble deretter vasket ved 60°C i 0.1 x SSC og autoradiografert.

IV.A.3 Nukleotidsekvenser i GO cDNA

cDNA i klon 1 til 4 ble bestemt ved Sanger et al.'s metode (1977). I hovedsak ble cDNA fjernet fra klonene med EcoRI og isolert ved størrelsesfraksjonering ved bruk av gel elektroforese. EcoRI restriksjonsfragmentene ble underklonet i M13 vektorene, mp18 og mp19 (Messing (1983)), og sekvensiert ved bruk av dideokxy kjedetermineringsmetoden til Sanger et al. (1977).

Nukleotidsekvensene i EcoRI-fragmentet (omtrentlig 700 bp) fra klon 4 er vist i figur 4. Reestriksjons-enzymkartet av fragmentet er vist i figur 4a. Nukleotidsekvensen, så vel som aminosyrene kodet derunder, er vist i figur 4b. Posisjonene for restriksjonsenzymposisjonene er også indikert i figur 4b. GO cDNA-fragmentet i klon 4 består av en enkel leseblokk. To av peptidfragmentene som ble analysert ved aminosyre sekvensanalyse er kodet i klon 4 GO cDNA, bortsett fra at to av de 36 aminosyrerestene er endret. Aminosyresekvensene av fragmentene er vist i figur 1.

Et sammensatt cDNA kan være konstruert fra nukleotidsekvensene fra GO cDNA i klon 1 og 2, der den sistnevnte sannsynligvis er en cDNA klon med fullstendig lengde. Nukleotidsekvensen i det sammensatte cDNA er vist i figur 5. Figur 5a viser et restriksjons enzymkart av sekvensen. Figur 5b viser den sammensatte nukleotidsekvensen avledet fra

klonene, og indikerer restriksjons-enzymposisjonene. Figur 5b viser også aminosyrene kodet i sekvensen. Fra sekvensene kan det bestemmes at det fullstendige protein består av 583 aminosyrer; aminosyresekvensen inneholder kun 3 cysteinrester og 8 overensstemmende glykosyleringsposisjoner. I aminosyresekvensen finnes det en prepro-sekvens med 22 aminosyrer, med en enkel splittposisjon (Arg-Ser) ved begynnelsen av den fullstendige sekvensen.

Bevis på at den sammensatte cDNA-sekvensen koder GO ble framskaffet ved en sammenlikning mellom aminosyresekvensene av peptidfragmentene fra rensset GO (se IV.A.2)) og de som er kodet i det sammensatte cDNA. Denne sammenlikningen er vist i figur 6, der den avledete aminosyresekvensen er indikert over nukleotidsekvensen. De aminosyresekvensene som samsvarer med sekvensene i peptidfragmentene fra rensset GO er understreket. Uregelmessigheter i den avledete sekvensen og sekvensen i fragmentene fra rensset GO er også indikert. Fra figur 6 kan en se at det er svært få forskjeller mellom cDNA avledete sekvenser og de som er isolert fra GO-peptider.

Figur 6 viser også data for molekylvekten av polypeptidet som inkluderer signalpeptidet, og for kodon bruken i A.niger, basert på nukleotidsekvensen som koder GO.

Det kan forutses at det fullstendige uglykosylerte GO ville hatt en molekylvekt på 63 300. Det fullstendige polypeptidet inneholder 8 overensstemmende glykosyleringsposisjoner. Ved å anta 2 kD karbohydrater for hver posisjon, ville molvekten for en glykosylert GO monomer være 79 kD. Dette er i overensstemmelse med den observerte molekylvekt for en GO monomer, som er 75 kD. Dessuten er aminosyresekvensen avledet fra cDNA-sekvensen i overensstemmelse med aminosyresekvensen som er rapportert i litteraturen. Den rapporterte aminosyresammensetningen er blitt bekreftet i separate eksperimenter (ikke vist). I tillegg, som vist i IV, gir uttrykking av cDNA aktivt glukose-25 oksidase.

IV.B. Isolering og sekvensanalyse av genomiske sekvenser som koder GO.

Oligonukleotid-prøvene beskrevet ovenfor i avsnitt IV.A.2, og "nick"-translaterte fragmenter av GO cDNA, som ble isolert som beskrevet i avsnitt IV.A.2, ble brukt ved isoleringen av en genomisk A.niger klon fra et pBR322-basert A.niger bibliotek laget i E.coli generasjon DH5.

IV.B.1. Konstruksjon av A.niger-biblioteket og isolering av genomiske kloner som koder GO.

Genomisk DNA ble laget fra A.niger 9029-celler ved metoden til Boel et al. (1984). DNA'et (50 mikrogram) ble behandlet med Sau3a under betingelser som ga delvis nedbrytning (1 enhet Sau3a i 1 ml volum i 50 minutter ved 37°C), og reaksjonen ble avbrutt ved tilsats av EDTA. Det oppbrutte DNA ble kjørt på en preparativ 1% agarosegel, og DNA i størrelsesområdet 7-10 kB ble isolert. Dette DNA ble bundet til pBR322 som var blitt linearisert med BamHI, behandlet med alkalisk fosfatase og gel-isolert. Det resulterende bundete DNA ble transformert inn i E.coli og plattert på 10 store plater. Totalt 340 000 transformanter ble oppnådd. Plasmid DNA ble laget fra hver plate separat, med et utbytte av omtrent 35 000 rekombinanter. Kolonier fra et enkelt pool i et antall på 60 000 ble plattert, og doble nitrocellulose-kopier ble laget. Et 600 bp NcoI-EcoRI fragment fra cDNA klon 2 ble "nick"-translatert og brukt som en prøve under betingelsene beskrevet ovenfor. Etter autoradiografi ble det oppnådd 4 potensielle kloner, hvor en, 17a, senere viste seg å være korrekt ved "Southern blotting" og sekvensanalyse.

IV.B.2 Restriksjons fragment lengdeanalyse av det genomiske DNA som koder GO.

Nærværet eller fraværet av intron i genomiske sekvenser kan bestemmes ved å sammenlikne størrelsene av fragmentene av cDNA og genomisk DNA oppnådd ved restriksjon-enzym-oppbrytning. Fragmentene ble analysert ved "Southern"-metoden ved bruk av en prøve for å detektere sekvenser som kodet GO.

Genomisk klon 17a og cDNA klon pBRLambda2A ble begge brutt opp med NcoI, som kutter 4 ganger i cDNA til å gi et spesielt mønster av små fragmenter. Etter analyse på både agarose og akrylamidgeler viste det seg at NcoI restriksjonsmønsteret var det samme for begge klonene. Deretter ble klon 17a DNA oppbrutt med EcoRI, XhoI, SalI og HindIII; oppbrytningen ble utført enkeltvis og parvis. Disse oppbrytingsproduktene ble underlagt elektroforese på agarosegeler og overført til nitrocellulosefiltere. Filterene ble undersøkt med et 600 bp NcoI-EcoRI fragment fra 5'-halvdelen av cDNA og med et 1100 bp EcoRI fragment fra 3'-halvdelen av den genomiske sekvensen i klon 17a. Disse prøvene var merket med ^{32}p ved "nick"-translasjon. I alle tilfellene var det genomiske kartet i overensstemmelse med cDNA-kartet.

I tillegg ble genomisk DNA fra A.niger oppbrutt med de samme enzymene, "blotted" og hybridisert med de samme prøvene. Resultatene ga det samme mønsteret som observert

med klon 17a. Disse resultatene indikerer at rearrangementer og/eller fjerninger ikke hadde funnet sted under kloneprosedyren.

Analysen ved "Southern blotting" indikerte at restriksjonsenzym-fragmentene som ble påvist ved prøvene var av samme størrelse i GO cDNA, i de genomiske kloner, og i de 5 genomiske sekvenser i DNA isolert fra *A.niger*. Dette gir bevis for det overraskende resultat at *A.niger* genomisk DNA som koder GO mangler intron-sekvenser.

IV.B.3 Nukleotidsekvenser for GO promotor-regionen

Det er antatt at regionen som flankerer 5'-terminus i sekvensen som koder GO inneholder 10 promotorsekvensen for genet. Denne region og den tilstøtende region som koder NH₂-regionen i GO ble isolert som et polynukleotid-fragment fra en genomisk klon av GO, og nukleotidsekvensen i det isolerte fragmentet ble bestemt.

Promotor-regionen i GO-genet ble isolert fra den genomiske klon 17a (se avsnitt IV.B.4 for tilvirking av genomiske kloner). Fragmentene splittet fra pBR322 vektorsekvensene ved 15 oppbryting med EcoRI og SallI, og fragmentene med omtrentlig 609 bp ble isolert ved gel elektroforese. Det isolerte fragmentet ble klonet inn i M13 vektorer, og sekvensiert ved dideoxy kjedetermineringsmetoden (se avsnitt IV.A.3.). Sekvensen i denne regionen er vist i figur 7. Restriksjons-enzymkartet av sekvensen er vist i figur 7a; sekvensen og restriksjonsenzym-posisjonene er vist i figur 7b. Figur 7b viser også aminosyresekvensene 20 for den NH₂- terminale region av GO, som er kodet i den genomiske klon.

IV.C Konstruksjon av vektorer for uttrykking av GO-cDNA i gjær.

To ekspresjonsvektorer for produksjon av GO i gjær ble konstruert. I disse ekspresjonsvektorene er sekvensene som koder GO operativt bundet til sekvenser for 25 transkripsjon og uttrykking av GO polypeptidet. Begge vektorene inneholder ADH2- GAP hybridpromotoren for regulert transkripsjon. I tillegg er enten *S.cerevisiae* alfa-faktor leder-sekvensen eller GO preprosekvansen fusjonert til den fullstendige GO-kodende sekvens for å forårsake utskillelse.

GO cDNA fra klon 2 (se avsnitt IV.A.2.) ble fjernet fra lambda gt10 som et HindIII-BglII 30 fragment. Det resulterende restriksjons-fragmentet, som inneholdt noe flankerende lambda gt10 DNA, ble ført inn mellom HindIII og BamHI posisjonene i pBR322, for å skape vektoren pBR-lambda-GO2. Skjemaene for konstruksjonen av ekspresjonsvektorer ved bruk av GO cDNA- sekvensene i pBR-lambda-GO2 er vist i figur 8.

IV.C.1 Konstruksjon av en uttrykks-kassett i pAGS_{co}GO

En uttrykkskassett lokalisert i et plasmid som framviser replikasjon i E.coli, deri sekvensene som kodet GO ble operativt bundet til kontrollsekvenser, som inkluderte gjærens ADH2-GAP hybridpromotor, GAP-terminator, og utskillelses-signal som ble
5 avledet fra A.niger GO-genet, ble konstruert som følger.

pBRLambda-2a DNA ble oppbrutt med SallI, som kutter omtrentlig 120 bp fra N-terminus i den GO-kodende sekvens,

og som kutter en gang i pBR322. Et syntetisk dupleks som koder N-terminus i den fullstendige GO-kodende sekvens ble laget og bundet til dette oppbrytningsproduktet.

10 Sekvensen i duplekset var:

**5' AGATCTAATGGCATTGAAGCTTCCCTCCTGACTGATCCCAAGGATGTCT
ATTACCGTAACTTCGAAGGGAGGACTGACTAGGGTTCTACAGA**

CCGGCCGCACGG 3'

15 **GGCCGGCGTGCCAGCT**

Em BglII-posisjon ble lett vint plassert ved N-terminus i det fullstendige GO, ved stille mutasjoner i sekvensen som koder Arg-Ser. Etter ligasjon ble blandingen oppbrutt med BglII og PstI, og et 980 bp fragment inneholdende N-terminal halvdel av GO cDNA ble isolert ved gel elektroforese.

20 Fragmentet som inneholdt C-terminal regionen av GO cDNA ble isolert ved bortskjæring av cDNA med EcoRI, behandling av det fjernete fragmentet med Klenow og binding av en syntetisk BglII lenker til fragmentet. Lenkeren hadde sekvensen:

5' GAGATCTC 3'

25 Det resulterende fragmentet ble oppbrutt med BglII og PstI. Etter denne behandlingen ble GO cDNA-fragmentet, som var 950 bp, isolert ved gel elektroforese.

Fragmentene 980 bp og 950 bp ble bundet. Siden bindingen kunne skje ved de "sticky" ender avledet fra både PstI og BglII, ble de bundete fragmentene behandlet med BglII for således å gi GO cDNA som inneholdt "sticky" ender som kunne danne BglII-posisjoner.

30 Vektoren pAGAP1 er et derivat av pPGAP1 der den regulerbare promotor alkohol dehydrogenase - glyceraldehyd-3 fosfat dehydrogenase (ADH2-GAP) erstatter promotoren glyceraldehyd-3 fosfat dehydrogenase (GAPDH). Plasmidet pPGAP1 er beskrevet i Travis et al. (1985), i EPO publ.nr. 164 556 samt i US patentsøknad 760 197/1985. I pAGAP1 er ADH2- GAP promotoren bundet til GAP-terminatoren. Promotoren er et 1200 bp BamHI-

unik BglII-posisjon ved den dibasiske prosess-posisjon (lys-arg, eller i en bokstavkode K-R9, for KEX2. Plasmidet som resulterte fra innføringen av GO cDNA-fragmentet i pCBR er kalt pAG_{alfa}GO.

5 IV.C.3. Konstruksjon av gjærens ekspresjonsvektor som koder GO

Gjærens ekspresjonsvektorer deri GO-sekvensen er operativt lenket til sekvenser som kontrollerer uttrykkningen og utskillelsen av GO polypeptidet ble konstruert ved fjerning av uttrykkskassetter fra pAG_{GO}GO og pAG_{alfa}GO med BamHI, og innføre uttrykkskassetten i den unike BamHI-posisjonen til plasmidet pAB24.

- 10 Plasmidet pAB24 (figur 9) er en gjær skyttelvektor som inneholder den komplette 2 mikron sekvens (broach (1981)) og pBR322 sekvensene. Det inneholder også gjærens URA 3 gen avledet fra plasmid YEp24 (Botstein et al. (1979)) og gjærens LEU2d gen avledet fra plasmid pC1/1. EPO publ.nr. 116 201. Plasmid pAB24 ble konstruert ved oppbryting av YEp24 med EcoRI og gjenbinde vektoren for å fjerne de partielle 2 mikron sekvensene. Det
- 15 resulterende plasmid YEP24_{delta}Ri ble linearisert ved oppbryting med ClaI og bundet med det komplette 2 mikron plasmid som var linearisert med ClaI. Det resulterende plasmid pCBou ble deretter oppbrutt med XbaI, og 8605 bp vektorfragmentet ble gel-isolert. Dette isolerte XbaI-fragmentet ble underlagt ligasjon med et 4460 bp XbaI-fragment inneholdende LEU2-genet isolert fra pC1/1; orienteringen av LEU2d-genet er i samme
- 20 retning som URA3 genet.

- For å konstruere gjærens ekspresjonsvektorer ble uttrykkskassetten fjernet fra pAGS_{GO}GO og pAG_{alfa}GO ved oppbryting med BamHI, og plasmid pAB24 ble linearisert med det samme restriksjonsenzymet og oppbrutt med fosfatase. De fjernete uttrykkskassetten ble isolert ved gel elektroforese. Det lineariserte plasmidet ble bundet enten med
- 25 uttrykkskassetten fra pAGS_{GO}GO til å gi vektoren pAB24AGS_{GO}GO, eller med uttrykkskassetten fra pAG_{alfa}GO til å gi vektoren pAB24AG_{alfa}GO.

IV.D. Uttrykking av GO i gjær fra pAB24AGS_{GO}GO-10 og fra pAB24_{alfa}GO-1

- Kloner av to av ekspresjonsvektorene for produksjonen av GO ble isolert, dvs.
- 30 pAB24AGS_{GO}GO-10 og pAB24AG_{alfa}GO-1. Vektorene ble konstruert som beskrevet i avsnitt IV.C. Begge vektorene inneholdt ADH2-GAP hybridpromotoren for regulert transkripsjon, og enten *S.cerevisiae* alfa-faktor lederen (pAB24_{alfa}GO), eller GO prepro-sekvensen ble fusjonert med den fullstendige GO-kodende sekvensen (pAB24S_{GO}GO).

