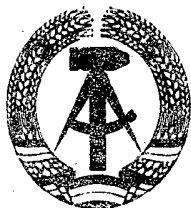


(19) DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT



Ausschliessungspatent

Erteilt gemäße § 5 Absatz 1 des Aenderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

207 220

Int.Cl.³

3(51) C 12 N 15/00

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) AP C 12 N/ 2486 133
(31) 355297/82;438236/82

(22) 08.03.83
(32) 08.03.82;01.11.82

(44) 22.02.84
(33) US;US

(71) siehe (73)
(72) HITZEMAN, RONALD A.;LEUNG, DAVID W.-H.;US;
(73) GENENTECH, INC., SAN FRANCISCO, US
(74) IPB (INTERNATIONALES PATENTBUERO BERLIN) 62177/12/38 1020 BERLIN WALLSTR. 23/24

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON FUER EINEN MIKROORGANISMUS HETEROLOGEM PROTEIN

(57) Hefeorganismen werden durch rekombinante DNA-Technik genetisch so verändert, daß sie durch Expression, Processing und Sekretion ein Polypeptid bilden, das normalerweise für den Wirtsorganismus heterolog ist und in diskreter Form, frei von unerwünschten Polypeptidpräsequenzen oder anderen Expressionsartefakten, gewinnbar ist.

248613 3

Anwendungsgebiet der Erfindung:

Die Erfindung betrifft allgemein das Gebiet der rekombinanten DNA-Technik unter Verwendung von Hefewirtssystemen und Expressionsträgern, die Expression, Processing und Sekretion von heterologem Protein als diskretes Produkt bewirken, wobei dieses Produkt nicht von unerwünschten Präsequenzen oder anderen Artefakten der Expression begleitet ist.

Erfindungsgemäss ist es erstmals möglich, ein Protein, das für einen Hefewirt normalerweise heterolog ist, in brauchbaren Mengen aus dem die Hefekultur tragenden Medium zu gewinnen, nachdem es durch den Hefeorganismus auf eine Art und Weise, die die Bildung nativer Zellumgebung nachahmt, exprimiert, aufgeschnitten (Processing) und ausgeschieden worden ist. Somit beruht die Erfindung auf der erfolgreichen Manipulation von Expressionsträgern und Hefewirt, so dass es zu einer Synthese von normalerweise durch den Hefewirt nicht gebildetem

Protein kommt und insbesondere der Hefewirt so reguliert wird, dass er das gebildete Protein in den Sekretionsweg abgibt. Somit ist die Erfindung auf Mittel und Verfahren gerichtet, mit Hilfe derer brauchbare Mengen von heterologem Protein aus dem Medium einer Hefekultur gewonnen werden können, wobei die Hefekultur lebensfähige Zellen enthält, die Expressionsträger mit einem Gehalt an das Protein kodierender DNA beherbergen. Ein erheblicher Vorteil der Erfindung besteht darin, dass wertvolles, diskretes Proteinprodukt im Zellkulturmedium erhalten werden kann und eine Lysis der Zellen zur Gewinnung des Produkts, das bisher nur aus dem Zellinhalt und häufig nicht in reifer Form zugänglich war, erübrigt.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen:

Veröffentlichungen und andere Materialien, die der vorliegenden Erfindung als Stand der Technik und als technischer Hintergrund zugrunde liegen und die teilweise für die praktische Durchführung der Erfindung zusätzliche Erläuterungen geben, sind mit Nummern gekennzeichnet und in der beigelegten Bibliographie aufgeführt.

Hefeorganismen transportieren natürlicherweise eine kleine Anzahl von bestimmten homologen Proteinen zur und gelegentlich durch die Plasmamembran als wesentlichen Beitrag zum Wachstum der Zelloberfläche und zum Zellstoffwechsel. Zellkeime als Reproduktionsgrundlage zur Bildung von Tochterzellen benötigen zusätzliche Proteine zur Bildung von Zellwand und Plasmamembran sowie für den Stoffwechsel. Einige dieser Proteine müssen zunächst ihren Weg zur Funktionsstelle finden. Daher wird angenommen, dass ein Sekretionsweg existiert (1). Bestimmte, bei den vorstehenden Verfahren beteiligte homologe Proteine werden durch Translation im endoplasmatischen Reticulum gebildet. Bei homologen Proteinen handelt es sich um solche Proteine, die normalerweise durch die Hefespezies gebildet werden und für

deren Lebensfähigkeit erforderlich sind. Nach der Bildung wandern sie durch enzymatischen Transfer zum Golgi-Apparat, von dort innerhalb der Vesikel zu den Plasmamembranen, wo sich einige assoziieren oder in gewissem Umfang in den Raum zwischen der Plasmamembran und der Zellwand eindringen. Eine kleine Anzahl von homologen Proteinen scheint vollständig durch die Zellwand nach aussen transportiert zu werden, z.B. der α -Faktor und das Killer-Toxin (2, 3).

Die Keimregion der Zelle scheint die Anziehungsstelle für die Vesikel zu sein. Durch ihr Verschmelzen mit der inneren Oberfläche des Keims tragen sie zum Gesamtwachstum der Plasmamembran und vermutlich der Zellwand bei (4, 5, 6). Diese Theorie liefert keinen Beweis dafür, dass die Sekretion oder Wanderung von Proteinen durch die Membran tatsächlich erfolgt. In ähnlicher Weise ist es noch umstritten, ob die Glycosylierung des Proteins den sogenannten Sekretionsprozess unterstützen kann oder an diesem beteiligt ist. Ferner nimmt man definitionsgemäss an, dass "sekretierte" Proteine ein Signalphäpeptid aufweisen, von dem postuliert wird, dass es mit dem Transportprozess oder dem Einverleibungsprozess an der Membranoberfläche assoziiert ist. Die eventuelle Funktion derartiger Modifikationen des reifen Proteins beim Sekretionsprozess und die Gesamtrolle des Sekretionswegs beim Oberflächenwachstum sind Spekulationen, die eines sicheren Beweises entbehren.

Es wurde angenommen, dass die rekombinante DNA-Technik einen wertvollen Beitrag bei der Beantwortung der offenen Fragen über den Sekretionsprozess bei Hefeorganismen geben könnte und, sofern ihre Anwendbarkeit gegeben ist, derartige und andere Organismen befähigen könnte, endogen reichliche Mengen an heterologen Polypeptidprodukten zu bilden (vgl. beispielsweise 7 bis 17), wodurch eine entsprechende Manipulation des Hefewirts erreicht werden könnte, dass er zur Sekretion von heterologem Protein in diskreter, reifer Form veranlasst werden könnte.

Ziel der Erfindung:

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, für einen Hefeorganismus heterologe Proteine als Produkt von Expression, Processing und Sekretion durch die Hefe herzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung:

Die Erfindung beruht auf dem Befund, dass Hefeorganismen dazu veranlasst werden können, Protein, das normalerweise für den Hefeorganismus heterolog ist und für dessen Lebensfähigkeit nicht notwendig ist, zu exprimieren, abzuschneiden (Processing) und zu sekretieren, so dass das Protein aus dem Medium, in dem die lebensfähigen produzierenden Hefezellen vorhanden sind, in diskreter Form erhalten werden kann, ohne dass es von unerwünschten Polypeptidpräsequenzen oder anderen Expressionsartefakten begleitet ist. Geeignete Hefezellen in einer lebensfähigen Kultur werden mit Expressionsträgern transformiert, die ein heterologes Protein und ein heterologes Signalpolypeptid kodierende DNA beherbergen. Bei der Expression des Proteins zusammen mit dem heterologen Signalpolypeptid wird das reife Expressionsprodukt dem Processing unterworfen und das reife heterologe Protein in das Medium der Zellkultur transportiert. Das Produkt lässt sich relativ leicht aus dem Medium entfernen, ohne dass es erforderlich ist, unerwünschte Präsequenzen oder andere Expressionsartefakte zu entfernen, z.B. Methionin, das an die normalerweise erste N-terminale Aminosäure gebunden ist, was eine Expressionsfolge des AUG-translationalen Startsignalcodons ist. Somit lässt sich das Medium in einer Form erhalten, die im wesentlichen frei von lebensfähigen oder zerstörten (d.h. lysierten oder anderweitig aufgebrochenen) Zellen ist und die aufgrund ihres Gehalts am gewünschten Produkt leicht zu weiteren Reinigungsverfahren eingesetzt werden kann. Dieses Produkt ist nach entsprechender

Reinigung einsatzbereit für den beabsichtigten Verwendungszweck. z.B. kann Humanleukozyteninterferon beim Menschen als Antivirus- und/oder Antitumormittel eingesetzt werden (vgl. allgemein 7 bis 17).

Gegenstand der Erfindung ist ein für einen Hefeorganismus normalerweise heterologes und für dessen Lebensfähigkeit nicht erforderliches Protein, das in diskreter Form vorliegt und nicht von Polypeptidpräsequenzen oder anderen Artefakten der Expression begleitet ist, als ein Produkt von Expression, Processing und Sekretion durch die Hefe. Gegenstand der Erfindung sind ferner Mittel und Verfahren, die bei der Bildung derartiger Proteine angewandt werden. Gegenstand der Erfindung sind schliesslich Hefekulturen, die zur Bildung derartiger Proteine fähig sind, sowie die erhaltenen Hefekulturmedien, die derartige Proteine als Produkte enthalten.

Unter dem hier verwendeten Ausdruck "heterologes Protein" ist ein Protein zu verstehen, das normalerweise von einem Hefeorganismus nicht gebildet wird oder für dessen Lebensfähigkeit nicht erforderlich ist. Mit diesem Ausdruck ist die funktionelle Insertion einer ein derartiges Protein kodierenden DNA mittels rekombinanter DNA-Technik in einen Expressionsträger, der wiederum zur Transformation eines Hefeorganismus-Wirts verwendet wird, zu verstehen. Die funktionelle Insertion von DNA bedeutet die Insertion von DNA, die das heterologe Protein und die Präsequenz kodiert, in einen Expressionsvektor unter Kontrolle von die Expression dirigierenden Promotorsystemen. Beispiele für derartige heterologe Proteine sind

Hormone, wie menschliches Wachstumshormon, Rinderwachstumshormon und dergleichen, Lymphokine, Enzyme, Interferone, wie Humanfibroblasteninterferon, Humanimmuninterferon und Human- und Hybridleukozyteninterferon und dergleichen, virale Antigene oder Immunogene, z.B. Maul- und Klauenseuche-Antigene, Grippeantigenprotein, Hepatitiskern- und -oberflächenantigene und dergleichen, sowie verschiedene andere Polypeptide, wie Humanserumalbumin, Humaninsulin, verschiedene Glycoproteine und dergleichen. Die Ausdrücke "heterologe Präsequenz" oder "heterologes Signalpolypeptid" beziehen sich auf Polypeptide, die normalerweise von einem Hefesystem nicht gebildet oder verwendet werden und von dem Signalpolypeptid selektiert werden können, das für das in Frage stehende heterologe Protein oder andere heterologe (Signal)-Polypeptide, die mit dem in Frage stehenden heterologen Protein funktionell verknüpft sind, nativ ist.

Der Ausdruck "Sekretion" bedeutet den Transport des Produkts durch die Plasmamembran und zumindest in die Zellwand oder durch die Zellwand des Hefeorganismus hindurch in das die Zellkultur tragende Medium. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass in einigen Fällen das "sekretierte" Produkt sich mit der Zellwand assoziiert und somit möglicherweise ein unterschiedliches Reinigungsverfahren oder eine Modifikation der Struktur und der Funktion des Hefewirts erforderlich macht. Unter dem Ausdruck "Processing" (Herausschneiden) ist die zelluläre Spaltung des Signalpolypeptids vom reifen Protein zu verstehen, so dass ein Protein frei von fremdem Peptid in sogenannter diskreter, reifer Form gebildet wird. Der Ausdruck "fremdes Peptid" umfasst, wie vorstehend erwähnt, Peptide, die durch Expressionsartefakte entstehen und beispielsweise Methionin enthalten. Das Processing ermöglicht eine unbedeutende Spaltung des Signalpolypeptids an einer Stelle, die nicht in desaktivierender Weise nahe am präzisen Vereinigungspunkt des Signalpolypeptids mit dem reifen Protein ist.

Fig. 1 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenz des Signalpräpeptids von humanem IFN- α 1 (pre D), IFN- α 2 (pre A), IFN- α -1,2 (pre D/A), IFN- γ (pre γ) und IFN- β (pre β). Die unterstrichenen Aminosäuren geben die Unterschiede in den Aminosäuresequenzen von pre A und pre D wieder. Die DdeI-Stelle gibt die Verknüpfung der D- und A-Präsequenzen bei der Herstellung der Hybrid-pre-D/A-Präsequenz an.

Fig. 2 ist ein Diagramm des Hefeexpressionsplasmids YEpIPT, das hier als allgemeiner Träger zur Expression verschiedener Geninserts verwendet wird. Die Abbildung zeigt einige der Restriktionsstellen und verschiedene interessierende Bereiche.

Fig. 3 zeigt den Aufbau eines EcoRI-Fragments mit einem Gehalt an pre-plus IFN- α 1-Gen zur direkten Expression von IFN- α 1 in Hefe.

Fig. 4 zeigt den Aufbau eines EcoRI-Fragments mit einem Gehalt an reifem IFN- α 2-Gen zur direkten Expression in Hefe.

Fig. 5 zeigt den Aufbau eines EcoRI-Fragments mit einem Gehalt an pre-plus IFN- α 2-Gen mit der kodierenden Sequenz der ersten 14 Aminosäuren in der Präsequenz von pre-IFN- α 1 zur direkten Expression von IFN- α 2 in Hefe.

Fig. 6 zeigt den Aufbau eines EcoRI-Fragments mit einem Gehalt an pre-plus IFN- γ -Gen mit 70 bp (Basenpaaren) der einleitenden Sequenz, die dem Initiations-ATG-Codon zur Expression von IFN- γ in Hefe vorhergeht.

Fig. 7 zeigt den Aufbau eines EcoRI-Fragments mit einem Gehalt an pre-plus IFN- γ -Gen für die direkte Expression von IFN- γ in Hefe.

Fig. 8 fasst sämtliche Bauteile zusammen, die bei der praktischen Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens im Verlauf von Expression, Processing und Sekretion verschiedener IFN-Gene in Hefe verwendet werden.