Etterfølgende analyse av nukleotidsekvensene for nukleotidsekvensene som koder GO avslørte nærværet av mutante sekvenser i disse klonene.

IV.D.1. Uttrykking fra pAB24_{alfa}GO-10 og fra pAB24_{GO}GO-1

5 Gjærgenerasjonen GRF180 ble transformert med de indikerte klonene fra disse plasmidene ved Hinnen's metode (1978), og leucin-prototroper ble utvalgt. Transformantene ble innpodet i leucin-selektivt medium inneholdende 8% glukose i 48 timer. Innokulatet ble fortynnet til en initiell $A_650 = 0.05$ i uttrykksmedium av YEP inneholdende 2% glukose. Kulturene ble dyrket ved 30°C og 300 opm; høstinger ble utført

10 hver 24 time. Celler ble separert fra det kondisjonerte mediet ved sentrifugering i en mikrosentrifuge i 1 minutt ved 14 000 opm, og glukoseoksidase-aktivitet tilstede i mediet og i celle-ekstraktene ble bestemt ved bruk av glukoseoksidase skaffet fra Sigma som en standard. Celle-ekstraktene ble laget ved omrøring av cellene med glass- perler. Dvs., celleklumpene ble blandet med et like stort volum syrevaskete glassperler i "lysis"-buffer

15 inneholdende 10 mM Tris, pH 8, og omrørt i 5 x 1 minutt med 1 minutt kjøling på is mellom omrøringene. Den uløselige celledbris ble fjernet ved sentrifugering ved 14 000 opm i en mikrosentrifuge ved 4°C. Resultatene for aktiv glukoseoksidase uttrykt etter 72 timers vekst er vist i tabell 1. I tabellen indikerer symbolet "ib" at aktiviteten ikke ble bestemt.

20

Tabell 1.

Uttrykking av GO i *S. cerevisiae* generasjon GRF 180

| Plasmid | pAB24 | pAB24S _{GO} GO-1 | | pAB24 _{alfa} GO-10 | |
|---------------|-----------------------------------|---------------------------|----|-----------------------------|----|
| Transformant | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| | GO-aktivitet (mikrogr./ml kultur) | | | | |
| Kond. medium | 0 | 54 | 63 | 51 | 31 |
| Celleekstrakt | 0 | 50 | ib | 53 | ib |

25 Resultatene fra tabell 1 indikerer at GO kodet i ekspresjonsvektorene er uttrykt i gjær, og at høye verdier av GO- aktivitet (>25 mikrogram/ml) er utskilt til mediet. Det ble ikke funnet noen målbar aktivitet fra kontrolltransformantene, transformert med pAB24. På tross av de høye nivå av utskilt GO- aktivitet er kun omlag 50% av den totale GO-aktivitet utskilt, noe som indikerer at den totale syntese av GO i disse transformantene er svært høy,

30

dvs. i noen tilfeller høyere enn 100 mikrogram/ml. Dessuten ser det overraskende ut til at utskillelses-signalet fra *A.niger* er en effektiv kontrollsekvens for utskillelsen av polypeptidet i *S.cerevisiae*, sammenliknet med gjærens alfa-faktor.

Ved bruk av en liknende prosedyre ble uttrykkningen av GO sammenliknet når vektorene ble brukt til å transformere GRF180 og AB110. Resultatene fra denne sammenlikningen indikerer at generasjon GRF180 er foretrukket framfor generasjon AB110 for både total uttrykking av GO-utskillelse.

IV.D.2. Karakterisering av de uttrykte polypeptider

10 IV.D.2.a. Påvisning av mutasjoner i de uttrykte polypeptider.

Påvisningen av mutasjoner i polypeptidene uttrykt i avsnitt IV.D.1 ble tillempet ved en DNA sekvensanalyse av N-termini av GO genene i uttrykkskassetene. Fragmentene som ble sekvensiert ble fjernet ved oppbryting av vektorene med *Sa*II og *Sac*I, og de resulterende 750 bp eller 940 bp stykkene avledet fra pAB24S_{GO}GO-1 og pAB24_{alfa}GO-10, henholdsvis, ble isolert ved gel elektroforese. De resulterende fragmentene ble klonet inn i M13mp18 og underlagt dideoxy sekvensiering. Sekvensene ble translatert i aminosyrene kodet deri, og disse ble sammenliknet med de sammenliknbare sekvensene kodet i cDNA. Resultatene fra analysen er vist i tabell 2, der aminosyresekvensene er betegnet med standard en-bokstav kode.

20

Tabell 2.

Sekvens av N-termini av GO i noen uttrykksplasmider.

| | | |
|----|-------------------------------|---------------------|
| | cDNA | RSNGIEASLLTDPKDVSGR |
| | pAB24AGS _{GO} GO-1 | RSNGIEDSLLIDPEDVSGR |
| 25 | pAB24AG _{alfa} GO-10 | RSRGIKASLLTDPKRVSGR |

I tabell 2 er den første S-resten den første terminale rest av det fullstendige polypeptidet. Aminosyresekvensene som skiller seg ut fra de som er kodet i cDNA er understreket. Det er mulig at disse mutasjonene resulterer fra urenheter i oligonukleotid-lenker som ble brukt under konstruksjonen av uttrykkskassetene.

30

IV.D.2.b Analyse av de uttrykte polypeptider ved elektroforese på polyakrylamidgeler i nærvær av SDS: effekten av endoglykosidase H på molekylstørrelse

Innledende analyser av medieprøvene fra IV.D.1 indikerte at det produserte GO ble hyperglykosylert, både med GO og alfa-faktorsignalene. Dette ble ytterligere undersøkt ved 5 å analysere effekten av endoglykosidase H (EndoH) på molekylstørrelsen av de uttrykte polypeptider. EndoH ble skaffet fra Boehringer-Mannheim, og brukt i henhold til leverandørens retningslinjer. Dette enzymet katalyserer deglykosyleringen av glykosylerte polypeptider.

Uttrykking av GO ble utført i transformanter av GRF180 inneholdende ekspresjons- 10 vektorene pAB24AGS_{GO}GO-10 og pAB24AG_{alfa}GO-1, som beskrevet i avsnitt IV.D.1. Etter 72 timers vekst i YEP- medium inneholdende 2% glukose ble mediet samlet opp. Prøver på omlag 1 ml av hvert medium ble konsentrert 10-20 ganger ved sentrifugering ved bruk av en Centricon-10 membran. Proteinene i de konsentrerte media ble utfelt ved tilsats av en halv volumdel 50% TCA inneholdende 2% deoksyholat som bærer (TCA/DOC). 15 Proteinklumpene ble gjenopløst i 50 mikroliter vann, og en halvpart av hver prøve ble behandlet med EndoH (1-2 mEnheter). Den andre halvpart av hver prøve ble inkubert under de samme betingelser men i fravær av EndoH. Som en referanse ble ekte glukoseoksidase fra *A.niger* behandlet på samme måte. Etter en andre TCA/DOC utfelling for å konsentrere prøvene ble polypeptidene kjørt på en 8% polyakrylamidgel inneholdende SDS under 20 betingelsene beskrevet av Laemmli (1970), og polypeptidene på gelen ble visualisert ved farging med "Coomassie-blått". Fra gelene ble det bestemt at GO uttrykt i gjær er hyperglykosylert, siden polypeptidene migrerte mindre enn standard GO i fravær av EndoH-behandling. Etter behandling med EndoH migrerte imidlertid gjærproduktene som en dublett av tilsynelatende molekylvekt på 68-70kD; den samme dubletten ble observert med 25 EndoH-behandlet standard GO.

I fraværet av EndoH-behandlingen hadde polypeptidet uttrykt og utskilt fra vektoren inneholdende gjærens alfa- faktor leder en tilsynelatende molvekt på 90-120 kD. Stoffet uttrykt fra denne vektoren har lavere molvekt, og ser ut til å være mindre heterogent enn GO polypeptidet utskilt fra gjær ved bruk av GO utskillelsses-sequensen. Dette er sant på 30 tross av det faktum at det er ytterligere 3 N- lenkete glykosyleringsposisjoner i alfa-faktor ledersequensen. Således kan utskillelse under kontroll av alfa-faktor lederen være mere effektiv. I tillegg er det etter behandling med EndoH observert lite eller intet stoff med molvekt i overensstemmelse med den for alfa-faktor lederen fusjonert med GO; dette bibringer at prosesseringen ved KEX2 av dette fusjonsproteinet er svært effektivt.

Det bør bemerkes at oppdagelsen av at preprosekvensen av GO fungerer som et utskillelsessignal i *S.cerevisiae* er et overraskende resultat.

IV.E. Effekten av EndoH på aktiviteten av GO

5 For å bestemme effekten av graden av glykosylering på aktiviteten av GO ble enzymet som var blitt uttrykt i og utskilt fra gjær, så vel som enzymet skaffet fra *A.niger*, oppbrutt med EndoH. Effekten av fjerningen av glykosyl-grupper på den enzymatiske aktivitet av GO ble notert.

De utskilte GO polypeptidene uttrykt i gjær ble framskaffet, og de kondisjonerte media
10 inneholdende polypeptidene ble konsentrert som beskrevet i avsnitt IV.D. Etter konsentrering ble hver prøve inndelt i 3 underprøver. En prøve ble brukt for å bestemme initiell GO-aktivitet. De resterende to prøvene ble inkubert ved 37°C over natta i 150 mikroliter av ei løsning inneholdende 0.2M natriumsitrat, pH 6, 0.12% SDS og 1 mM penylmetansulfonylfluorid (PMSF). En underprøve ble inkubert med EndoH, og den andre
15 ble inkubert uten EndoH. Etter inkuberingen ble GO-aktivitet bestemt i hver av de tre underprøvene. I tillegg ble deler av prøvene utfelt med TCA/DOC og analysert ved elektroforese på 8% polyakrylamid- geler i nærvær av SDS. Resultatene (ikke vist) var som følger. 1) GO-aktiviteten i polypeptidene utskilt fra rekombinant gjær, så vel som det fra *A.niger*, er stabil i 20 timer ved 37°C i fortynnet SDS. 2) Behandling med EndoH
20 inaktiverte ikke noen av GO-aktivitetene, som var innenfor 20% av den av de ubehandlede prøvene. 3) GO utskilt fra gjær under kontroll av dets egen preprosekvens ble glykosylert i større grad enn det utskilt under kontroll av alfa-faktor sekvensen. Den tilsynelatende molvekt av den foregående er i området 100-200 kD, mens den sistenvente har molvekt i området 75-150 kD. 4) Ingen endring i aktivitet ble observert i noen av prøvene (dvs. fra
25 prøvene uttrykt i gjær, eller fra standard GO fra *A.niger*) etter behandling med EndoH. Siden sluttproduktet etter EndoH-behandling i hovedsak er det samme molekyl bortsett fra karbohydratinnhold for GO, kan det konkluderes med at hyperglykosyleringen av produktet uttrykt i gjær ikke har noen effekt på enzymaktivitet.

Resultatet med at GO-aktivitet var relativt uavhengig av graden av glykosylering av GO
30 polypeptidet var overraskende. Det er blitt rapportert for andre proteiner (f.eks. "tissue" plasminogen aktivator), at hyperglykosylering av polypeptidet uttrykt i gjær reduserer biologisk aktivitet vesentlig. V. MacKay, "Secretion og Heterologous Protein in Yeast", i *Biological Research On Industrial Yeasts*, vol. II, s. 27.36, (CRC Press, Boca Raton, Fla).

IV.F. Konstruksjon av gjær ekspresjonsvektorer som koder GO av naturlig type, og uttrykking av dette.

For å konstruere naturlig GO ekspresjonsvektorer ble SalI-BglII 1.9 kb fragmenter fra de mutante plasmider isolert og underlagt ligasjon med friske syntetiserte oligomere som koder den korrekte N-terminal sekvensen. Sekvensene for oligomerene var de som er vist ovenfor konstruksjonen av uttrykkskassetene. Fragmentene ble oppbrutt med BglII, og det korrigerede genet ble ført inn i ekspresjonsvektorene. DNA sekvensanalyse av innføringene viste at de resulterende vektorene inneholdt de korrekte sekvensene ved N-termini.

Kloner av hver av disse vektorene er blitt isolert og er tildelt navene pAB24AGSGO og pAB24AG@GO for vektorene som inneholder henholdsvis A.niger preprosekvensen og alfa-faktorsekvensen som utskillelses kontroll-elementer. Vektoren pAB24AGSGO er også kalt pSGO2 (eller pSGO-2); vektoren pAB24@GO (pAB24alfaGO) er også kalt p@GO-1 (p-alfa- GO1). Restriksjonsenzym-kart av pSGO-2 og av p@GO-1 er vist i henholdsvis figur 11 og 12.

15

IV.G. Uttrykking av naturlig type GO i gjær og karakterisering av de uttrykte polypeptider.

IV.G.1 Uttrykking av GO i transformanter av *S.cerevisiae*

Mengde GO-aktivitet uttrykt i *S.cerevisiae* transformert med ekspresjonsvektorer som inneholder sekvenser som koder naturlig type GO ble bestemt.

Generasjon GRF180 ble transformert med de klonete gjær ekspresjonsvektorene pAB24AGSGO eller pAB24AG@GO. Transformasjonen ble utført etter Hinnen's metode (1970), og leucin-prototroper ble utvalgt. Inokuleringskulturer av de individuelle transformantene ble laget ved dyrking av transformantene i 2 ml leucin-selektive media inneholdende 8% glukose i 48 timer. Deretter ble inokulatene fortynnet til $A_{650} = 0.05$ med ikke-selektive media, og ble dyrket i 96 timer ved 30°C og 300 opm. Etter dyrking ble cellene fjernet fra de kondisjonerte media ved sentrifugering i en mikrosentrifuge i 1 minutt ved 14 000 opm, og GO-aktivitet tilstede i media ble bestemt.

Resultatene fra GO-aktiviteten uttrykt i gjær fra de to ekspresjonsvektorene, og utskilt til de kondisjonerte media er presentert i tabell 3. I tabellen er GO-aktivitet uttrykt i mikrogram/ml kultur.

Tabell 3.

Uttrykking av naturlig type GO i transformanter av GRF180 inneholdende gjær ekspresjonsvektorene pAB24AGSGO eller pAB24AG@GO.

| Plasmid | pAB24 | pAB24AGSGO | pAB24AG@GO |
|----------------|-------|------------|------------|
| 5 Transformant | 1 | 1 | 2 |
| GO-aktivitet | 0 | 148 | 179 |
| | | 202 | 170 |

En sammenlikning av resultatene vist i tabell 3 med de i tabell 1 antyder enten at det naturlig type GO uttrykt i gjær har en høyere spesifikk aktivitet enn de mutante GO, eller at enzymet blir uttrykt i større mengder enn mutantene.

10

IV.G.2. Karakterisering av de uttrykte polypeptidene ved elektroforese på SDS polyakrylamid-geler: effekten av EndoH.

Kulturer av gjær transformanter inneholdende ekspresjonsvektorene pAB24AGSGO og pAB24AG@GO ble dyrket som beskrevet i avsnitt IV.G.1. Etter dyrkingen ble cellene
15 fjernet ved sentrifugering, og GO-aktivitet i de kondisjonerte media ble bestemt. Media fra transformanter inneholdende pAB24AGSGO og pAB24AG@GO hadde GO-aktiviteter på henholdsvis 190 mikrogram/ml og 260 mikrogram/ml.

Forut for oppbryting med EndoH ble GO polypeptidene delvis rensset. Media ble fortynnet 10 ganger med 0.01M acetat, pH 4.5, og passert gjennom DEAE-cellulose Fast
20 Flow (Pharmacia) kolonner. Etter oppsatsing ble kolonnene vasket med den samme buffer, og GO ble deretter eluert med 0.1M acetat, pH 3.7.