Fig. 9 zeigt eine Wachstumskurve von a) YEp1PT-LeIFA1/pep4-3 und b) YEp1PT-preLeIFA53t/pep4-3, gemessen durch die Absorption bei 660 m μ . Die Medien werden für a) und b) auf ihre Interferonaktivität unter Anwendung eines Bioassay untersucht. Die angegebene Zeit bezieht sich auf Stunden Wachstumsdauer bei 30°C.

Fig. 10A zeigt eine Wachstumskurve für einen 5 Liter-Fermentationsansatz von YEp1PT-preLeIFA53t/pep4-3. (●) bedeutet die Absorption bei 660 m μ und (o) Millionen Einheiten Interferonaktivität innerhalb der Zellen pro Liter.

Fig. 10B gibt die gleiche Wachstumskurve wie in Fig. 10A wieder, wobei die Aktivität der Medien angegeben ist.

Fig. 11 stellt ein Elutionsprofil von Medien pre D/A LeIF von einer monoklonalen Antikörpersäule dar.

Fig. 12 gibt den HPLC-Nachweis des Peak A-Interferonpools von der monoklonalen Antikörpersäule wieder.

Fig. 13 zeigt das Ergebnis der Aminosäuresequenzierung des nach HPLC-Reinigung erhaltenen Produkts.

Fig. 14 stellt die verschiedenen Bauteile dar, die hier zur Bildung von menschlichem Wachstumshormon (HGH) verwendet werden.

Fig. A erläutert schematisch die Restriktionskarte des 3,1 kbp HindIII-Inserts von Vektor pB1, aus dem der PGK-Promotor iso-

liert wurde. Es ist die Insertion einer EcoRI-Stelle und einer XbaI-Stelle in der 5'-flankierenden DNA des PGK-Gens angegeben.

Fig. B erläutert die 5'-flankierende Sequenz und die ursprüngliche kodierende Sequenz für das PGK-Gen vor Insertion einer XbaI- und EcoRI-Stelle.

Fig. C erläutert schematisch Techniken, die zur Insertion einer XbaI-Stelle in Position -8 im PGK-Promotor und zur Isolation eines 39bp-Fragments der 5'-flankierenden Sequenz von PGK, die dieses XbaI-Ende und ein Sau3A-Ende enthält, verwendet wurden.

Fig. D erläutert schematisch den Aufbau eines 300 bp-Fragments, das das vorstehende 39bp-Fragment, zusätzlich die PGK-5'-flankierende Sequenz (265 bp) von PvuI bis Sau3A (vgl. Fig. A) und eine XbaI-benachbarte EcoRI-Stelle enthält.

Fig. E erläutert schematisch den Aufbau des 1500 bp-PGK-Promotorfragments (HindIII/EcoRI), das neben dem gemäss Fig. 4 aufgebauten Fragment ein 1300 bp-HindIII- bis PvuI-Fragment von der PGK-5'-flankierende Sequenz (vgl. Fig. A) enthält.

Nachstehend wird die Erfindung näher erläutert.

Materialien

Sämtliche DNA-Restriktions- und -Stoffwechsellenzyme wurden von New England Biolabs und vom Bethesda Research Laboratories bezogen. Diese Enzyme wurden unter den Bedingungen und mit den Puffern eingesetzt, die von den Herstellern angegeben werden. ATP und die Desoxynucleotidtriphosphate dATP, dGTP, dCTP und dTTP wurden von PL Biochemicals bezogen. DNA-Linker wurden nach üblichen Verfahren hergestellt.

DNA-Herstellung und -Transformation

Die Reinigung von kovalent geschlossenen zirkulären Plasmid-DNAs aus *E. coli* (18) und die Transformation von *E. coli* (19) wurden nach bekannten Verfahren durchgeführt. *E. coli*-Miniscreens entsprachen (20). Die Transformation von Hefe wurde gemäss (21) durchgeführt, jedoch unter Berücksichtigung der nachstehenden Modifikationen. 200 ml Zellen mit 2×10^7 Zellen/ml wurden verwendet und durch Zentrifugation mit 25 ml H_2O gewaschen. Diese Zellen wurden mit 10 ml 1 m Sorbit, 25 millimolar EDTA (pH-Wert 8) und 50 millimolar Dithiothreitol 10 Minuten bei $30^\circ C$ behandelt und anschliessend mit 10 ml 1 m Sorbit gewaschen. Die pelletierten Zellen wurden sodann vorsichtig in 10 ml SCE (1 m Sorbit, 0,1 m Natriumcitrat, pH-Wert 5,8 und 0,01 m EDTA) resuspendiert und bei $30^\circ C$ mit 200 μg Zymolase 60 000 (Kirin Brewery) behandelt. Die Sphäroplastenbildung wurde bis zu 80 Prozent durch Zusatz von 100 μl der Suspension zu 0,9 ml 10-prozentigem SDS und Messen der Absorption bei 800 m μ durchgeführt, wobei eine Verdünnung der Zellen vor Zusatz des Enzyms als

0 Prozent-Standard (Lysis im 10-prozentigen SDS führt zu einem Abfall der Absorption bei 800 m μ) verwendet wurde. Die Zellen wurden sodann 3 mal mit 10 ml 1 m Sorbit gewaschen. Die Zellen lassen sich mehrere Tage bei $0^\circ C$ in Sorbit lagern. Die Zellen wurden sodann 1 mal mit 1 m Sorbit, 10 millimolar $CaCl_2$ und 10 millimolar Tris-HCl (pH-Wert 7,4) gewaschen und sodann in 1 ml dieser Lösung resuspendiert. 5 bis 15 μg gereinigte Plasmid-DNA oder 20 μl von *E. coli* abgeleitete Miniscreen-DNA (2/5 der Plasmid-DNA von 5 ml stationärer, in LB gezüchteter *E. coli*-Kultur) wurden sodann zugesetzt und vorsichtig 15 Minuten mit 100 μl der resuspendierten Zellen vermischt. Anschliessend wurde 1 ml einer Lösung mit einem Gehalt an 20 Prozent (Gew./Vol.) Polyäthylenglykol 4000 (Baker), 10 millimolar $CaCl_2$ und 10 millimolar Tris-HCl (pH-Wert 7,5) unter 15-minütigem vorsichtigem Vermischen zugesetzt. Die Zellen

wurden hierauf abzentrifugiert und vorsichtig in 200 μ l SOS (1 m Sorbit, 33,5 Prozent (Vol./Vol.) YEPD-Brühe und 6,5 millimolar CaCl_2) resuspendiert und 20 Minuten bei 30°C inkubiert. 100 μ l dieser Suspension wurden sodann auf eine Petrischale mit einem Gehalt an 20 ml Bodenagar (182 g Sorbit, 20 g Glucose, 6,7 g YNB und 30 g Difco-Agar pro 1 Liter H_2O) gebracht und mit 10 ml Deckagar von 50°C (gleiche Zusammensetzung wie das Bodenagar, aber mit 1 ml Adenin (1,2 mg/ml), 1 ml Uracil (2,4 mg/ml) und 1 ml -trp-Ausscheidgemisch (-trp drop-out mix) pro 50 ml Bodenagar bedeckt. Das -trp-Ausscheidgemisch enthält pro 100 ml H_2O folgende Aminosäuren: 0,2 g arg, 0,1 g his, 0,6 g ile, 0,6 g leu, 0,4 g lys, 0,1 g met, 0,6 g phe, 0,5 g thr. Diese Trp^+ -Selektion führt zu 10^3 bis 10^4 Hefetransformanten pro 1 mg Plasmid-DNA.