GO polypeptidene uttrykt fra gjær, både før og etter delvis rensing, ble oppbrutt med EndoH over natta ved 37°C. Oppbrytingsbetingelsene var som beskrevet i avsnitt IV.E., bortsett fra at 50 mikroliters underprøver av prøvene ble oppbrutt; kontrollprøvene ble
25 inkubert under oppbrytingsbetingelser i fravær av EndoH. Etter inkubasjonen ble prøvene utfelt med TCA, vasket 3 ganger med aceton for å fjerne TCA, og det ekvivalente av 12.5 mikroliter av det opprinnelige volumet av hver prøve ble satset på en 8% polyakrylamid-gel. Elektroforese gjennom gelen skjedde i nærvær av SDS under reduserende betingelser, som beskrevet av Laemmli (1970). Polypeptidene i gelen ble detektert ved farging med
30 "Commassie" blått. Et fotografi av gelen er vist i figur 10; prøvene i de ulike feltene er som beskrevet i tabell 4, som også viser mengden av GO i prøven. I tabellen betyr symbolet + at prøven ble behandlet med EndoH; symbolet - betyr at prøven ble inkubert under oppbrytingsbetingelser i fravær av EndoH. Tallet i parentes etter prøven indikerer

fraksjonsnummeret som eluert fra DEAE-cellulose kolonnen. Som en kontroll ble GO fra A.niger underlagt inkubasjon under oppbrytingsbetingelser i nærvær av eller i fravær av EndoH.

Tabell 4.

5 Effekten av EndoH oppbryting på migreringen av naturlig type GO uttrykt i gjær.

| | Felt | GO avledet fra | EndoH | Mengde GO (mikrogram) |
|----|------|-------------------|-------|--------------------------|
| | M | Markører | | |
| | 1 | A.niger | - | 0.2 |
| | 2 | A.niger | + | 0.2 |
| 10 | 3 | pAB24AGSGO(media) | - | 2.4 |
| | 4 | pAB24AGSGO(media) | + | 2.4 |
| | 5 | pAB24AGSGO(fr.2) | - | 3.7 |
| | 6 | pAB24AGSGO(fr.2) | + | 3.7 |
| | 7 | pAB24AGSGO(fr.3) | - | 8.1 |
| 15 | 8 | pAB24AGSGO(fr.3) | + | 8.1 |
| | 9 | pAB24AGSGO(fr.4) | - | 1.4 |
| | 10 | pAB24AGSGO(fr.4) | + | 1.4 |
| | 11 | pAB24AG@GO(media) | - | 3.2 |
| | 12 | pAB24AG@GO(media) | + | 3.2 |
| 20 | 13 | pAB24AG@GO(fr.2) | - | 2.5 |
| | 14 | pAB24AG@GO(fr.2) | + | 2.5 |
| | 15 | pAB24AG@GO(fr.3) | - | 18.8 |
| | 16 | pAB24AG@GO(fr.3) | + | 18.8 |

25 Resultatene vist i gelen i figur 10 bekrefter at store mengder GO-protein blir laget. Siden ekvivalentene av kun 12 mikrolitre gjærmedia ble lastet i feltene 4 og 12, og >>0.2 mikrogram enzym sammenliknet med standarden i gelen, er aktivitets-resultatene korrekte, og mere enn 200 mg/liter GO er utskilt og uttrykt i gjærssystemene.

IV.G.3 Termostabilitet av polypeptidet uttrykt fra pAB24AGSGO sammenliknet med naturlig GO fra *A.niger*.

Termostabilitene for de rensede rekombinante GO polypeptidene uttrykt i gjær fra pAB24AGSGO og for det naturlige GO rensed fra *A.niger* ble sammenliknet ved termiske
5 denaturerings-studier.

Det rekombinante polypeptidet uttrykt fra pAB24AGSGO som beskrevet i avsnitt IV.G.1., ble rensed ved en modifisering av Pazur og Kleppe's metode (1964). Gjærceller ble fjernet ved sentrifugering, og det kondisjonerte YEP medium ble fortynnet 10 ganger med 0.01M natriumacetat, pH 4.5. Dette stoffet ble tilført til en DEAE Sepharose Fast Flow
10 kolonne (20 ml) (Pharmacia) brakt til likevekt med den samme buffer. Kolonnen ble deretter vasket med 3 volum av likevektsbufferen, og enzymet ble eluert med 0.1M natriumacetat (pH 3.7). Fraksjoner som inneholdt GO-aktivitet ble "pooled" og konsentrert ved ultrafiltrering. Naturlig GO rensed fra *A.niger* ble skaffet fra Sigma Corp. (Type 5). Både rekombinant GO og naturlig GO ble inkubert ved en konsentrasjon på 0.1 mg/ml i
15 0.1M sitrat- fosfatbuffer, pH 5.5, ved bruk av hovedsaklig de samme betingelser som beskrevet i Malikkides og Weiland (1982). Enzymprøver ble inkubert ved 65°C, og underprøver ble tatt ut på ulike tidspunkter og fortynnet 10 ganger i fosfatbuffer, pH 5.5. Enzymaktivitet i de fortynnete prøvene ble deretter bestemt i det vesentlige ved bruk av Kelley og Reddy's metode (1986), med følgende modifikasjoner. Prøvene ble utført i et volum på 1.0
20 ml i 0.1M natriumfosfat-buffer, pH 7.0, inneholdende 0.2 mM o-dianisidin (Sigma Corp.), 10 mikrogram pepperrot peroksidase (Boehringer-Mannheim Corp.), og 9.5 mM D-glukose. Prøvene ble initiert ved tilsats av GO (1-30 ng), inkubert ved romtemperatur i 20 minutter, og deretter terminert ved tilsats av 0.1 ml 4N svovelsyre. Det resulterende o-dianisidin ble deretter målt ved 400 nm på et Shimazu Model UV-160 spektrofotometer
25 eller ved 405 nm på en ELISA reader (Titertek Multiscan). Enzymmengder ble beregnet som ng GO i forhold til en standardkurve av absorbans mot enzymmengde. Resultatene av termostabilitets-studiene er vist i figur 13, hvor prosent resterende enzymaktivitet er plottet mot inkubasjonstid ved den forhøyete temperatur (lukket kvadrat, GO uttrykt i gjær; lukket diamant, naturlig GO).

30 Verdiene i figur 13 viser at en pseudo første ordens hastighetskonstant lik 0.04 min⁻¹ ble oppnådd for nedgangen i de naturlige enzymets aktivitet, mens enzymet uttrykt i gjær hadde en hastighetskonstant lik 0.012 min⁻¹. På denne måten er enzymet uttrykt i gjær, som er hyperglykosylert, vesentlig mere termostabilt enn det naturlige enzymet fra *A.niger*.

IV.H. Beskatning av GO mRNA-nivå

A.niger produserer signifikante mengder GO. Studiene beskrevet ovenfor viser at vesentlig mere enn 1 mg/l blir uttrykt og utskilt ved relativt lave celletettheter. I tillegg har proteinet blitt påvist i ubehandlede lysater av A.niger ved "Western blotting", noe som

5 antyder at enzymet representerer >0.1% av det totale celleprotein. Således ville det forventes at relativt store mengder av mRNA for dette enzymet ville være tilstede i A.niger under log- og/eller den stasjonære fase under vekst. For å bestemme enten disse mRNA var påvisbare eller ikke ble cDNA fra klon 1, 2 og 4 (beskrevet i avsnitt IV.A.2 og avsnitt IV.A.3) brukt som "prober" for "Northern blots" av RNA isolert under log-fase vekst.

10 "Northern blotting" av RNA ble utført som følger, vesentlig som beskrevet av Maniatis et al. (1982). Poly A⁺ RNA (5 mikrogram) isolert fra A.niger, som var i log-fase vekst, ble denaturert med glyoksal og underlagt elektroforese på en 1% agarose gel. RNA ble overført til et nitrocellulose- filter, og ble "probet" med det "nick"-translaterte 1.1 kB EcoRI fragment av cDNA ved bruk av betingelsene beskrevet ovenfor for Southern blotting. Etter

15 hybridisering med proben ble filterene vasket ved 60°C i 1 x SSC. Etter autoradiografi i 1 uke ble det ikke påvist noen bånd. Kontrollforsøk indikerte at RNA var intakt, og at det var effektivt overført fra gelen til filteret.

Resultatene viser at mRNA som koder GO er svært sjelden i celler av A.niger i log-fase vekst. Dette resultatet er overraskende siden slike store mengder GO-protein blir syntetisert.

20 Det kan forklare vanskeligheten med å oppnå nukleotidsekvensene som koder GO fra et cDNA-bibliotek.

IV.I. Analoge av GO som er mutanter.

IV.I.1. Konstruksjon av vektorer som koder muteiner

25 Muterte sekvenser som koder GO, deri hver av de tre cystein-kodoner ved posisjonene 164, 206 og 521 ble substituert med seriner, ble laget ved bruk av plassorientert mutagenase hovedsaklig etter Eckstein's metode som beskrevet i Taylor et al. (1985).

Først ble det laget et derivat av pAB24AGSGO deri den uoversatte GO 3' sekvens var fjernet. For å oppnå dette ble 3'- halvdelen av GO-genet fra cDNA klon 4 (beskrevet i figur

30 4) sub-klonet til M13mp19 som et PstI-EcoRI fragment. To tilstøtende primere ble brukt for å introdusere totalt 7 mutasjoner ved 3'-enden av GO-genet. De tilstøtende primer-sekvensene var som følger (med mutasjonene understreket, restriksjons-enzymprosisjonene indikert over primersekvensen, og med aminosyrene kodet deri i parentes under primer-sekvensen):

XHOI**BglII**

5' CGGATGCTATCCTCGAGGATTATGCTTCCATGCAGTAAGATCT 3'
(D A I L E D Y A S M Q stop).

5 Det resulterende PstI-BglII fragment som omgir 3'-halvdelen av GO cDNA ble underlagt ligasjon med et BglII-PstI fragment fra pAB24AGSGO bestående av 5'-halvdelen av genet, og disse ble bundet til det samme plasmid som var blitt behandlet med BglII og fosfatasert. Det resulterende plasmid er pSGO3.

Mutasjonene der Ser-kodoner ble byttet ut for Cys-kodoner ble laget ved bruk av

10 følgende primere:

GOC164S: 5' ATTAACACCATGGCTCGAGGCATTGAAGTA 3'

GOC206S: 5' GGGGTCACCGGATCCGAAATCTTT 3'

15 **GOC521S: 5' CGGCATCATGGAAGTACCCACGCC 3'.**

5'-halvdelen av uttrykkskassetten fra plasmid pAB24AGSGO ble subklonet til M13mp19 som et AhaIII-PstI fragment. De første to primere (GOC164S og GOC206S) ble brukt med dette templatet; GOC521S-primere ble brukt på templatet som beskrevet ovenfor, som ble
 20 brukt for frembringelsen av pSGO3. Etter kloning ble primerene etterfølgende brukt som prøver for å isolere plater inneholdende de muterte sekvensene; hele innsettingen av positive plater ble sekvensiert for å verifisere at kun de ønskete mutasjoner ble oppnådd. De mutante genene ble deretter rekonstruert i ekspresjonsvektorer analoge med pSGO3, bortsett fra at disse vektorene inneholdt sekvensene av nukleotidet med definert mutasjon.
 25 Vektorene inneholdende mutasjoner ved Cys164, Cys206 og Cys521 er navngitt som pSGO3C1164S (også kalt C164S), pSGO3C206S (også kalt C206S), og pSGO3C521S (også kalt C521S) henholdsvis.

IV.I.2. Uttrykking av GO mutein-kodende ekspresjonsvektorer i gjær.

30 Uttrykking av GO-muteiner kodet i pSGO3C164S, pSGO3C206S og pSGO3C521S, samt det naturlige type gen i pSGO3, ble utført i transformanter av gjærgenerasjonen GRF180. Transformasjon og uttrykking ble i det vesentlige utført som beskrevet i avsnitt IV.D., bortsett fra at de ovennevnte vektorene ble brukt. Effekten på uttrykking og/eller

utskillelse og/eller aktivitet av mutasjonene som endrer de naturlige cysteinrestene ved posisjonene 164, 206 og 521 til seriner er vist i tabell 5.

Tabell 5.

| Utskilt GO-aktivitet av mutein-kodende vektorer | |
|--|-------------------------------------|
| Ekspresjonsvektor | Utskilt GO-aktivitet (mikrogram/ml) |
| pSGO3 | 300 |
| pSGO3C164S | <10 |
| pSGO3C206S | <10 |
| pSGO3C521S | 100 |

Som det går fram av resultatene var utskilt GO-aktivitet fra uttrykkingen av pSGO3C164S og pSGO3C206S ikke målbare. Nivåene av utskilt GO-aktivitet som resultat fra uttrykkingen av pSGO3C521S var noe redusert i forhold til det fra uttrykkingen av pSGO3. Fra disse resultatene kan det konkluderes at Cys164 og Cys206 er påkrevet for uttrykkingen/utskillelsen og/eller aktiviteten av GO.

IV.I.3. Termostabilitet av muteinet kodet i C521S

Termostabiliteten for polypeptidet uttrykt fra pSGO3C521S- transformert gjær ble sammenliknet med den for naturlig GO fra *A.niger*. Studiene av termostabilitet ble utført i det vesenlige som beskrevet i avsnitt IV.G.3. Resultatene, plottet som prosent gjenværende aktivitet etter inkubasjon ved den forhøyete temperatur mot tiden er vist i figur 14 (naturlig enzym, kvadrater; pSGO3C521S kodet polypeptid, diamanter). Basert på disse resultatene er et estimat at hastighetskonstanten for inaktivering mindre enn 0.01 min^{-1} . En sammenlikning mellom termostabilitetene for dette muteinet og naturlig GO fra *A.niger* så vel som de for polypeptidet kodet i pAB24AGSGO viser at pSGO3C521S-muteinet er det mest termostabile av disse tre enzymene.

IV.J. Isolering av genomisk DNA som koder GO fra *Penicillium*

Genomisk DNA som koder GO ble oppnådd fra *P.amagasakiense* som følger. *P.amagasakiense* (skaffet fra American Type Culture Collection) ble dyrket i YEP-medium, og DNA ble laget hovedsaklig som beskrevet i Bool et al. (1984). Det isolerte DNA ble oppbrutt med flere restriksjons-enzymmer, dvs. EcoRI, HindIII, BamHI, Sall, PstI og XhoI,

og ble anbrakt på nitrocellulose. Flekken ble testet med et "random prime" merket 1.9 kB BglII fragment av *A.niger* GO-genet tilstede i plasmidet pAB24AGSGO. Hybridisering ble utført med en blanding inneholdende prøven i 20% formamid og 10% dextransulfat ved 42°C over natta. Filteret ble deretter vasket ved 50°C med en løsning av 1 x SSC, 0.1% natrium dodecylsulfat (SDS) og autoradiografert over natta. Autoradiografiene viste et enkelt spesifikt bånd i hvert felt, noe som indikerer at et enkelt gen med homologi med *A.niger* GO-genet var tilstede i *P.amagasakiense* genomet. I særdeleshet ble det observert et BamHI-fragment og et HindIII-fragment på 2.4 kB og 1.9 kB, henholdsvis.

For å klonere BamHI-fragmentet ble 20 mikrogram *Penicillium* DNA oppbrutt med restriksjonsenzymet, og fragmenter som ble underlagt elektroforese til størrelsesområdet mellom 2.3 og 2.6 kB ble isolert fra gelen. DNA i dette preparatet ble bundet til pBR322, som var behandlet med BamHI og fosfatasert. Transformasjonen av "aliquot" av det bundete plasmid DNA til *E.coli* HB101 ga omtrent 10^4 ampicillin resistente kolonier, der 85% av disse ble forutsagt å være rekombinante på grunn av deres test phenotype. De potensielle rekombinante koloniene ble overført i duplikat til nitrocellulose-filtere og hybridisert med den ovennevnte GO-probe fra pAB24ASGO. Hybridisering skjedde ved 37°C med 10% formamid og 10% dekstransulfat. Filterene ble vasket ved 50°C i en løsning av 1 x SSC, 0.1% SDS, og autoradiografert i 3 dager. Seks potensielle positive kloner ble identifisert og tatt ut, og deres plasmid DNA ble laget. Fem av disse klonene inneholdt BamHI innføringer på 2.3-2.6 kB, og etterfølgende "Southern blot" analyse viste at tre av dem var identiske. Et representativt plasmid fikk navnet pBRpGOXA11, hvis restriksjonsenzym-kart er vist i figur 15.