Hefepiasmid wurde aus Hefe durch Züchten von 15 ml Hefe zur stationären Phase ($A_{660} = 5-6$) in YNB+CAA (vgl. den nachstehenden Abschnitt "Stämme und Medien"), durch Sphäroplastenbildung gemäss dem vorstehenden Verfahren, durch Pelletisieren der Zellen und unter Verwendung des E. coli-Miniscreenverfahrens (ohne Lysozym) gemäss (20) erhalten.

Die Stabilität von Plasmiden in Hefe wurde durch Zellverdünnung während des selektiven Wachstums in YNB+CAA und Ausstreichen auf YEPD-Platten (nicht-selektiv) bestimmt. Nach 2-tägigem Wachstum bei 30°C wurden diese Platten auf YNB+CAA-Platten replikaplattiert (Trp^+ -Selektion). Die prozentuale Plasmidstabilität wurde folgendermassen berechnet: Anzahl der Kolonien mit nicht-selektivem Wachstum minus Anzahl der Kolonien die nicht selektiv wachsen, dividiert durch die Anzahl der Kolonien mit nicht-selektivem Wachstum, multipliziert mit 100.

Stämme und Medien

E. coli K-12 Stamm 294 (ATCC Nr. 31446) (22) wurde für sämtliche anderen bakteriellen Transformationen verwendet. Die Hefestämme

pep4-3 (20B-12, d trp1 pep4-3) (23) und GM3C-2 (α , leu 2-3, leu 2-112, trp 1-1, his 4-519, cys 1-1, cyp 3-1) (24) wurden für Hefetransformationen verwendet. Die Hefestämme 20B-12 und GM3C-2 sind ohne Beschränkungen bei der American Type Culture Collection unter den ATCC Nummern 20626 und 20625 am 5. März 1982 hinterlegt worden. Es können verschiedene Hefestämme verwendet werden; vgl. Lodder et al., The Yeasts, A Taxonomic Study, North-Holland Publ. Co., Amsterdam. In ähnlicher Weise können verschiedene Medien verwendet werden; vgl. Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents für Microbiological and Clinical Laboratory Procedures, 9. Aufl., Difco Laboratories, Inc., Detroit, Michigan (1953).

LB entsprach der Beschreibung von Miller (25) unter Zugabe von 20 μ g/ml Ampicillin (Sigma) nach Autoklavisierung und Kühlung der Medien. Die Hefe wurde auf folgenden Medien gezüchtet: YEPD mit einem Gehalt an 1 Prozent Hefeextrakt, 2 Prozent Pepton und 2 Prozent Glucose + 3 Prozent Difco-Agar. YNB+CAA mit einem Gehalt an 6,7 g Hefestickstoffbase (ohne Aminosäuren) (YNB) (Difco), 10 mg Adenin, 10 mg Uracil, 5 g Difco-Casaminsäuren (CAA), 20 g Glucose + 30 g Agar pro 1 Liter (zur Trp⁺-Selektion verwendet).

Wachstumskurve und Extrakterstellung

Einzelne Kolonien von Hefestämmen YEpIPT-preLeIF-A 53t/pep4-3 und YEpIPT-LeIF-A 1/pep4-3 wurden 7 Stunden bei 30°C in 100 ml YNB+CAA bis zu einem A₆₆₀-Wert von etwa 1,1 gezüchtet. 100 ml dieser Kulturen wurden mit YNB+CAA auf 1 Liter verdünnt, wodurch man eine Lösung mit A₆₆₀ von 0,1 erhielt. Diese 1 Liter-Kulturen wurden sodann bei 30°C gezüchtet. 10 ml Aliquotanteile wurden in regelmässigen Abständen zur Messung der optischen Dichte, der Interferonbildung und der Sekretion entnommen. Zur Bestimmung wurden die 10 ml-Aliquotanteile jeweils 15 Minuten bei 7000 U/min in einem Sorval RC3B zentrifugiert. Der Über-

stand (Medien) wurde ohne Verdünnung bestimmt. Die Zellen wurden in 0,4 ml 7 m Guanidin-HCl mit einem Gehalt an einem gleichen Volumen an Glasperlen resuspendiert und 2 Minuten bei hoher Geschwindigkeit gerührt. Das Lysat der Zellen wurde sodann in PBS/BSA (150 millimolar NaCl, 20 millimolar Natriumphosphat (pH-Wert 7,9) und 0,5 Prozent Rinderserumalbumin) zur Durchführung des Bioassay verdünnt.

Interferonbestimmungen

Die Interferonbestimmung von Hefeextrakten wurde durch Vergleich mit Interferonstandards anhand der Hemmung des cytopathischen Effekts (CPE) durchgeführt (26). Die Hefeextrakte wurden folgendermassen hergestellt: 10 ml-Kulturen wurden in YNB+CAA bis zum Erreichen von $A_{660} \sim 1-2$ gezüchtet. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 3 ml 1,2 m Sorbit, 10 millimolar KH_2PO_4 , pH-Wert 6,8 und 1 Prozent Zymolase 60 000 resuspendiert und sodann 30 Minuten bei 30°C inkubiert (bis zu 90 Prozent Seroplastenbildung). Die Sphäroplasten wurden 10 Minuten bei 3000 g pelletisiert und sodann in 150 µl 7 m Guanidin-Hydrochlorid (GHCl) + 1 millimolar Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) resuspendiert. Die Extrakte wurden unmittelbar vor der Bestimmung auf das 20- bis 100-fache in PBS/BSA-Puffer (20 millimolar NaH_2PO_4 , pH-Wert 7,4, 150 millimolar NaCl, 0,5 Prozent BSA) verdünnt. Eine andere Möglichkeit bestand darin, 10 ml Zellen mit dem gleichen A_{660} -Wert zu pelletisieren und in 0,4 ml 7 m GHCl in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (Fassungsvermögen 1,5 ml), in dem sich etwa 0,4 ml Glasperlen (0,45 bis 0,5 mm, B. Braun Melsungen AG) befanden, zu resuspendieren. Die Gefässe wurden 2 mal 2 Minuten bei höchster Geschwindigkeit gerüttelt, wobei sie sich auf Eis befanden. Die Extrakte wurden 0,5 Minuten in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert und in PBS/BSA-Puffer auf die vorstehend beschriebene Weise verdünnt. Die Bioassays wurden mit MDBK-Zellen (26) auf LeIF A, LeIF D und die Vorformen durchgeführt. Bei Hela-Zellen

(26) wurde eine Bestimmung auf IFN- γ und preIFN- γ vorgenommen.

Reinigung von (pre/D/A) LeIF A aus den Medien

Eine einzelne Kolonie des Hefestamms YEpIPT-preLeIF-A 53t/pep4-3 wurde bei 30°C in 500 ml YNB+CAA bis zu einem A_{660} -Wert von 2,4 gezüchtet. 500 ml dieser Kultur wurden mit YNB+CAA auf 5 Liter auf einen A_{660} -Wert von 0,21 verdünnt. Die erhaltene 5 Liter-Kultur wurde bei 30°C bis zu einem A_{660} -Wert von 4 gezüchtet. Dann wurde die 5 Liter-Kultur durch 10-minütige Zentrifugation bei 7000 U/min geerntet. 10 ml-Aliquotanteile wurden in regelmässigen Abständen während der Fermentation zur Messung von optischer Dichte, Interferonbildung und Sekretion entnommen. Vor der Bestimmung wurden die einzelnen Aliquotanteile 5 Minuten zur Abtrennung der Zellen von den Medien in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Das Medium und die Zellen wurden auf die vorstehend beschriebene Weise untersucht (vgl. Figuren 9, 10A und 10B).

Die Medien wurden auf ein Endvolumen von 200 ml eingeeengt und sodann gegen tris/cys/EDTA, pH-Wert 8,0, auf einer 1000 Dalton-Ultrafiltrationsmembran (O-PS, Osmonics) in einem Amicon-Dünnskanalgerät (TCF 10) diafiltriert. Das zurückgehaltene Produkt (200 ml) wurde über eine 1,5 ml-Immunoaffinitätssäule mit einem Gehalt an monoklonalem Antikörper gegen LeIF-A, kovalent gebunden an Affigel 10 (BioRad) mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 15 ml/Stunde gegeben. Mehr als 80 Prozent der Interferonaktivität der ursprünglichen Lösung waren an der Säule gebunden. Sodann wurde eine Strömungsgeschwindigkeit von 40 ml/Stunde angelegt. Nach der zweiten Anwendung befanden sich etwa 7 Prozent der ursprünglichen Interferonaktivität im durchströmenden Produkt. Die Säule wurde sodann mit 0,2 M NaCl in tris/cys/EDTA, pH-Wert 8,0 gewaschen. Etwa 1,7 Prozent der Aktivität wurde während dieses Waschvorgangs eluiert.

Der Grossteil der Interferonaktivität (etwa 50 Prozent der ursprünglichen Aktivität) wurde sodann von der Säule mit 51,5 ml entionisiertem Wasser vom pH-Wert 5,5 eluiert. Die Säule wurde schliesslich mit 22,5 ml 0,2 m Essigsäure gewaschen, um verbleibendes Protein zu eluieren. Es wurden etwa 8 Prozent der ursprünglichen Aktivität eluiert. Anschliessend an die Elution mit Essigsäure wurde die Säule mit tris/cys/EDTA, pH-Wert 8,0, wieder äquilibriert. Fraktionen von 2,25 bis 4,5 ml wurden während der Waschvorgänge mit Wasser, Essigsäure und tris/cys/EDTA aufgefangen (Fig. 11). Die Fraktionen Nr. 1 bis 7 wurden vereinigt und zur Trockne lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 200 µl 0,1-prozentiger Trifluoressigsäure (TFA), pH-Wert 2,5, gelöst und durch HPLC an einer Synchropak RP-P-Säule weiter gereinigt. Die Säule wurde mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 1 ml/min mit einem linearen Gradienten von 0 bis 100 Prozent Acetonitril in 0,1 Prozent TFA, pH-Wert 2,5, eluiert. Fraktionen von 1 ml wurden aufgefangen und auf die vorstehend beschriebene Weise nach Verdünnung in PBS/BSA untersucht. Eine gereinigte Probe von 2,5 µg IFN-A wurde zur Kontrolle auch chromatographiert (Fig. 12). Die Interferonaktivität wurde von der Säule als einzelner Peak, zentriert um Fraktion 39, eluiert. Diese Fraktion wurde zur Trockne lyophilisiert. Der Rückstand wurde der Sequenzanalyse unterzogen.

Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse beruhte auf dem Edman-Abbau (27). Die Probe wurde in den Becher eines Beckman 890B "spinning cup sequencer" gegeben. Polybrene (Poly-N,N,N¹N¹-tetramethyl-N-trimethylenhexamethyldiammoniumdiacetat) wurde als Träger im Becher verwendet (28). Das Sequenziergerät wurde mit einer Kältefalle und einigen Programmänderungen zur Verminderung von Hintergrundpeaks modifiziert. Als Reagentien (Beckman-Reagentien für

Sequenzierzwecke) wurden 0,1 m Quadrolpuffer, Phenylisothiocyanat und Heptafluorbuttersäure verwendet.

Eine Modifikation betraf auch die automatische Umwandlung der 2-Anilino-5-thiazolinonderivate in der aus dem Sequenziergerät extrahierten Form. Das 1-Chlorbutan wurde in einem Pierce Reacti-Vial gesammelt und unter Stickstoff getrocknet. Anschliessend wurde 25-prozentige Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser zum 2-Anilino-5-thiazolinon gegeben. Zu dessen Umwandlung in das 3-Phenyl-2-thiohydantoin (PTH-Derivat) wurde 10 Minuten auf 20°C erwärmt. Der PTH-Aminosäurerest wurde sodann automatisch in 50-prozentigem Acetonitril in Wasser gelöst und in einen Hochdruck-Flüssigkeitschromatographen umgekehrter Phase injiziert. Jede PTH-Aminosäure wurde sodann durch Vergleich mit den Retentionszeiten eines Standardgemisches, das in die Konversionsampulle eingeführt und gemäss einem Zyklus des Sequenziergeräts behandelt wurde, identifiziert. Die Ergebnisse sind in Fig. 13 zusammengestellt und nachstehend erläutert.

Western-Blottingverfahren

Die Proteine wurden zuerst der Elektrophorese an einem Polyacrylamidplattengel in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (46,47) unterworfen, dann elektrophoretisch auf Nitrocellulosepapier (S + S BA 85) übertragen und sodann immunologisch auf HGH identifiziert. Die Transfervorrichtung (Elektroblot, E.C. Apparatus Corp., St. Petersburg, FL.) wurde nach kurzem Waschen des Gels und des Nitrocellulosepapiers mit einem Transferpuffer mit einem Gehalt an 25 millimolar Tris, 192 millimolar Glycin, pH-Wert 8,4, zusammengebaut. Die Übertragung wurde 1 1/2 Stunden bei 400 mA durchgeführt, wonach der Blot in 50 millimolar Tris, pH-Wert 7,4, 0,15 m NaCl, 5 millimolar EDTA, 0,25 Prozent Gelatine (Gew./Vol.), 0,05 Prozent NP-40 gebracht wurde und mässig über Nacht bewegt wurde. Eine ent-

sprechende Verdünnung von Kaninchen-anti-human-HGH-Antiserum wurde mit dem Blot und NP-40/Gelatinepuffer (typischerweise $100 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) in einen Kunststoffbeutel gebracht und 2 Stunden unter mässigem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Der Blot wurde kurz mit H_2O_2 und anschliessend 1 Stunde mit NP-40/Gelatine gewaschen und mit ^{125}J Protein A (New England Nuclear) das in NP-40/Gelatinepuffer verdünnt war, markiert, wobei es 1 Stunde bei Raumtemperatur unter mässigem Schwenken in einem Kunststoffbeutel belassen wurde. Nach mehrmaligem Waschen mit H_2O wurde der Blot in Cellophan eingehüllt und über Nacht in eine Kassette mit X-Omat-AR-Film (Kodak) mit einem Verstärkungsfilter bei -70°C belassen.