Sekvensiering av BamHI-innføringen i pBRpGOXA11 ble utført som følger. Isolert plasmid DNA ble oppbrutt med BamHI, og fragmenter på omtrentlig 2.5 kB ble isolert og ytterligere oppbrutt med HindIII. Blandingen av fragmenter ble deretter bundet til M13, og DNA fra potensielle rekombinante "plaques" ble underlagt sekvensanalyse. Den resulterende sekvens fra en slik klon, pBRA11, er vist i figur 16, hvor en kan se at en åpen leseblokk (open reading frame/ORF) er tilstede gjennom hele 445 bp fragmentet.

En sammenlikning mellom aminosyrene kodet i 445 bp fragmentet avledet fra *P.amagasakiense* genomet innført i pBRpGOXA11 og aminosyresekvensen fra *A.niger* GO kodet i nukleotidsekvensen vist i figur 5b er vist i figur 17. I figuren viser de oppstilte sekvensene at den antatte *Penicillium* GO klon starter ved aminosyre 64 i *A.niger*-sekvensen. I tillegg ser det ut til at proteinene er omtrent 52% identiske på aminosyrenivå.

Deponerte biologiske materialer

Et polynukleotid inneholdende GO-cDNA av klon 2 ble deponert hos American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, USA, og vil bli oppbevart etter retningslinjene i Budapest-traktaten. Ved offentliggjøring og innstilling av
 5 denne søknaden til godkjenning som US patent vil alle restriksjoner på tilgjengeligheten av denne deponeringen bli fjernet; og adgang til denne deponeringen vil bli åpnet men saken går videre for en som blir gitt fullmakt av embedsmannen i henhold til 37 CFR 1.14 og 35 USC 1.22. Det deponerte materialet blir lagret i tredve (30) år fra deponeringsdato, eller i fem (5) år etter siste forespørsel etter deponeringen; eller patentets levetid. Adgangs-
 10 nummeret og deponeringsdato er gjengitt nedenfor.

| | <u>Deponert materiale</u> | <u>ATCC-nummer</u> | <u>Deponeringsdato</u> |
|----|---------------------------|--------------------|------------------------|
| | pBR-lambda-2a | 67731 | 16 juni 1988 |
| | pSGO3C521S | 40619 | 16 juni 1989 |
| 15 | pBRpGOXA11 | 68012 | 16 juni 1989 |

Deponeringen er gjort for å lette innsikten for fagkyndige. Det er verken en innrømmelse at slike deponier er påkrevet for å praktisere oppfinnelsen eller at ekvivalente anvendelser ikke er innenfor fagområdet i lys av den foreliggende oppfinnelsen. Den almene tilgjengelighet
 20 til dette deponiet gir ingen adgang til å bruke eller selge det deponerte materialet i dette eller ethvert annet patent. Nukleinsyresekvensen i det deponerte materialet er innarbeidet i teksten med henvisninger, og har en kontrollerende effekt hvis det oppstår konflikt med andre sekvenser som er beskrevet herunder.

Selv om den forutgående oppfinnelsen er beskrevet i en viss grad for illustrasjon, er det
 25 åpenbart at endringer og modifikasjoner kan utføres av fagkyndige innenfor kravenes ramme.

Industriell anvendelse

Anvendelsen av rekombinante polynukleotider som koder GO muliggjør metoder som er
 30 basert på uttrykkningen av polypeptidet i rekombinante systemer. Disse metodene og rekombinante systemene er spesielt anvendbare siden de tillater produksjon av det ønskete produktet i storskala. De muliggjør også produksjon av polypeptider i systemer hvorfra de lettere og billigere kan renses siden ekspresjonsvektorene kan konstrueres slik at de forårsaker at produktet skilles ut til mediet. Dette ville øke tilgjengeligheten og/eller

senkningen av kostnadene for GO for dets mange kommersielle anvendelser slik som for påvisning og estimering av glukose i industrielle løsninger, og i kroppsvæsker slik som blod og urin.

I tillegg tillater metoder som anvender rekombinante systemer som koder GO produksjon av GO i systemer som er forenelige med den tiltenkte bruk av det uttrykte produktet. GO er f.eks. brukt til avsukring av egg, til fjerning av oksygen fra drikker, fuktige matvarer, aromastoffer, og hermetisert mat. Produksjon av GO-polypeptidet i gjær som er godkjent til bruk i matvarer vil være fordelaktig, siden behovet for grundig rensing vil være mindre enn hvis polypeptidet blir produsert i dets naturlige kilde *A.niger*, som ikke er godkjent i matvarer og som er svært allergifremkallende.

Dessuten tillater disse metodene og rekombinante systemene produksjonen av analoge av GO, og fragmenter av GO, som kunne finne kommersiell anvendelse i påvisningsprosedyrer. For eksempel kunne GO fusjons-proteiner tjene på plass i et merket antistoff eller parvis sammenstilt i en lagdelt type prøve. Molekylet kunne fusjoneres med et epitop gjenkjent av et antistoff som skal påvises. Nærværet av antistoff-entitop komplekset ville være bestemt ved påvisning av den enzymatiske aktivitet av tilstedeværende GO. Når koplet til en pepperrot peroksidase-prøve ville dette tillate en kolorimetrisk prosedyre for å påvise nærværet av antistoffet.

Inaktive polypeptider som er fragmenter av GO eller av analoge av GO kan brukes for å fremskaffe antistoffer for GO, både polyklonale og monoklonale. Disse antistoffene er nyttige for rensingen av GO og polypeptider som er hovedsaklig identiske med GO ved immunoaffinitets-prosedyrer.

Patentkrav

1. Rekombinant vektor,
karakterisert ved at den omfatter en polynukleotid-sekvens som koder for et polypeptid med glukoseoksidase-aktivitet (GO-aktivitet), hvorved polynukleotidet koder for et
5 polypeptid i henhold til fig. 5b og/eller mutanter av dette som inneholder serin i stedet for cystein ved aminosyrerest 521 i sekvensen i fig. 5b.

2. Rekombinant vektor ifølge krav 1,
karakterisert ved at den er en ekspresjonsvektor omfattende en kontrollsekvens for
10 ekspresjon som er operativt forbundet med sekvensen som koder for polypeptidet som oppviser GO-aktivitet.

3. Rekombinant vektor ifølge krav 2,
karakterisert ved at sekvensene som tillater ekspresjon av kodeseqvensen tillater
15 ekspresjon i gjær.

4. Rekombinant vektor ifølge krav 3 eller 4,
karakterisert ved at den omfatter en sekvens som forårsaker utskilling av polypeptidet til mediet.
20

5. Rekombinant vektor ifølge krav 4,
karakterisert ved at kontrollsekvensene omfatter en regulerbar hybridpromotor, promotoren glyceraldehyd-3-fosfat-dehydrogenase-aklohol-dehydrogenase (GAP/ADH), terminatoren glyceraldehyd-3-fosfat (GAP), og en kontrollsekvens som forårsaker utskilling
25 valgt blant gruppen bestående av en sekvens som koder for alfa-faktor fra gjær og en sekvens som koder for prepro-sekvensen av GO fra *Aspergillus Niger*.

6. Rekombinant vektor ifølge krav 5,
karakterisert ved at den består av pAB24AGS_{GO}GO, pAB24AG_{alfa}GO, pAB24AGSGO,
30 pAG24@GO eller pSGO3C521S.

7. Vertscelle transformert med et rekombinant polynukleotid,
karakterisert ved at polynukleotidet omfatter en sekvens som koder for et polypeptid med glukoseoksidase-aktivitet (GO-aktivitet), hvorved polynukleotidet koder for et polypeptid i henhold til fig. 5b og/eller mutanter av dette som inneholder serin i stedet for cystein ved
5 aminosyrerest 521 i sekvensen i fig. 5b.
8. Vertscelle ifølge krav 7,
karakterisert ved at den er en gjærscelle.
- 10 9. Vertscelle ifølge krav 8.
karakterisert ved at gjæren er av slekten *Saccharomyces* som er transformert med en vektor ifølge krav 3-6.
10. Ikke-naturlig polypeptid med GO-aktivitet,
15 **karakterisert** ved at polypeptidet er polypeptidet i fig. 5b og/eller mutanter derav som inneholder serin i stedet for cystein ved aminosyrerest 521 i sekvensen vist i fig. 5b, og er hyperglykosylert i forhold til naturlig GO.
11. Framgangsmåte for framstilling av et rekombinant polypeptid med GO-aktivitet ved
20 ekspresjon av et polynukleotid,
karakterisert ved at det anvendes et polynukleotid som koder for et polypeptid valgt fra gruppen bestående av polypeptidet vist i fig. 5b og mutanter derav som inneholder serin i stedet for cystein ved aminosyrerest 521 i sekvensen i fig. 5b, og
- a) transformere celler med en rekombinant vektor med omfattende en kodesekvens for
25 polypeptidet operativt bundet til sekvenser som tillater ekspresjon av nevnte kodesekvens i cellene,
- b) dyrke de transformerte celler under betingelser som tillater ekspresjon av muteinet, og
- c) isolere polypeptidet.

Proteinsekvenser bestemt fra *A. niger* glykoseoksidase

Sequence 1 - N-terminal

Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr

Sequence 2 - tryptic fragment

(Arg) Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ala

Sequence 3 - tryptic fragment

(Arg) Leu Thr Glu Asn Pro Asn Ile Ser Val Leu Val Ile Glu Ser Gly Ser Tyr
Glu Ser Asp

Sequence 4 - tryptic fragment

(Arg) Ile Ser Asp Ala Ser Leu (Glu,Ala) Asp (Tyr,Leu) Ala Ser Met

Sequence 5 - tryptic fragment

(Arg) Gly Gly Phe His (Asn) Thr Thr Ala Leu Leu Ile Gln Tyr Glu Asn Tyr

Sequence 6 - CnBr fragment

Met? Pro Lys Glu Met?

Sequence 7 CnBr fragment

FIG. 1-1

2/34

Met Ser Ala Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys Asp Phe Gly Gln Gly Asp
 Trp
 Pro His Gly Val Ser Met
 Trp

Sequence 8 CnBr fragment

Met? Phe Pro Asn Thr Leu (Leu?) Glu Asp Gln Val (Arg?)

Sequence 9 CnBr fragment

Met? Thr Val Phe Tyr Ala Met?

FIG. 1-2

SEQUENCE 2 1 6 4 4 2 2 6 4 4 4 4 2 2 2 2 4 2 4 2 4 2 4 2 4 4 6
 M S A V E D R G V P T K K D F G Q G D P H G V S

probes 13-16---

-----probe long6-----

-----long7-----

-----long8-----

PROBE 13 128fold degen. 23mer TCNCCTTGNCCAAAATC^CTTTCTT^{G G}

PROBE 14 128fold degen. 23mer TCNCCTTGNCCAAAATC^CTTTCTT^{G G}

PROBE 15 128fold degen. 23mer TCNCCTTGNCCAAAATC^CTTT^{G G}

PROBE 16 128fold degen. 23mer TCNCCTTGNCCAAAATC^CTTT^{G G}

PROBE LONG6 unique 72mer

GC^TCACACCCGTGGGGATCACCC^TTGGCCGAAATC^TCTTGGTGGGCACGCCGGGATCCTCCACAGCGGCTCAT

PROBE LONG7 unique 42mer

GC^TCACACCCGTGGGGATCACCC^TTGGCCGAAATC^TTTCTTGGT

PROBE LONG8 unique 42mer

AT^TCTTCTTGGTGGGCACGCCGGGATCCTCCACAGCGGCTCAT

FIG. 2-2

SAMMENLIKNING AV SEKVENSENE I PROBENE LENGDE 6, 7 OG 8

Long6 GCTCACACCGTGGGGATCACCCCTGGCCGAAATCTTCTTGGT

Long7 GCTCACACCGTGGGGATCACCCCTGGCCGAAATCCTTCTTGGTGGGCACGCCCGGATCCTCCACAGCGCTCAT

*** *****

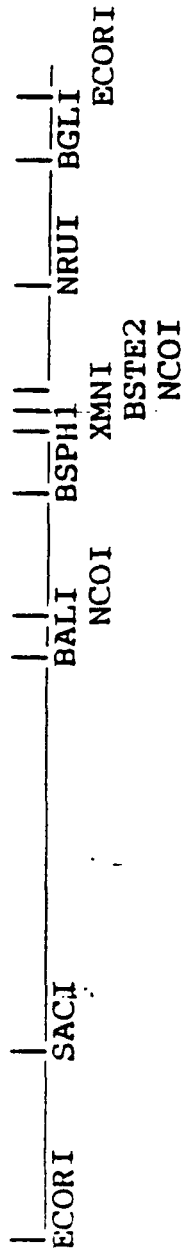
5/34

Long8 ATCTTCTTGGTGGGCACGCCCGGATCCTCCACAGCGCTCAT

FIG. 3

6/34

Sekvens av 700 bp EcoRI fragment fra cDNA klon 4



2 AsnSerGlyValIleGluSerGlySerTyrGluSerAspArgGlyProIleIleGluAsp
 AATTCGGCGTCATCGAAAGTGGTCCCTACGAGTCGGACAGAGGTCCTATCATTGAGGAC
 TTAAGCCCCGCAGTAGCTTTCACCCGAGGATGCTCAGCCTGTCTCCAGGATAGTAACCTCCTG

1 ECORI,

62 LeuAsnThrTyrGlyAspIlePheGlySerSerValAspHisAlaTyrGluThrValGlu
 CTGACACCTACGGCGACATCTTTGGCAGCAGTGTAGACCACCGCCACGAGACCCGTGGAG
 GACTGTGGATGCCGCTGTAGAAAACCCGTCGTCACATCTGGTGGGATGCTCTGGCACCTC

119 SACI,

122 LeuAlaThrAsnAsnGlnThrAlaLeuIleArgSerGlyAsnGlyLeuGlyGlySerThr
 CTCGCTACCAACAATCAAAACCGCGTGTATCCGCTCCGGAATGGTCTCGGTGGCTCTACT
 GAGCGATGGTTGTTAGTTGGCGGACTAGCGGAGGCCTTTACCAGAGACCCAGATGA

182 LeuValAsnGlyGlyThrTrpThrArgProHisLysAlaGlnValAspSerTrpGluThr
 CTAGTGAATGGTGGCACCTGGACTCGCCCCACAGGCACAGGTTGACTCTTGGGAGACT
 GATCAC TTACCACCCGTGGACCTGAGCGGGGTTCCTCCGTCCAAC TGAGAACCCTCTGA

242 ValPheGlyAsnGluGlyTrpAsnTrpAspAsnValAlaAlaTyrSerLeuGlnAlaGlu
 GTCTTTGGAAATGAGGCGTGGAACTGGACAAATGTGGCCCGCTACTCCCTCCAGGCTGAG
 CAGAAACCTTTACTCCCGACCTTGACCCCTGTACACCCGGGATGAGGGAGGTCCGACTC

FIG. 4B-1

302 ArgAlaArgAlaProAsnAlaLysGlnIleAlaAlaGlyHisTyrPheAsnAlaSerCys
 CGTGCTCGCCACCAATGCCAAACAGATCGCTGCTGGCCACTACTCAACGCATCCTGC
 GCACGAGCGCGTGGTTACGGTTTGTCTAGCGACGACCCTGATGAAGTTGCGTAGGACG
 337 BALI, 361, NCOI,
 362 HisGlyValAsnGlyThrValHisAlaGlyProArgAspThrGlyAspAspTyrSerPro
 CATGGTGTAAATGGTACTGTCCATGCCGACCCCGACACCCGGCGATGACTATTCTCCC
 GTACCACAAATTACCATGACAGGTACGGCTGGGGCGCTGTGGCCGCTACTGATAAGAGGG
 IleValLysAlaLeuMetSerAlaValGluAspArgGlyValProThrLysLysAspPhe

 422 ATCGTCAAGGCTCTCATGAGCGCTGTCGAAGACCGGGCGTCCACCAAGAAAGACTTC
 TAGCAGTTCGGAGAGTACTCGGACAGCTTCTGGCCCCCAAGGGTGGTCTTCTGAAG
 435 BSPH1, 472 XMNI,
 GlyCysGlyAspProHisGlyValSerMetPheProAsnThrLeuHisGluAspGlnVal
 ---Gln-----Leu-----
 482 GGATGCGGTGACCCCATGGTGTCCATGTCCCAACACACCTTGCACGAAGACCAAGTG
 CCTACGCCACTGGGGTACCACACAGGTACAAGGGTGTGGAACGTGCTTGTGGTTCAC
 488 BSTE2, 496 NCOI,
 ArgSerAspAlaAlaArgGluTrpLeuLeuProAsnTyrGlnArgProAsnLeuGlnVal