Gelfärbung

Polyacrylamidgele mit einem Gehalt an Protein wurden gemäss dem Verfahren von Oakley et al., (41) gefärbt.

Sekretionssignalsequenzen von Säugetier-Interferongen

Aufgrund der kürzlich erfolgten Isolierung von cDNAs mit einem Gehalt an Genen für Leukozyten (7), Fibroblasten (10) und Immuninterferonen (30) - der jüngsten Entwicklung von Hefe als Expressionssystem für heterologe Gene (14) - , wurde es möglich, die Expression von heterologen Genen mit einem Gehalt an kodierenden Bereichen für Signalpeptidsequenzen in Hefe zu testen.

Fig. 1 zeigt die Signalsequenzen für 5 verschiedene Interferone. Diese aminoterminalen Sequenzen erleichtern vermutlich die Sekretion von Interferonproteinen aus Säugetierzellen. Während des Verfahrens wird die Signalsequenz durch spezifische Proteasespaltung zwischen der Position -1 und +1 entfernt, wodurch man das als reife Form von Interferon bekannte Produkt erhält. Diese Sequenzen haben allgemeine Eigenschaften von anderen Sekretionssignalsequenzen (31). Sie sind alle sehr

hydrophob, haben etwa die gleiche Länge wie andere Signale und weisen eine kleine Aminosäure links von der Spaltungsstelle auf. Obgleich preLeIFA, preLeIFD und preIFN- γ alle zwischen Glycin und Cystein spalten, stellt dies keine allgemeine Regel für andere Säugetiersignale dar, wie durch preIFN- β belegt.

Tatsächlich gibt es unter verschiedenen Organismen oder innerhalb des gleichen Organismus keine übereinstimmende Signalsequenz. Es gibt auch keine übereinstimmende Sequenz an der Spaltungsstelle zwischen der Signalsequenz und der reifen Form des Proteinprodukts.

Daher war es sehr interessant, die Expression dieser Präinterferone in Hefe zu untersuchen und festzustellen, ob diese heterologen Proteine aus Hefe sekretiert werden und wie der Processingvorgang bei diesen Proteinen beschaffen ist. Obgleich Hefe ein eukaryontischer Organismus ist wie Säugetierzellen und obgleich Hefe offensichtlich einen Sekretionsweg aufweist, der in vielerlei Hinsicht höheren Eukarionten entspricht (1, 32) handelt es sich um einen sehr primitiven Eukarionten, so dass die richtige Funktion und der Processingvorgang dieser Genprodukte eine weitgehende Konservierung des Prozesses zwischen Hefezellen und Säugetierzellen während der Evolution, deren Ergebnisse keinesfalls offensichtlich sind, erforderlich machen würde.

Aufbau eines Hefepiasmids zur Expression der Präinterferongene

Informationen über den Aufbau eines Plasmids für die Expression eines heterologen Gens in Hefe wurden veröffentlicht (14).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Plasmid ist in Fig. 2 dargestellt. Dieses Plasmid enthält einen Teil von pBR322 (33) mit dem Ampicillinresistenz-(Ap^R)-Gen und dem E. coli-Ursprung

(origin) der Replikation für Selektion und stabiles Wachstum in *E. coli* (als Zwischenprodukt zwischen dem in vitro-Aufbau und der Transformation von Hefe verwendet). Das Plasmid enthält auch das TRP1-Gen an einem EcoRI-bis PstI-Fragment, das vom Chromosom III von Hefe stammt (34-36). Dieses Gen erlaubt eine Selektion in *trp1*⁻-Hefe und kann somit zur Isolation von Hefezellen mit einem Gehalt des Plasmids und zur Aufrechterhaltung des Plasmids verwendet werden. Ferner enthält das Plasmid eine Hefe-Ursprungsstelle an einem 2,0 kbp-Fragment von endogener Hefe-2 μ -Plasmid-DNA (37). Dieser Ursprung erlaubt eine autonome Replikation der DNA in Hefe und die Aufrechterhaltung als Plasmid.

Die andere Hauptkomponente des Systems ist das Hefe-3-Phosphoglycerat-kinase- (PGK)-Promotorfragment, das von der Transkription nahe der einzigen EcoRI-Stelle im Plasmid stammt (die andere EcoRI-Stelle wurde durch Auffüllen der Restriktionsstelle unter Verwendung von *E. coli*-DNA-Polymerase I (Klenow) unter anschließender Ligation des stumpfen Endes entfernt).

Die Isolierung des 3-Phosphoglycerat-kinase- (PGK)-Gens wurde bereits früher erörtert (37a) wie auch der Aufbau des 1,6 kbp-Promotorfragments (vgl. unten). Ein Hind III/Bgl II-Fragment vom Hefe-TRP 1-Genbereich (34-36) von Chromosom III wurde als Konverter von Hind III bis Bgl II zur Ligation mit der Bam HI-Stelle von pBR322 verwendet, um das Plasmid gegen Tetracyclin empfindlich (Tc^S) zu machen. Ferner ist zu erwähnen, dass das 2,0 kbp-Fragment von 2 μ -DNA eine andere Funktion insoweit ausübt, als es ein Transkriptions-Terminations/Polyadenylierungssignal enthält, das normalerweise das Terminationssignal für das "Able"-Gen im 2 μ -Plasmid darstellt (37). Ein derartiger Bereich scheint für eine gute Expression wesentlich zu sein. Geninserts von EcoRI-Fragmenten in der richtigen

Orientierung können als Protein exprimiert werden, wenn der Vektor in Hefe gebracht wird.

Aufbau von Hefepiasmiden für die Expression von verschiedenen Interferongen

Das Hefeexpressionsplasmid YEpIPT enthält eine einzige EcoRI-Restriktionsstelle. Eine Insertion eines fremden Gens in diese einzige EcoRI-Stelle führt zur Expression dieses Gens unter der Kontrolle von Hefe-Phosphoglycerat-kinase- (PGK)-Promotor. Ein zweckmässiger Weg zur Insertion der verschiedenen Interferogene in die EcoRI-Stelle dieses Hefeplasמידs besteht in der Bereitstellung von DNA-Fragmenten mit EcoRI-Stellen, die das Initiationskodon und das Terminationskodon der verschiedenen Interferogene flankieren. Hier wird der Aufbau von derartigen EcoRI-Fragmenten für die Expression von Interferongen beschrieben. Es ist wichtig, Konverter für EcoRI am 3'-Ende des Gens zu verwenden, so dass diese nicht die Transkription beenden, sondern eine Transkription bis zum 2 μ -Terminator ermöglichen.

Der Aufbau einer EcoRI-Stelle unmittelbar vor dem ATG-Initiationskodon für reifes IFN- α 1-Gen (14, 17), reifes IFN- α 2-Gen (7), reifes IFN- β -Gen (10) und reifes IFN- γ -Gen (30) wurde beschrieben.

Die DNA-Restriktionsanalyse zeigt, dass eine EcoRI-Stelle vorhanden ist, die zweckmässigerweise im 3'-nicht-kodierenden Bereich des cDNA-Klons von IFN- α 1 liegt (8), so dass eine Verdauung des Plasmids pLeIFD3 (17) mit EcoRI ein 583 bp-EcoRI-Fragment erzeugt, das das gesamte IFN- α 1-Gen enthält.

Fig. 3 zeigt den Aufbau eines EcoRI-Fragments mit einem Gehalt am pre-IFN- α 1-Gen. Eine HaeIII-Stelle befindet sich zwischen der ersten und zweiten Aminosäure von pre-IFN- α 1 (8).

Ein partiell mit HaeIII verdautes 254 bp-Fragment, das sich von dieser HaeIII-Stelle zur BglII-Stelle in der Mitte des kodierenden Bereichs erstreckt, wurde isoliert. Ein selbst-komplementäres synthetisches Oligonucleotid 5'-CCATGAATTCATGG-3' wurde stumpfend mit dem 254 bp-HaeIII-BglII-Fragment ligiert, um eine EcoRI-Stelle vor dem ATG-Initiationskodon zu erzeugen. Ein 264 bp-EcoRI-BglII-Fragment wurde dann durch Verdauen des Ligationsgemisches mit EcoRI und BglII isoliert. Dieses EcoRI-BglII-Fragment, das die Fronthälfte des preIFN- α 1-Gens enthält, wurde sodann mit der rückwärtigen Hälfte des pre-IFN- α 1-Gens, einem 372 bp-BglII-EcoRI-Fragment, isoliert nach Verdauung des IFN- α 1-cDNA-Klons mit BglII und EcoRI, verknüpft. Das EcoRI-Fragment, das das gesamte pre-IFN- α 1-Gen enthält, wurde sodann durch Verdauen des Ligationsgemisches mit EcoRI und Isolieren eines 636 bp-Fragments erzeugt.

Fig. 4 zeigt den Aufbau eines EcoRI-Fragments mit einem Gehalt an reifem IFN- α 2-Gen. Ein 876 bp-EcoRI-PstI-Fragment, das das reife IFN- α 2-Gen mit einer EcoRI-Stelle unmittelbar vor dem ATG-Initiationskodon und mit 400 bp des 3'-nicht-kodierenden, vom cDNA-Klon abgeleiteten Bereich enthält, wurde durch Verdauen des Plasmids pLeIFA25 (7) mit EcoRI und PstI isoliert. Das PstI-Ende dieses 876 bp-Fragments wurde sodann unter Verwendung eines Adaptorfragments in eine EcoRI-Stelle verwandelt. Dieses 978 bp-Adaptorfragment enthält eine interne EcoRI-Stelle und weist an beiden Enden PstI-Stellen auf. 230 bp dieses Fragments, das sich von einem Pst-Ende zur EcoRI-Stelle erstreckt, leiten sich vom Hefeplasmid 2 μ -DNA ab (37). 748 bp des Fragmentrestes, der sich von der EcoRI-Stelle zum anderen PstI-Ende erstreckt, leiten sich vom bakteriellen Plasmid pBR322 ab (Das gesamte Fragment ist von YEp13 abgeleitet (37b)). Eine Ligation dieses Adaptorfragments an das 876 bp-EcoRI-PstI-Fragment, das das reife IFN- α 2-Gen enthält, unter anschließender Verdauung mit EcoRI ergibt ein 1096 bp-Fragment, das das reife IFN- α 2-Gen mit EcoRI-Stellen an beiden Enden enthält.

Fig. 5 zeigt den Aufbau eines EcoRI-Fragments, das das pre-IFN- α 2-Gen enthält. Die Restriktionsanalyse ergibt eine gemeinsame DdeI-Stelle, die zwischen der 14. und 15. Aminosäure in der Präsequenz beider pre-IFN- α 1- und α 2-Gene vorhanden ist. Eine Ligation des 44 bp-EcoRI-DdeI-Fragments, das vom das pre-IFN- α 1-Gen kodierenden EcoRI-Fragment abgeleitet ist, mit dem 900 bp-DdeI-PstI-Fragment, das vom cDNA-Klon von IFN- α 2 abgeleitet ist, unter anschließender Verdauung mit EcoRI und PstI ergibt ein 944-Fragment. Dieses 944 bp-EcoRI-PstI-Fragment enthält die kodierende Sequenz für die ersten 14 Aminosäuren im von IFN- α 1 abgeleiteten Präpeptid, die kodierende Sequenz des restlichen Präpeptids und des gesamten, reifen, von IFN- α 2 abgeleiteten Proteins. Das PstI-Ende dieses 944 bp-Fragments wurde sodann unter Verwendung des Adaptorfragments wie im Fall des Aufbaus eines EcoRI-Fragments für reifes IFN- α 2 in eine EcoRI-Stelle umgewandelt.

Fig. 6 zeigt den Aufbau eines EcoRI-Fragments, das das pre-IFN- γ -Gen mit einer 70 bp-Anfangssequenz (leader sequence), die dem Initiationskodon ATG vorausgeht, enthält. Durch Digestion (Verdauung) des IFN- γ -cDNA-Klons (30) erzeugt man ein 842 bp-Sau3A-Fragment mit 60 bp der 5'-flankierenden Sequenz, der gesamten kodierenden Sequenz von pre-IFN- γ und 290 bp der 3'-nicht-kodierenden Sequenz. Dieses Sau3A-Fragment wurde sodann in einen mit BamHI verdauten Vektor pUC7, einem Plasmid-gegenstück der einsträngigen Phage M13mp⁷ (38), geklont. Das Plasmid pUC7 wurde von pBR322 abgeleitet, indem man zunächst das 2067 bp-EcoRI-PvuII-Fragment, das das Tetracyclinresistenzgen enthält, entfernte und dann ein 425 bp-HaeII-Fragment vom Phagen-M13-Derivat mp7 (38) in die HaeII-Stelle des erhaltenen Plasmids in Position 2352 (bezogen auf die pBR322-Zählung) einsetzte. Das HaeII-Fragment von mp7 enthält den N-terminalen kodierenden Bereich des E. coli-lacZ-Gens, in das eine Multi-restriktionsenzym-Klonierungsstelle der Sequenz zwischen die 4. und 5. Aminosäurereste von β -Galactosidase eingesetzt wurde.

Die Insertion eines fremden DNA-Fragments in diese klonierenden Stellen unterbricht die Kontinuität zwischen dem lac-Promotor und dem lacZ-Gen, wodurch der Phenotyp von JM83, das mit dem Plasmid von lac⁺ zu lac⁻ transformiert ist, verändert wird. Da 2 EcoRI-Stellen als Flanken der BamHI-Stellen in der Multi-restriktionsklonierungsstelle von pUC7 vorhanden sind, würde eine Digestion des das 842 bp-Sau3A-Inserts enthaltenden Plasmids mit EcoRI ein 862 bp-Fragment ergeben, das die gesamte pre-IFN- γ -Sequenz flankiert durch EcoRI-Stellen enthält.