 542 CGCTCCGATGCCGCTCGCGAATGGCTACTTCCCAACTACCAACGTCCCAACCTGCAAGTC
 GCGAGGCTACGGCGGCGCTTACCAGTGAAGGGTTGATGGTTGCAGGGTTGGACGTTTCAG

FIG. 4B-2

8/34

556 NRUI,

LeuThrGlyGlnTyrValGlyLysValLeuLeuSerGlnAsnGlyThrThrProArgAla
CTGACCGGACAGTATGTTGGTAAGGTGCTCCTTAGCCAGAACGGCACCCCTCGTGCC
GACTGGCCGTGTCATACAAACCATTCACGAGGAATCGGTCCTTGCCGTGGTGGGAGCACGG

602

636 BGLI,

ValGlyValGluPhe
GTTGGCGTGGAATTC
CAACCGCACCTTAAG

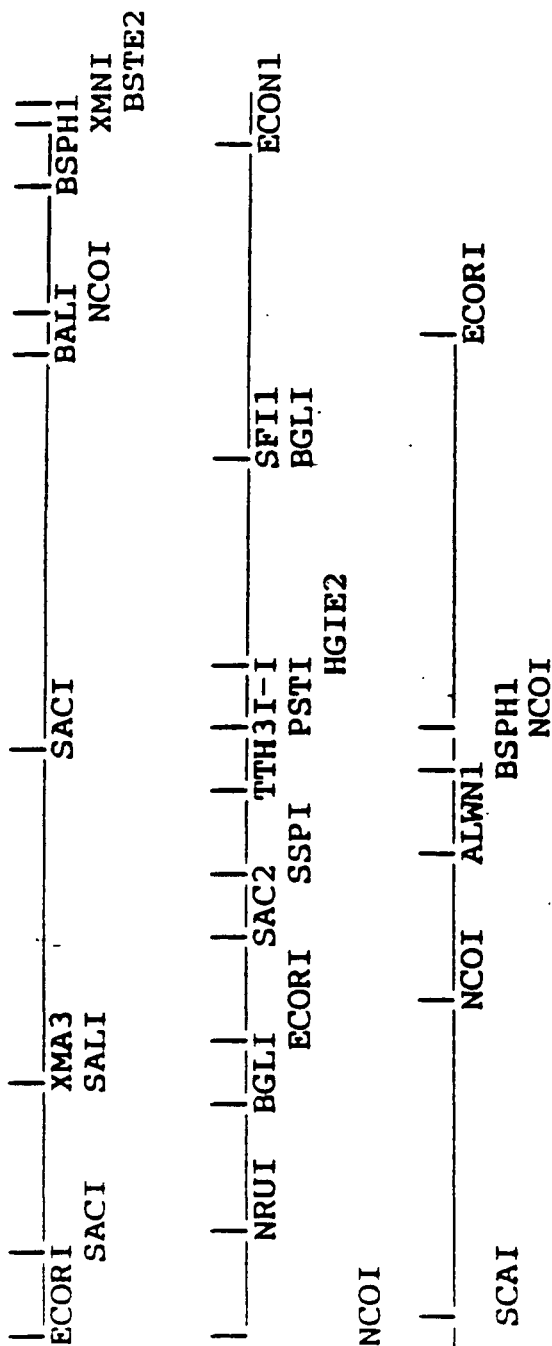
662

671 ECORI,

FIG. 4B-3

9/34

Nukleotidsekvens i sammensatt cDNA for glykoseoksidase



2 AA TTCGGGCTCATTCCTCATCTGCCCATCATGCAGACTCTCTCTGTGAGCTCGCTTGTG
 TTAAGCCCCGAGTAAGGGAGTAGACGGGTAGTACCTGTGAGAGGAACAÇTCCGAGCGGAACAC

1 ECORI, 49 SACL,

MetGlnThrLeuLeuValSerSerLeuVal

ValSerLeuAlaAlaAlaLeuProHisTyrIleArgSerAsnGlyIleGluAlaSerLeu
 62 GTCCTCCCTCGCTGCGGCCCTGCCACACTACATCAGGAGCAATGGCAATTGAAGCCAGCCTC
 CAGAGGGAGCGGACCCGGGACGGTGTGATGTAGTCTCGTTACCCGTAACCTCCGGTCCGGAG

FIG. 5B-1

542 ProAsnAlaLysGlnIleAlaAlaGlyHisTyrPheAsnAlaSerCysHisGlyValAsn
 CCAATGCCAAACAGATCGCTGGCCACTACTTCAACGCATCCTGCCATGGTGTAAAT
 GGTTACGGTTTGTCTAGCGACGACCCTGGTGTGAAGTTGCGTAGGACGGTACCACAATTA
 565 BALI, 589 NCOI,

602 GlyThrValHisAlaGlyProArgAspThrGlyAspAspTyrSerProIleValLysAla
 GGTACTGTCCATGCCGACCCCGGACACCCGGGATGACTATTCTCCATCGTCAAGGCT
 CCATGACAGGTACGGCTGGGGCTGTGGCCGCTACTGATAAGAGGGTAGCAGTTCCGA
 662 LeuMetSerAlaValGluAspArgGlyValProThrLysLysAspPheGlyCysGlyAsp
 CTCATGAGCGCTGTCGAAGACCCGGGCGTTCCCACCAAGAAAGACTTCGGATGCCGTGAC
 GAGTACTCGCGACAGCTTCTGGCCCCCGCAAGGGTGTCTTTCTGAAGCCCTACGCCACTG
 663 BSPHI, 700 XMNI, 716 BSTE2,

722 ProHisGlyValSerMetPheProAsnThrLeuHisGluaspGlnValArgSerAspAla
 CCCCATGGTGTCCATGTTCCCAACACCTTGCACGAAGACCAAGTCCGCTCCGATGCC
 GGGTACCACACAGGTACAAGGGTGTGGAAACGTCTTCTGGTTCACCGGAGGCTACGG
 724 NCOI,

782 AlaArgGluTrpLeuLeuProAsnTyrGlnArgProAsnLeuGlnValLeuThrGlyGln
 GCTCGCGAATGGCTACTTCCCAACTACCAACGTCCTCCAACTGCAAGTCTGACCGGACAG
 CGAGCGCTTACCAGATGAAGGGTTGATGGTTGCAGGGTTGGACGTTTCAGGACTGGCCCTGTC
 784 NRUI,

842 TyrValGlyLysValLeuLeuSerGlnAsnGlyThrThrProArgAlaValGlyValGlu
 TATGTTGGTAAGGTGCTCCTTAGCCAGAACGGCACCCCTCGTGCCTGGCGTGGAA
 ATACAACCATTCCACGAGGAATCGGTCTTGGCCGTGGGGAGCACGGCAACCGCACCTT
 864 BGLI, 899 ECORI,

FIG. 5B-3

PheGlyThrHisLysGlyAsnThrHisAsnValTyrAlaLysHisGluValLeuLeuAla
 TTCGGCACCCACAAGGCAACACCCACAACGTTTACGCTAAGCACGAGGTCCTCCTGGCC
 AAGCCGTGGGTGTTCCCGTGTGGGTGTGCAAAATGCCGATTCGTGCTCCAGGAGGACCCGG
 902
 960 SAC2,
 AlaGlySerAlaValSerProThrIleLeuGluTyrSerGlyIleGlyMetLysSerIle
 GCGGGCTCCGCTGTCTCTCCACAATCCTCGAAATATTCGGTATCGGAATGAAGTCCCATC
 CGCCCGAGGCGACAGAGAGGGTGTTAGGAGCTTATAAGGCCATAGCCTTACTTCAGGTAG
 962
 993 SSPI,
 LeuGluProLeuGlyIleAspThrValValAspLeuProValGlyLeuAsnLeuGlnAsp
 CTGGAGCCCTTGGTATCGACACCGTCGTTGACCTGCCCGTCGGCTTGAACCTGCAGGAC
 GACCTCGGGGAACCATAGCTGTGGCAGCAACTGGACGGCAGCCGAACTTGGACGTCCTG
 1022
 1040 TTH31, 1073 PSTI,
 GlnThrThrAlaThrValArgSerArgIleThrSerAlaGlyAlaGlyGlnGlyGlnAla
 CAGACCACCGCTACCGTCCGCTCCCGCATCACCTCTGCTGGTGCAGGACAGGGACAGGCC
 GTCTGGTGGCGATGGCAGGCGGCGTAGTGGAGACCGACCCACGTCCTGTCCTGTCCTGG
 1082
 1112 HGIE2,
 AlaTrpPheAlaThrPheAsnGluThrPheGlyAspTyrSerGluLysAlaHisGluLeu
 GCTTGGTTCGCCACCTTCAACGAGACCTTGGTGACTATTCCGAAAAGGCACACGAGCTG
 CGAACCAAGCGGTGGAAGTTGCTCTGGAAACCACTGTATAAGGCTTTTCCGTGTGCTCCGAC
 1142
 LeuAsnThrLysLeuGluGlnTrpAlaGluAlaValAlaArgGlyGlyPheHisAsn
 CTCAACACCAAGCTGGAGCAGTGGCCGAGAGGCCGTCGCCCGTGGCGGATTCACCAAC
 GAGTTGTGTTCCGACCTCGTCACCCGGCTTCTCCGGCAGCGGGCACCCCTAAGGTGTTG
 1202

FIG. 5B-4

1225 SF11, 1226 BGLI,

1262 Thr¹Ala²Leu³Leu⁴Ile⁵Gln⁶Tyr⁷Glu⁸Asn⁹Tyr¹⁰Arg¹¹Asp¹²Trp¹³Ile¹⁴Val¹⁵Asn¹⁶His¹⁷Asn¹⁸Val¹⁹
 ACCACCGCCTTGCTCATCCAGTACGAGAACTACCGGACTGGATGTCAACCCACAACGTC
 TGGTGGCGGAACGAGTAGGTCACTCTGTATGGCGCTGACCTAACAGTTGGTGTGCAG

1322 Ala¹Tyr²Ser³Glu⁴Leu⁵Phe⁶Leu⁷Asp⁸Thr⁹Ala¹⁰Gly¹¹Val¹²Ala¹³Ser¹⁴Phe¹⁵Asp¹⁶Val¹⁷Trp¹⁸Asp¹⁹Leu²⁰
 GCGTACTCGGAACCTTCTCCGACACTGCCGGAGTAGCCAGCTTCGATGTGTGGGACCTT
 CGCATGAGCCCTTGAGAAAGGAGCTGTGACGGCCTCATCGGTCGAAGCTACACACCCCTGGAA

1382 Leu¹Pro²Phe³Thr⁴Arg⁵Gly⁶Tyr⁷Val⁸His⁹Ile¹⁰Leu¹¹Asp¹²Lys¹³Asp¹⁴Pro¹⁵Tyr¹⁶Leu¹⁷His¹⁸His¹⁹Phe²⁰
 CTGCCCTTACCCGAGGATACGTTACATCTCGACAAAGGACCCCTACCTTCACCCACTTC
 GACGGGAAGTGGGCTCCTATGCAAGTGTAGGAGCTGTTCTCTGGGATGGGAAGTGGTGAAG

1411 ECON1,

1442 Ala¹Tyr²Asp³Pro⁴Gln⁵Tyr⁶Phe⁷Leu⁸Asn⁹Glu¹⁰Leu¹¹Asp¹²Leu¹³Leu¹⁴Gly¹⁵Gln¹⁶Ala¹⁷Ala¹⁸Ala¹⁹Thr²⁰
 GCCTACGACCCCTCAGTACTTCCCAACGAGCTGGACCTGCTCGGTCAAGGTCCGCTACT
 CCGATGCTGGGAGTCATGAAGGAGTTGCTCGACCTGGACGAGCCAGTCCGACGGCGGATGA

1455 SCA1,

1502 Gln¹Leu²Ala³Arg⁴Asn⁵Ile⁶Ser⁷Asn⁸Ser⁹Gly¹⁰Ala¹¹Met¹²Gln¹³Thr¹⁴Tyr¹⁵Phe¹⁶Ala¹⁷Gly¹⁸Glu¹⁹Thr²⁰
 CAAC'TGGCCCGCAACATCTCCAACTCCGGTGCCATGCAGACCTACTTCGCTGGGAGACT
 C'TTGACCCGGCGTGTAGAGGTTGAGGCCACCGGTACGTTGGATGAAGCGACCCCTCTGA

1562 Ile¹Pro²Gly³Asp⁴Asn⁵Leu⁶Ala⁷Tyr⁸Asp⁹Ala¹⁰Asp¹¹Leu¹²Ser¹³Ala¹⁴Trp¹⁵Thr¹⁶Glu¹⁷Tyr¹⁸Ile¹⁹Pro²⁰
 ATCCCCGGTGATAACCTCGCGTATGATGCCGATTTGAGCGCCCTGGACTGAGTACATCCCCG
 TAGGGGCCACTATTGGAGCGGCATACTACGGCTAAACTCGCGGACCTGACTCATGTAGGGC

1622 Tyr¹His²Phe³Arg⁴Pro⁵Asn⁶Tyr⁷His⁸Gly⁹Val¹⁰Gly¹¹Thr¹²Cys¹³Ser¹⁴Met¹⁵Met¹⁶Pro¹⁷Lys¹⁸Glu¹⁹Met²⁰
 TACCACCTCCGTCCTAACCTACCATGGCGTGGTACTTGCCTCCATGATGCCGAAGGAGATG
 ATGCTGAAGGCAGGATTGATGGTACCGCACCCCATGAACGAGGTACTACGGCTTCCCTCTAC

FIG. 5B-5

1642 NCOI,

1682 GlyGlyValValAspAsnAlaAlaArgValTyrGlyValGlnGlyLeuArgValIleAsp
GGCGGTGTGTTGATAATGCTGCCCGTGTATGGTGTGCAGGGACTGCCGTGCATTGAT
CCGCCACAACAACATAATTACGACGGGCACACATACCACACCGTCCCTGACGCACAGTAACTA

1721 ALWN1,

1742 GlySerIleProProThrGlnMetSerSerHisValMetThrValPheTyrAlaMetAla
GGTTCATATCCCTCCACGCAATGTCGTCCCATGTCAATGACGGGTTCATATGCCATGGCG
CCAAGATAAGGAGGATGCCGTTTACAGCAGGGGTACAGTACTGCCACAAGATACGGTACCCG

1776 BSPH1, 1794 NCOI,

1802 LeuIysIleSerAspAlaIleLeuGluAspTyrAlaSerMetGlnOP
CTAAAAAATTTCCGATGCTATCTTGGAAAGATTATGCTTCCATGCAGTGAGTGTATGATGG
GATTTTAAAGCCTACGATAGAACTTCTAAATACGAAGGTACGTCACCTCACCCATACTACC

1862 GGATATGAGTGAGGATAATTAGGGGATGGTACTTAGATGCTGGGGAGGTAATAATCATAGAT
CCTATACTCACTCCCTAATAATCCCTACCATGAATCTACGACCCCTCCATATTAGTATCTA

1922 TGGATAGAAATTGGTAGGTACATAGACAGGTTACATGATGATAGACGTTCCGTTATATGTCGAG
ACCTATCTTAAACCAATCCAATGTATCTGTCCAATGTACTTATCTGCAAGCAATATACACTC

1982 CAGACAATTACTACCAAAAAAATAAAAAAACCCTGAAATTC
GTCATGTAATGATGGTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGGCTTAAG

2020 ECORI,

FIG. 5B-6

15/34

Aminosyresekvens i glykoseoksidase avledet fra cDNA

```

-22          -20
Met Gln Thr Leu Leu Val Ser
GAAATTCGGGGCTCAATCCCTCATCTGCCCCATC ATG CAG ACT CTC CTT GTG AGC

-10
Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Leu Pro His Tyr Ile Arg
TCG CTT GTG GTC TCC CTC GCT GCG GCC CTG CCA CAC TAC ATC AGG

1
Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr Asp Pro Lys Asp Val
-----
AGC AAT GGC ATT GAA GCC AGC CTC CTG ACT GAT CCC AAG GAT GTC

20          30
Ser Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly Gly Gly Leu Thr
-----
TCC GGC CGC ACG GTC GAC TAC ATC ATC GCT GGT GGA GGT CTG ACT

40
Gly Leu Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro Asn Ile Ser
-----
GGA CTC ACC ACC GCT GCT GCT GAG AAC CCC AAC ATC AGT

50          60
Val Leu Val Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg Gly Pro
-----
GTC CTC GTC ATC GAA AGT GGC TCC TAC GAG TCG GAC AGA GGT CCT

70
Ile Ile Glu Asp Leu Asn Thr Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser Ser
ATC ATT GAG GAC CTG AAC ACC TAC GGC GAC ATC TTT GGC AGC AGT

```

FIG. 6-1

| | |
|---|-----|
| Val Asp His Ala Tyr Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln | 90 |
| GTA GAC CAC GCC TAC GAG ACC GTG GAG CTC GCT ACC AAC AAT CAA | |
| Thr Ala Leu Ile Arg Ser Gly Asn Gly Leu Gly Ser Thr Leu | |
| ACC GCG CTG ATC CGC TCC TCC GGA AAT GGT CTC CTC GGT GGC TCT ACT CTA | 100 |
| Val Asn Gly Gly Thr Trp Thr Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp | 120 |
| GTG AAT GGT GGC ACC TGG ACT CGC CCC CAC AAG GCA CAG GTT GAC | |
| Ser Trp Glu Thr Val Phe Gly Asn Glu Gly Trp Asn Trp Asp Asn | |
| TCT TGG GAG ACT GTC TTT GGA AAT GAG GGC TGG AAC TGG GAC AAT | 130 |
| Val Ala Ala Tyr Ser Leu Gln Ala Glu Arg Ala Arg Ala Pro Asn | 150 |
| GTG GCC GCC TAC TCC CTC CAG GCT GAG CGT GCT CGC GCA CCA AAT | |
| Ala Lys Gln Ile Ala Ala Gly His Tyr Phe Asn Ala Ser Cys His | |
| GCC AAA CAG ATC GCT GCT GGC CAC PAC TTC AAC GCA TCC TGC CAT | 160 |
| Gly Val Asn Gly Thr Val His Ala Gly Pro Arg Asp Thr Gly Asp | 180 |
| GGT GTT AAT GGT ACT GTC CAT GCC GGA CCC CGC GAC ACC GGC GAT | |
| Asp Tyr Ser Pro Ile Val Lys Ala Leu Met Ser Ala Val Glu Asp | 190 |

FIG. 6-2

17/34

GAC TAT TCT CCC ATC GTC AAG GCT CTC ATG AGC GCT GTC GAA GAC
 200
 Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys Asp Phe Gly Cys Gly Asp Pro His 210
 -----Gln-----
 CCG GGC GTT CCC ACC AAG AAA GAC TTC GGA TGC GGT GAC CCC CAT
 220
 Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr Leu His Glu Asp Gln Val Arg
 -----Leu-----
 GGT GTG TCC ATG TTC CCC AAC ACC TTG CAC GAA GAC CAA GTG CGC
 230
 Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu Pro Asn Tyr Gln Arg Pro
 TCC GAT GCC GCT CGC GAA TGG CTA CTT CCC AAC TAC CAA CGT CCC
 240
 Asn Leu Gln Val Leu Thr Gly Gln Tyr Val Gly Lys Val Leu Leu
 250
 AAC CTG CAA GTC CTG ACC GGA CAG TAT GTT GGT AAG GTG CTC CTT
 260
 Ser Gln Asn Gly Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly Val Glu Phe Gly
 AGC CAG AAC GGC ACC ACC CCT CGT GCC GTT GGC GTG GAA TTC GGC 270
 280
 Thr His Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys His Glu Val
 ACC CAC AAG GGC AAC ACC CAC AAC GTT TAC GCT AAG CAC GAG GTC
 290
 Leu Leu Ala Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu Glu Tyr
 CTC CTG GCC GCG GGC TCC GCT GTC TCT CCC ACA ATC CTC GAA TAT 300

FIG. 6-3

Ser Gly Ile Ile Gly Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile Asp
 TCC GGT ATC GGA ATG AAG TCC ATC ATC CTG GAG CCC CTT GGT ATC GAC
 310
 Thr Val Val Asp GAC CTG CCC GTC GGC TTT AAC CTG CAG GAC CAG ACC
 320
 Thr Ala Thr Val Arg Ser Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln
 ACC GCT ACC GTC CGC CGC TCC CGC ATC ACC TCT GCT GCA GGA CAG
 340
 Gly Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp
 GGA CAG GCC GCT TGG TTC GCC ACC TTC AAC GAG ACC TTT GGT GAC
 350
 Tyr Ser Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln
 TAT TCC GAA AAG GCA CAC CAC GAG CTG CTC AAC ACC AAG CTG GAG CAG
 370
 Trp Ala Glu Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr
 380
 TGG GCC GAA GAG GCC GTC GCC CGT GGC GGA TTC CAC AAC ACC ACC
 390
 Ala Leu Leu Ile Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Asn
 400
 GCC TTG CTC ATC CAG TAC GAG AAC TAC CGC GAC TGG ATT GTC AAC
 410
 His Asn Val Ala Tyr Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val
 CAC AAC GTC GCG TAC TCG GAA CTC TTC CTC GAC ACT GCC GGA GTA
 420

FIG. 6-4

19/34

Ala Ser Phe Asp Val Trp Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr
 GCC AGC TTC GAT GTG TGG GAC CTT CTG CCC TTC ACC CGA GGA TAC
 430

Val His Ile Leu Asp Lys Asp Pro Tyr Leu His His Phe Ala Tyr
 GTT CAC ATC CTC GAC AAG GAC CCC TAC CTT CAC CAC TTC GCC TAC
 440

Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala
 GAC CCT CAG TAC TTC CTC AAC GAG CTG GAC CTG CTC GGT CAG GCT
 460

Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile Ser Asn Ser Gly Ala Met
 GCC GCT ACT CAA CTG GCC GCG AAC ATC TCC AAC TCC GGT GCC ATG
 470

Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro Gly Asp Asn Leu Ala
 CAG ACC TAC TTC GCT GGG GAG ACT ATC CCC GGT GAT AAC CTC GCG
 490

Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Thr Glu Tyr Ile Pro Tyr His
 TAT GAT GCC GAT TTG AGC GCC TGG ACT GAG TAC ATC CCG TAC CAC
 500

Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser Met Met Pro
 TTC CGT CCT AAC TAC CAT GGC GTG GGT ACT TGC TCC ATG ATG CCG
 520

Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val Tyr Gly
 AAG GAG ATG GCC GGT GTT GAT AAT GCT GCC GGT GTG TAT GGT
 530

FIG. 6-5

Val Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr Gln
 CTC CAG GGA CTG CGT GTC APT GAT GGT TCT ATT CCT CCT ACC CAA
 550
 Met Ser Ser His Val Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys
 570
 ATG TCG TCC CAT GTC ATG ACG GTG TTC TAT GCC ATG GCG CTA AAA
 Arg
 Ile Ser Asp Ala Ile Leu Glu Asp Tyr Ala Ser Met Gln OP
 580
 APT TCG GAT GCT ATC TTG GAA GAT TAT GCT TCC ATG CAG TGA GTGGTA
 Ser
 TCA TGGGGA PATGAGTGAGGATATTAGGGGATGGTACTTAGATGCTGGGGAGGTATAATC
 ATAGA TTGGATAGAA TTGGTACGTTACATAGACACAGGTTACATGAA TAGACGTTTCGTTATA
 TGTGAGCAGACATTACTACCAACAAAAA AAAAAAAAAA ACCCGAATTC

20/34

Translatert molekylvekt = 65679.50 (inkludert signalpeptid)

Codon usage:

| | | | |
|------------|------------|------------|------------|
| 3/UUU/phe | 6/UCU/ser | 8/UAU/tyr | 0/UGU/cys |
| 15/UUC/phe | 18/UCC/ser | 20/UAC/tyr | 3/UGC/cys |
| 0/UUA/leu | 0/UCA/ser | 0/UAA/oc | 1/UGA/op |
| 5/UUG/leu | 5/UCG/ser | 0/UAG/am | 10/UGG/trp |
| 7/CUU/leu | 6/CCU/pro | 5/CAU/his | 8/CGU/arg |
| 20/CUC/leu | 16/CCC/pro | 15/CAC/his | 11/CGC/arg |
| 3/CUA/leu | 2/CCA/pro | 6/CAA/gln | 1/CGA/arg |

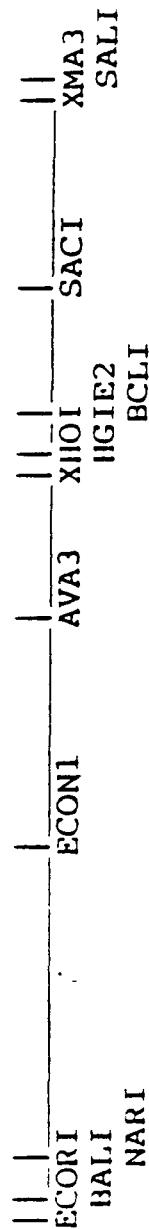
FIG. 6-6

21/34

| 19/CUG/leu | 2/CCG/pro | 17/CAG/gln | 1/CGG/arg |
|------------|------------|------------|------------|
| 6/AUU/ile | 12/ACU/thr | 9/AUU/asn | 3/AGU/ser |
| 21/AUC/ile | 27/ACC/thr | 24/AAC/asn | 8/AGC/ser |
| 0/AUA/ile | 1/ACA/thr | 3/AAA/lys | 1/AGA/arg |
| 12/AUG/met | 4/ACG/thr | 12/AAG/lys | 1/AGG/arg |
| 10/GUU/val | 23/GCU/ala | 12/GAU/asp | 22/GGU/gly |
| 19/GUC/val | 26/GCC/ala | 24/GAC/asp | 20/GGC/gly |
| 2/GUA/val | 5/GCA/ala | 11/GAA/ghu | 14/GGA/ghu |
| 15/GUG/val | 6/GCG/ala | 19/GAG/ghu | 1/GGG/ghu |

FIG. 6-7

Sekvens av 5'-regionen til GO-genet



- 3 AATCGGTAATTCGGCA'GGCCAAAGTCGGTATCCCTTGGGCCACCGA'GAT'TGCGTCC
 TAAGCCA'PAAGAGCCGTACCGGTTTCAGCCA'TAGGCAACCGCGGTGCTACTAAACGCAGG
- 1 ECORI, 20 BALI, 41 NARI,
- 63 AGGATTCGGTATAGTTCCTCGTCCACGAGCTGCCCTACCGTCAGCGTGAGGCAGTGAGCTAA
 TCC'TAAGCATAATCAAGGAGCAGGTGCTCCGCGGATGGCAGT'CGCAGTCCCGTCACTCGATP
- 123 TATGGGGCCAAATAAGCCACTACGAGGATGACATGGCCTCTACAGAAACGAGAGACGCAGAG
 ATACCCCGGTTATTCGGTGATGCTCCTACTGTACCGGAGATGCTTGTCTCTGCGTCTC
- 183 GATCAGGACGCCAA'TCC'TGGCTCCACC'TGCT'PAAGGATTCGGCTT'TGGAC'TATCCAGGG
 CTAGTCC'TGGGTTAGGACCGGAGGTGGACAGATTCCTAAGCGAAAACCTGATAGGTCCC
- 209 ECON1,
- 243 AT'PA'IGGCTTCGGAT'AT'GTATTCGGGATACCGACGGCTGAGCACACGGAGGATGAGGT
 TAATACCGAAGCC'ATAACATAAGCCCTATGGCTGCCGACTCGTGTGCCCTCCTACTCCA
- 303 TCAGCTCAGCGGCCCTATCAGTATGCAT'TATGAGGATGGCTTCTTGGAAAGCAGAGGAA'T
 AGTCGAGTCCCGGGGATAGTCA'TACGTAATACTCCTACCGAAGAACCTTTCGTCTCCTTA

22/34

FIG. 7B-1

325 AVA3,
363 TGGATTATCGAACAAAGTTGGTTCTGGACCAATGACTCGAGCGTATAAGTAACCTCGTTTCG
ACCTAATAGCTTGTTC AACCAAGACCTGGTAAC TGA CTGAGCTCGCATATTCATTTGGAGCAAGC

397 XH01, 413 HGIE2,
423 GTCCTCCTGTCAACCTTCTGATCAGCAACCAGCCTTTCCTCTCTCATTTCCCTCATCTGCCCC
CAGGAGGACAGTGGAAAGACTAGTCCGTTGGTCGGAAAGGAGAGAGTAAGGGAGTAGACGGG

440 BCL1,
MetGlnThrLeuLeuValSerSerLeuValValSerLeuAlaAlaLeuProHis
483 ATCATGCAGACTTCCTTGTGAGCTCGCTTGTGGTCTCCCTCGCTGCGGCCCTGCCACAC
TAGTACGCTCGAGAGGAACA CTGAGCGAACACCAGAGGGACGCGCGGACGGGTGTG

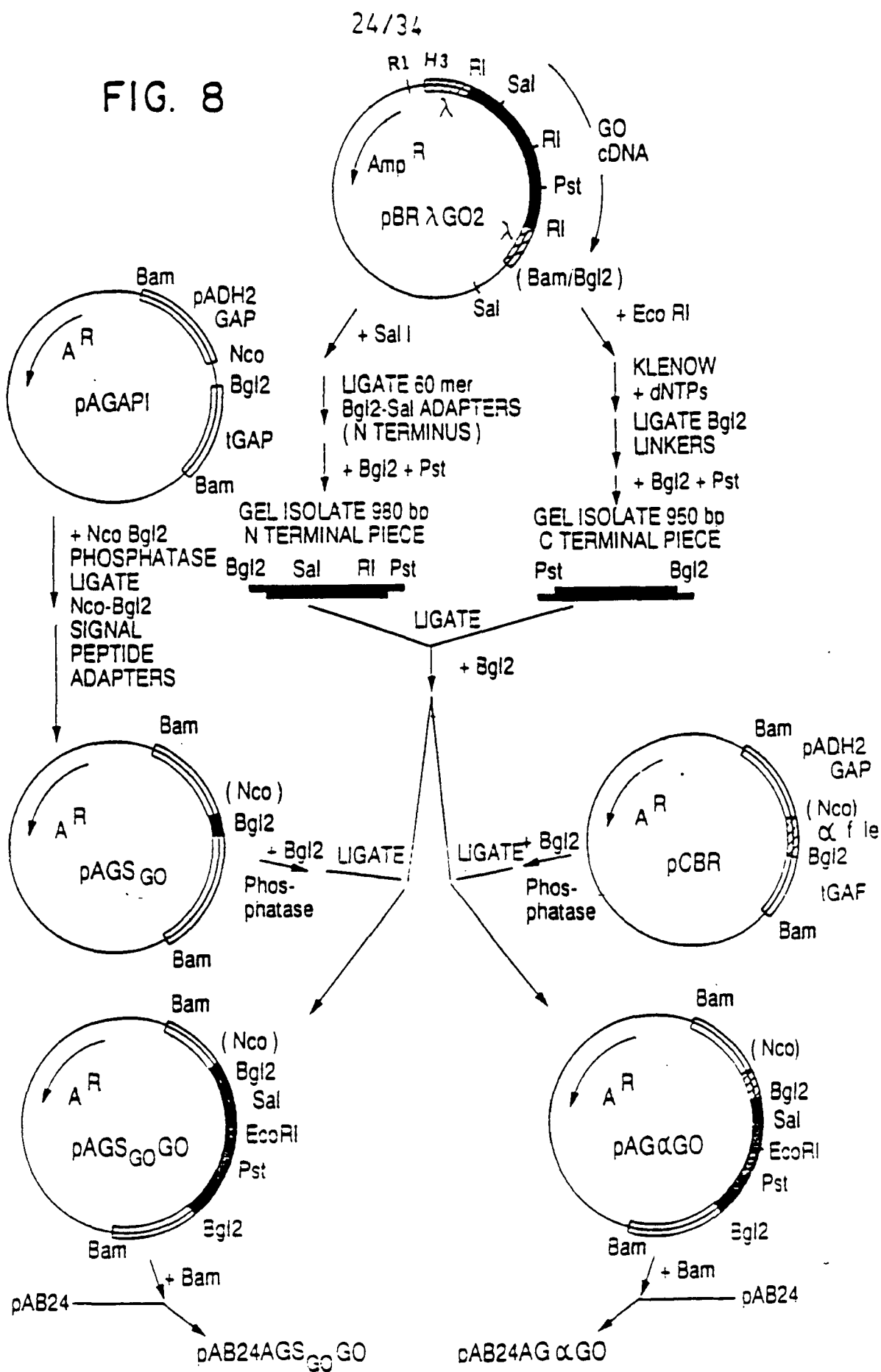
503 SAC1,
TyrIleArgSerAsnGlyIleGluAlaSerLeuLeuThrAspProLysAspValSerGly
543 TACATCAGGAGCAATGGCATGAGCCAGCCCTCCTGACTGATCCCAAGGATGTC TCCGGC
ATGTAGTCCCTCGTTACCGTAACTTCGGTCGGAGGACTGACTAGGGTTCCCTACAGAGGCCG

599 XMA3,
ArgThrValAsp
603 CGCACGGTCCGAC
GCGTGCCAGCTG

609 SAL1,

FIG. 7B-2

FIG. 8



25/34

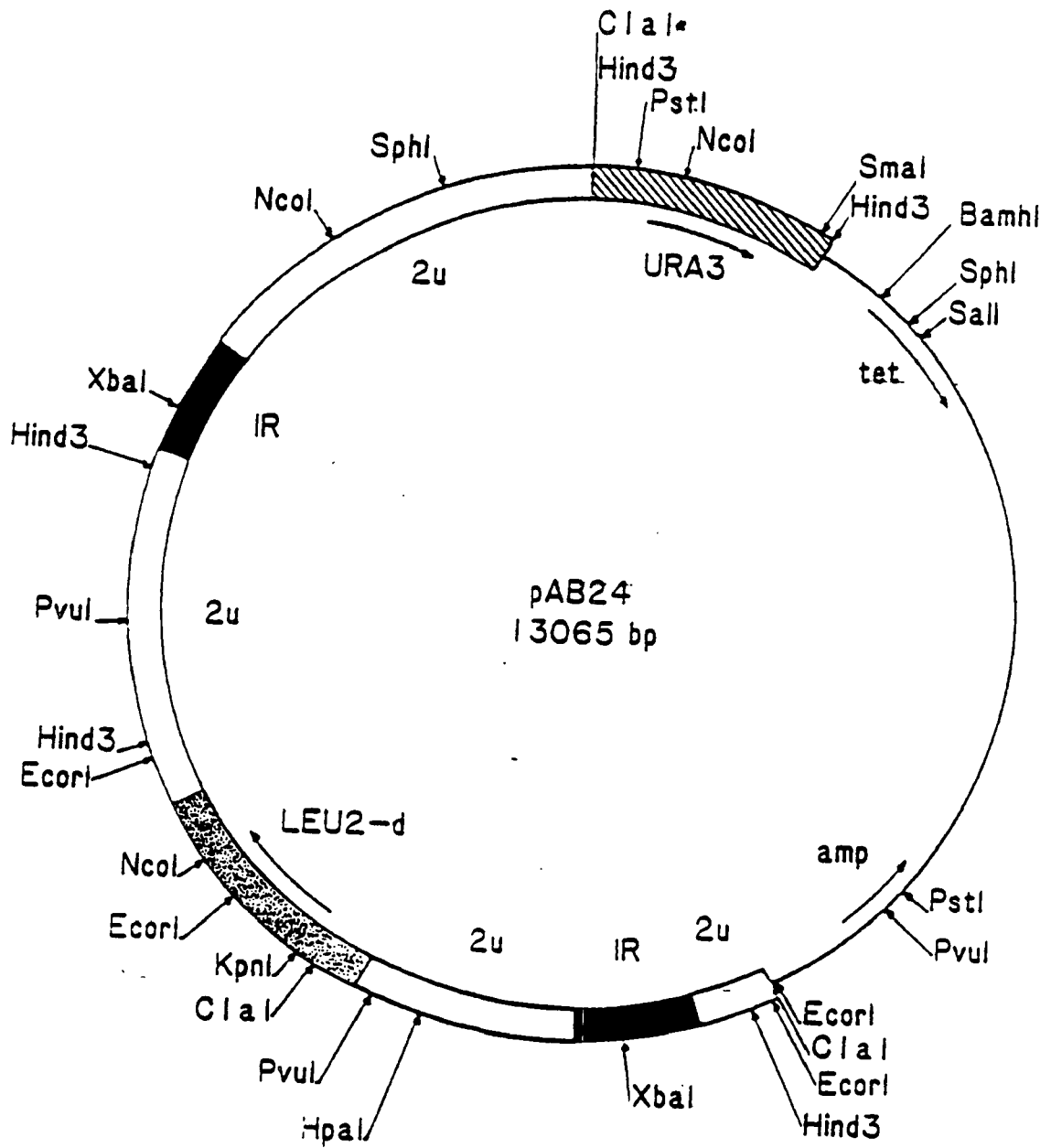


FIG. 9

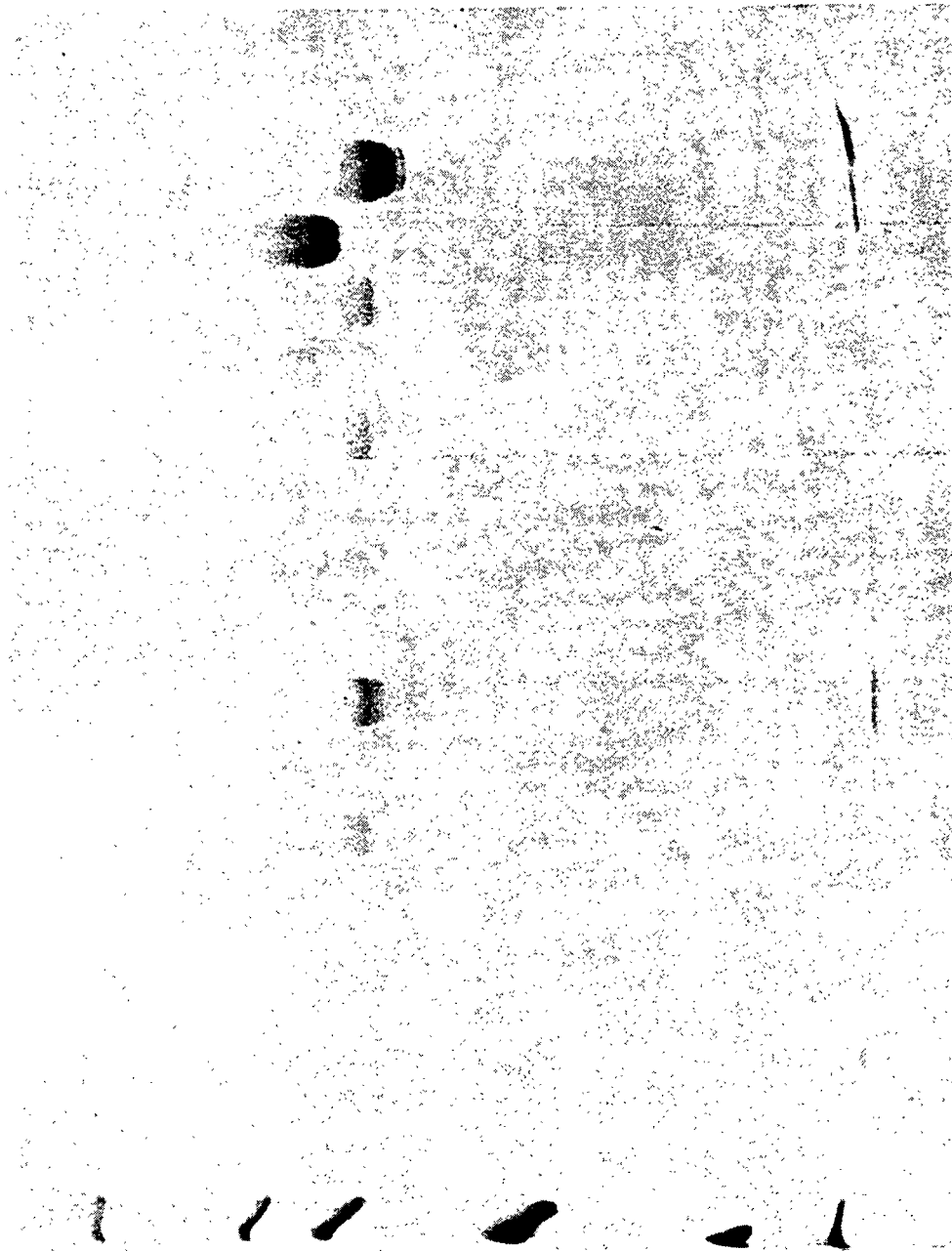


FIG. 10

27/34

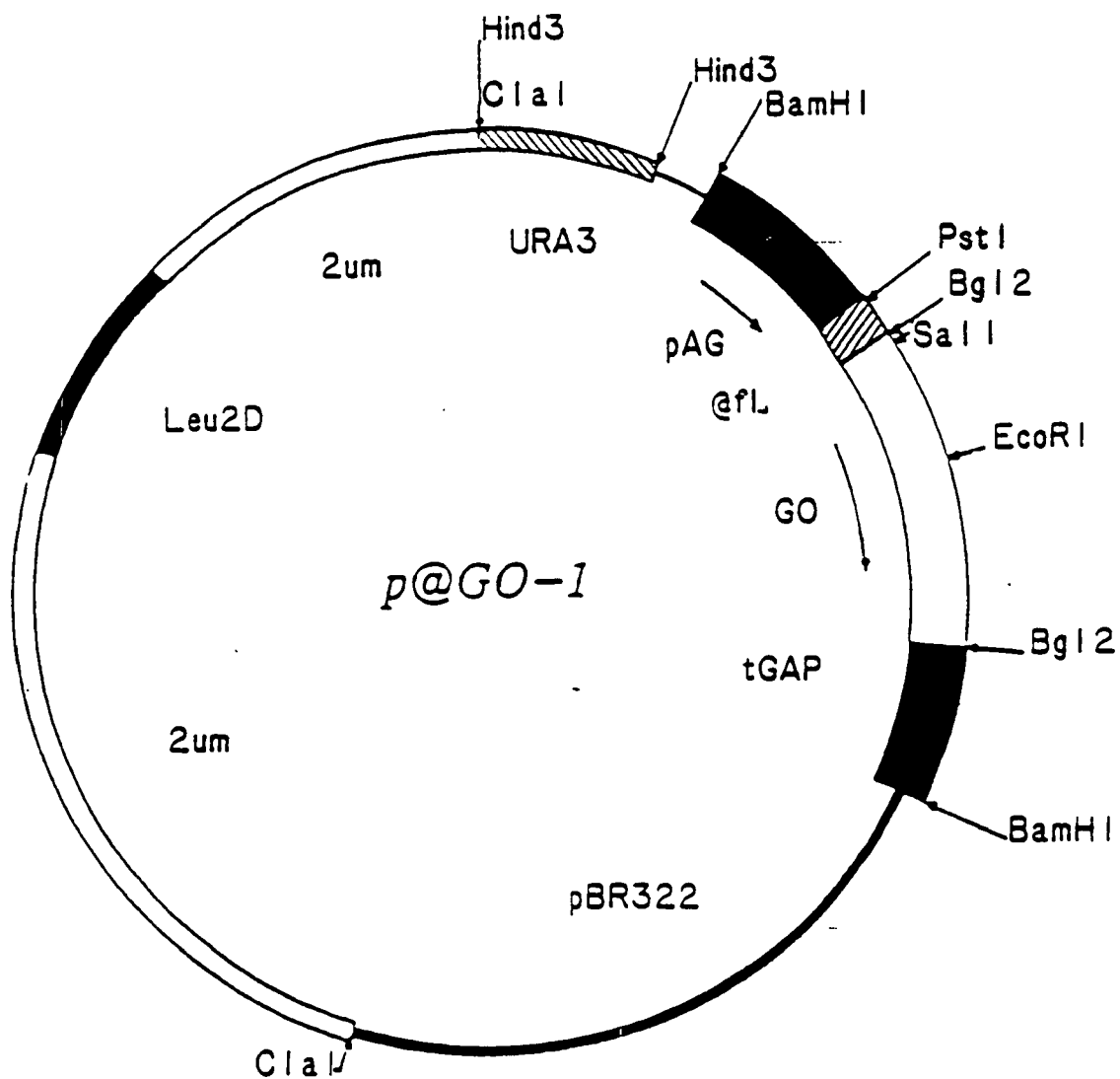


FIG. 11

28 / 34

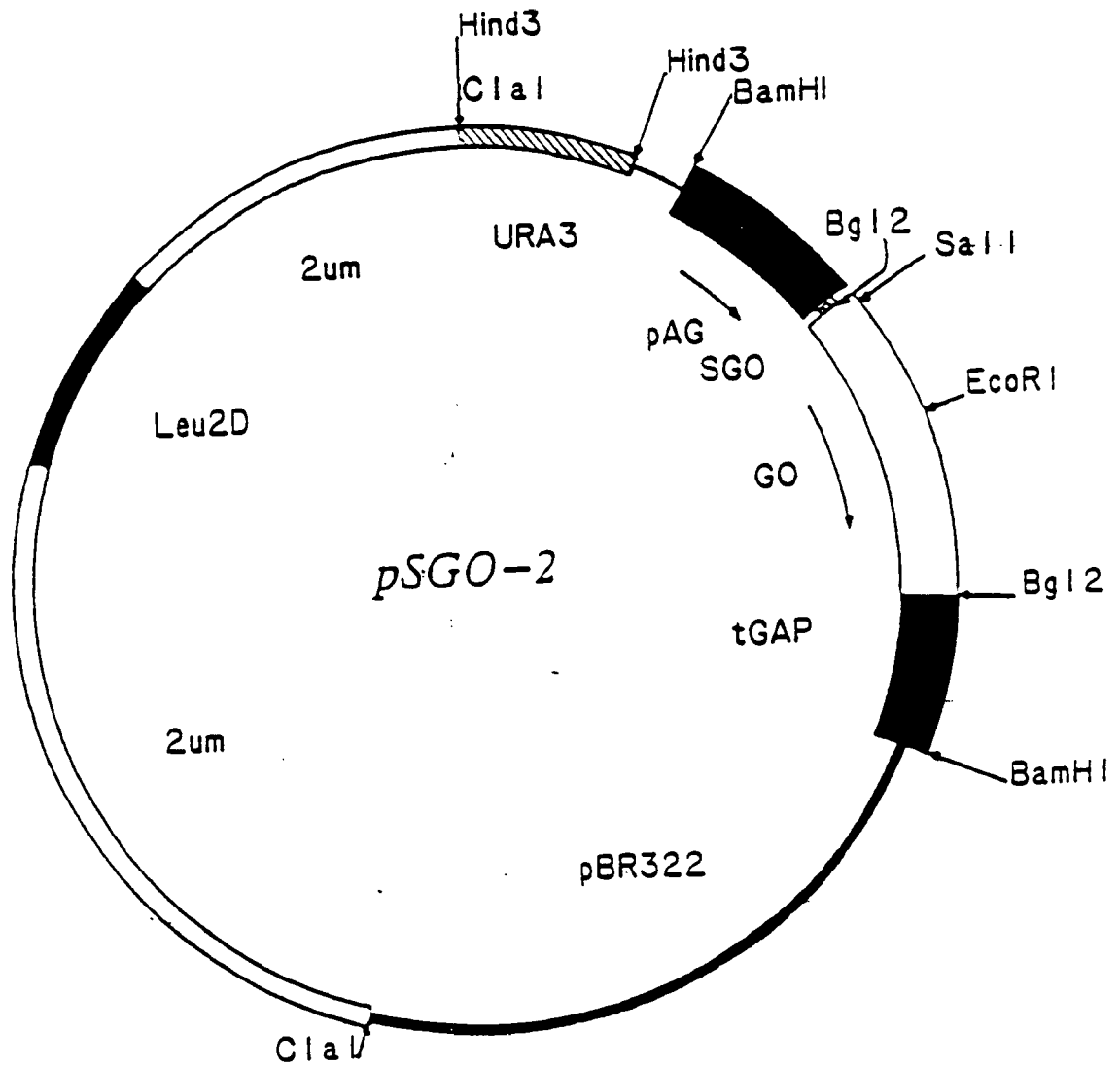
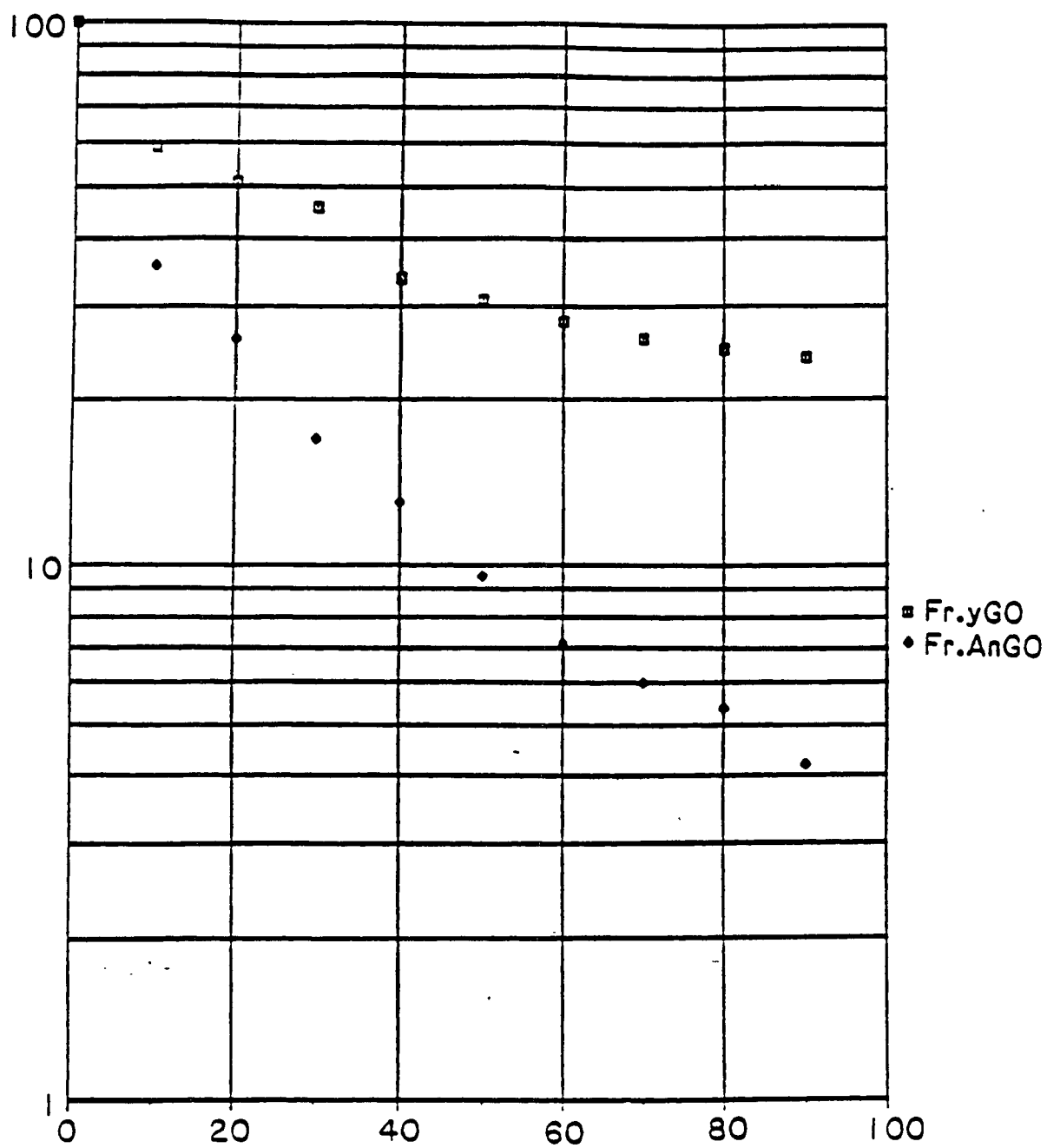


FIG. 12

29/34



TIME

FIG. 13

3Q/34

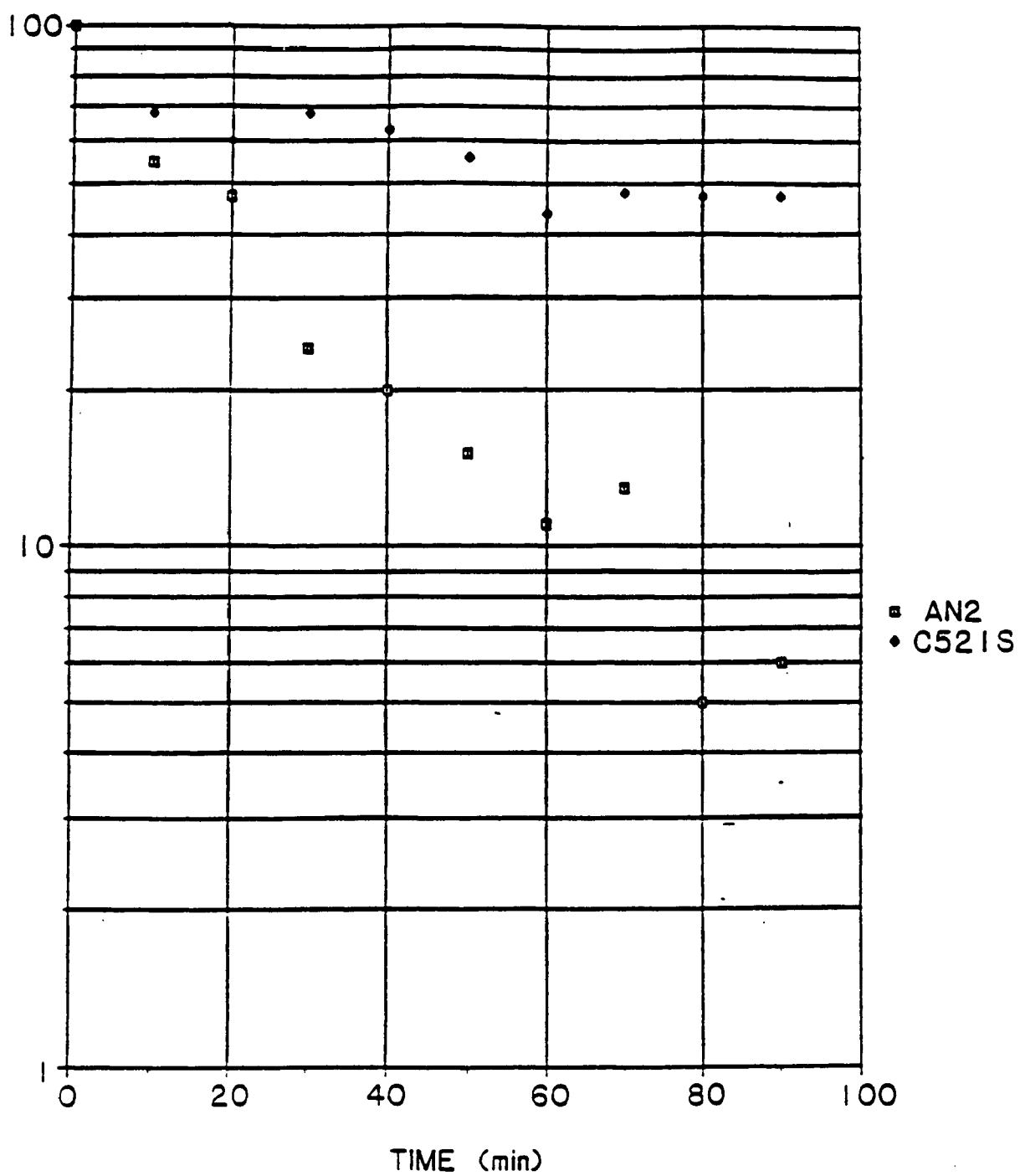


FIG. 14

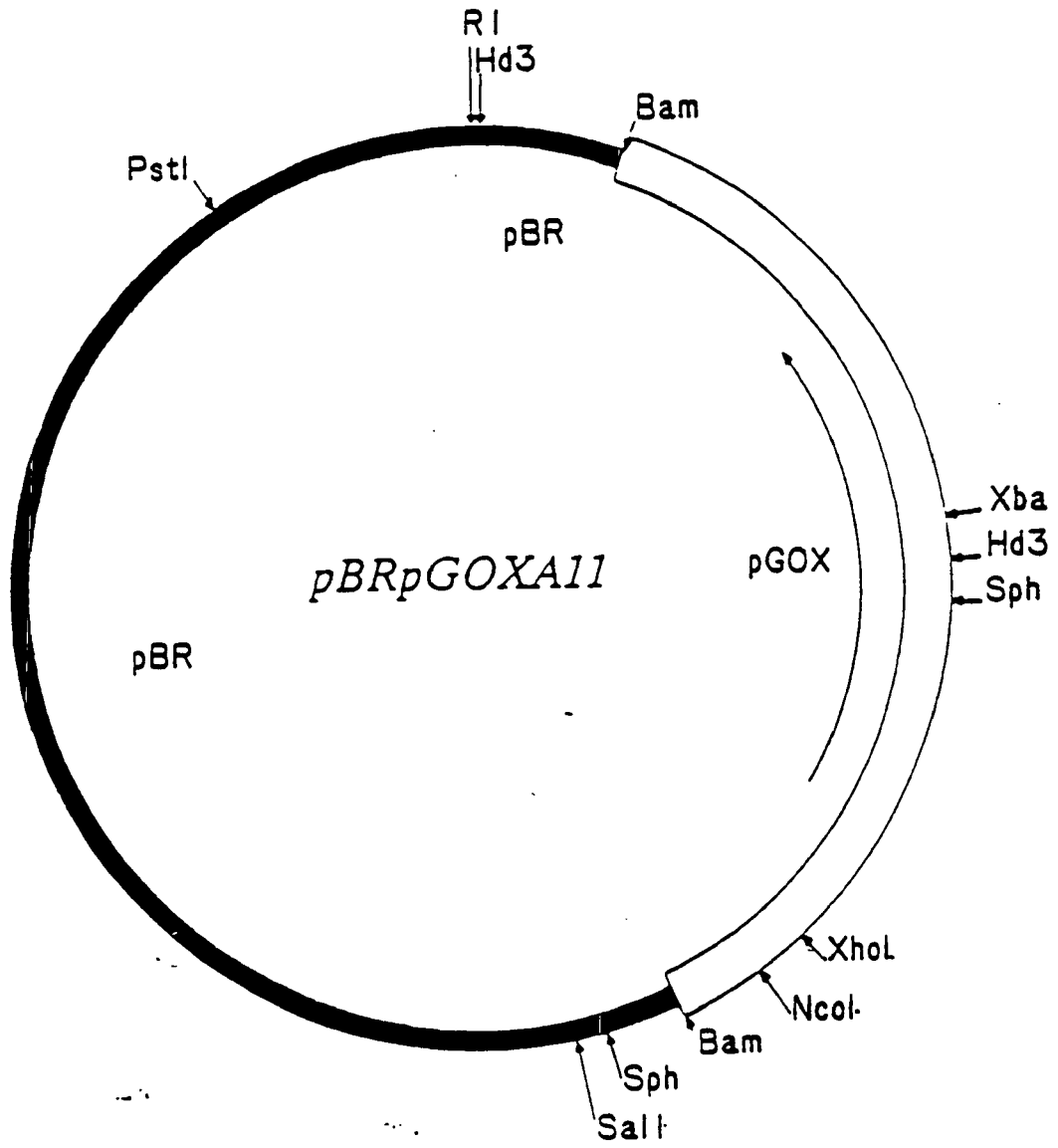


FIG. 15

Delsekvens av et fragment av klon pBRA11



2 AspProAsnAlaTyrGlyGlnIlePheGlyThrThrValAspGlnAsnTyrLeuThrVal
 GATCCAAATGCTTATGGACAAATCTTTGGCACCACTGTTGACCCAGAACTACCTCACCCTT
 CTAGGTTTACGAAATACCTGTTAGAAACCGTGGTACCAACTGGTCTTGATGGAGTGGCAA

1 BAMHI,

62 ProLeuIleAsnAsnArgThrAsnAsnIleLysAlaGlyLysGlyLeuGlyGlySerThr
 CCCCTGATCAACAACCGCACGAAATATCAAGCCCGTAAAGGCTTTGGAGGATCAACC
 GGGGACTAGTTGTTGGCGTGCTTGTATAGTCCCGCCATTCCAGAACCTCCTAGTTGG

66 BCLI,

122 LeuIleAsnGlyAspSerTrpThrArgProAspLysValGlnIleAspSerTrpGluLys
 TTGATAAACGGTGACTCCTGGACTCGCCAGACAAAGTCCAGATTGATTCTTTGGGAGAAG
 AACTATTGCCACTGAGGACCTGAGCGGGTCTGTTTCAGGCTAACTAAGAACCCCTCTTC

152 TTH3I,

182 ValPheGlyLeuGluGlyTrpAsnTrpAspAsnMetPheGluTyrMetLysLysAlaGlu
 GTCTTTGGACTGGAAGGTTGGAATTGGGACCAACATGTTCCAGTACATGAAGAGGCCGAG
 CAGAAACCTGACCTTCCAACCTTAACCCCTGTTGTACAAGCTCATGTACTTCTCCGGCTC

FIG.16-1

242 AlaAlaArgThrProThrAlaAlaGlnLeuAlaSerGlyHisSerPheAsnAlaThrCys
 GTCGACGTACCCCTACTGCTCAGCTTGGCTGGCCACTCCCTCAATGCTACCTGC
 CGACGTGCATGGGGATGACCGACGAGTCGAAACGCAGACCCGGTGAGGAAGTTACCGATGGACG

277 BALI, 301 NCOI,

302 HisGlyThrAsnGlyThrValGlnSerGlyAlaArgAspLysProAlaLeuValSerTyr
 CATGGAACCAACGGTACTGTTCATCCGGAGCCCGTGACAAAGCCAGCCCTGGTCTCCTAT
 GTACCTGGTTGCCATGACAAGTTAGGCCCTCGGGCAC.TGTTCCGGTCGGAACCCAGAGGATA

362 TyrGluGlyProTyrGluHisArgLeuAlaLeuGlyValProTyrSerLysThrPheSer
 TATGAAGGCCCTTATGAACACCCGTCCTCGCCCTTGGTGTCCTCCGTACAGCAAGACTTCTCT
 ATACTTCCGGGAATACTTGTGGCAGAGCGGGAAACCCACAGGGCATGTCTGTTCTGAAAGAGA

422 ValValIleLeuGluValSerLeu
 GTGGTCATCCTCGAGGTGTCCTATG
 CACCAGTAGGAGCTCCACAGAGATAC

431 XHOI,

482

FIG. 16-2

Sammenstilling av A. niger og P. amagasakiense GO - sekvenser

```

0  sngieaslltdpkdvsgrtvdyyliagggltgtltaarltenpnisvlviesgsgyesdrgrpiieDlnt {Y
0  DpNa {Y
68  G) d {IFG} ss {VD} haYe {TV} eLat {NN} qTaliIrsGn' {GLGGSTL} v {NG} gt {
5  G) q {IFG} tt {VD} qnYl {TV} pLi. {NN} rTnnikaGk {GLGGSTL} l {NG} ds {
110 WTRP) hKaQv {DSWE} t {VFG} n {EGWNWDN} vaayslq {AE} r {AR} aPnAkQlAa {
46 WTRP) dKvQl {DSWE} k {VFG} l {EGWNWDN} mfeymkk {AE} a {AR} tPtAaQlAs {
156 GII) Y {FNA} s {CHG} v {NGTV} haGp {RD} tgddySpIvkaImSavedr {GVP} tkKdF
92 GII) s {FNA} t {CHG} t {NGTV} qSGa {RD} kPalvSYyegpyehrlal. {GVP} ysktF
204 gcgdphg {VS} mfpntlhedqvrSdaarewllpnyqrnlqvltgqyvkvllsqngttpravgvefg
139 svvile. {VS} l.....

```

3/4

FIG. 17