Eine Digestion des Plasmids pIFN- γ trp48 (30) mit EcoRI und BglI erzeugt ein 689 bp-Fragment mit einem dem ATG-Initiationskodon vorausgehenden EcoRI-Ende, die gesamte kodierende Sequenz von reifem IFN- γ und 210 bp der nicht-kodierenden Sequenz. Das BglI-Ende wurde sodann in ein EcoRI-Ende umgewandelt, indem es der Ligation mit einem 29 bp-BglI-EcoRI-Adaptor, der vom vorstehend beschriebenen pre-IFN- γ -EcoRI-Fragment abgeleitet war, unterworfen wurde. Eine anschliessende Digestion des Ligationsgemisches mit EcoRI ergibt sodann ein 718 bp-EcoRI-Fragment mit einem Gehalt an reifem IFN- γ -Gen.

Fig. 7 zeigt den Aufbau eines EcoRI-Fragments, das das pre-IFN- γ -Gen mit einem EcoRI-Ende und die dem ATG-Initiationskodon vorausgehende Sequenz AAA enthält. Das EcoRI-Fragment, das das vorstehende pre-IFN- γ -Gen enthält, wurde mit EcoRI und MboII verdaut, um ein 184 bp-Fragment zu erzeugen. Dieses Fragment, das den Frontteil des pre-IFN- γ -Gens enthält, wurde wärmedenaturiert und mit einem 5'-kinasebehandelten synthetischen Oligonucleotid 5'-pATGAAATATACA, das die ersten 4 Aminosäuren des pre-IFN- γ -Gens kodiert, verschweißt (10). Mit dem Bodenstrang des EcoRI-MboII-Fragments, der Schablone und dem Oligonucleotid als Primer, wurde das Klenow-Fragment von E. coli-DNA-Polymerase zur Synthese des Kopfstranges und zur Entfernung des 3'-vorstehenden Endes vom Bodenstrang verwendet.

Das erhaltene 178 bp-stumpfbändige Fragment, das sich vom ATG-Initiationskodon zur ersten weiter unten gelegenen MboII-Stelle erstreckt, wurde sodann mit einem selbst-komplementären 5'-TTTGAATTCAAA-3'-EcoRI-Linker verknüpft. Durch Digestion des Ligationsgemisches mit EcoRI und DdeI erhält man ein 165 bp-EcoRI-DdeI-Fragment, das den Frontteil des pre-IFN- γ -Gens enthält. Das gesamte Gen wurde dann zusammengebaut, indem man das 600 bp-DdeI-EcoRI-Fragment, das den rückwärtigen Teil des IFN- γ -Gens enthält, und den 3'-nicht-kodierenden Bereich verknüpfte. Das Ligationsgemisch wurde sodann mit EcoRI verdaut, wodurch ein 765 bp-EcoRI-Fragment, das das gesamte pre-IFN- γ -Gen enthält, entstand. Eine Zusammenfassung sämtlicher dieser EcoRI-Fragmentbauteile (I bis IX) ist in Fig. 8 gegeben. Alle diese Bauteile wurden für Expressions- und Sekretionsversuche unter Verwendung von Hefe in den Vektor YEpIPT (Fig. 2) gebracht.

Expression und Sekretion von Interferonen durch Hefe mit einem Gehalt an diesen Plasmiden

Nachdem die EcoRI-Fragmentgene von Fig. 8 in YEpIPT (Fig. 2) gebracht , auf ihre Orientierung geprüft und unter Verwendung von Trp⁺-Komplementierung in Hefe eingeführt waren, wurden die diese Plasmide enthaltenden Hefen auf Interferon untersucht, wobei der Test aufgrund des zytopathischen Effekts (CPE) (26) (Bioassay) an Extrakten, freigesetztem Zellwandmaterial und Medien angewandt wurde. Die Interferontests wurden in drei unterschiedlichen Bereichen der Hefekultur durchgeführt. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I

Interferonexpressionsgrad

Genbauteil Nr.	YEipT-Plasmid mit einem Gehalt an diesen EcoRI- Fragmenten	Hefe	Innerhalb ^a der Zellen U/Lit./A ₆₆₀ =1	Prozent ^b Zell- protein	freigesetzt nach Zellwand- entfernung ^c (U/Lit./A ₆₆₀)
I	LeIF D	GM3C-2	130x10 ⁶	1,0	0
II	pre LeIF D	GM3C-2	27x10 ⁶	0,3	0,4x10 ⁶
III	LeIF A	pep4-3	130x10 ⁶	1,0	0
IV	(pre D/A) LeIF A	pep4-3	19x10 ⁶	0,2	0,5x10 ⁶
IV	(pre D/A) LeIF A	pep4-3	25x10 ⁶	0,3	N.D.
IV	(pre D/A) LeIF A	GM3C-2	28x10 ⁶	0,3	0,3x10 ⁶
V	IFN- γ	pep4-3	0,6x10 ⁶	N.D.	N.D.
VI	pre IFN- γ + cDNA				
VI	5' flankierende Sequ.	pep4-3	0,2x10 ⁶	N.D.	N.D.
VI	pre IFN- γ + cDNA				
VII	5' flank. Sequenz	GM3C-2	0,38x10 ⁶	N.D.	N.D.
VII	pre IFN- γ	pep4-3	0,9x10 ⁶	N.D.	N.D.
VII	pre IFN- γ	GM3C-2	1,9x10 ⁶	N.D.	N.D.

- a) Vgl. Verfahren zur Extrakterstellung. 2 Verfahren wurden für die Extrakte verwendet. Bei sphäroplastischen Zellen handelt es sich beim Anteil "innerhalb der Zellen" tatsächlich um Innenmaterial; wenn jedoch N.D. (= nicht bestimmt) angegeben ist, so sind sowohl der Anteil "innerhalb der Zellen" als auch der nach "Freisetzung der Zellwandentfernung" erhaltene Anteil jeweils Teil der Menge "innerhalb der Zellen". Bei diesem Extraktionstyp werden die Zellen ohne Zellwandentfernung mit Glasperlen behandelt. Es ist zu beachten, dass Extrakte mit Glasperlen ohne Sphäroplastentfernung immer für IFN- γ und preIFN- γ durchgeführt wurden und dass PBS-Puffer anstelle von 7 m GHCl verwendet wurde.
- b) Die spezifischen Aktivitäten von LeIFA und LeIFD wurden für die Berechnungen zu 10⁸ U/mg Protein angenommen. Eine Hefekultur enthält bei A₆₆₀ = 1 etwa 100 mg Protein in der Kultur.
- c) Siehe Verfahren zur Sphäroplastentfernung.

Tabelle I (Forts.)

Genbauteil Nr.	Prozent Zell- protein	außerhalb der Zellen (Medien) U/Lit./A ₆₆₀	Prozent Zell- protein	endgültiger ^d A ₆₆₀ -Wert	Prozent der sekretierten Aktivität
I	0	0	0	1,0	0
II	0,004	0,8x10 ⁶	0,008	1,4	4
III	0	0	0	1,0	0
IV	0,005	0,5x10 ⁶	0,005	1,0	6
IV	---	2x10 ⁶	0,007	3-4	8
IV	0,003	0,5x10 ⁶	0,005	1,3	3
V	---	0	0	1,0	0
VI	---	0,03x10 ⁶	N.D.	1,2	15
VII	---	0,06x10 ⁶	N.D.	0,93	16
VII	---	0,19x10 ⁶	N.D.	1,0	17
VII	---	0,19x10 ⁶	N.D.	0,93	10

d) Absorption der Kultur, die bestimmt wurde.

e) Bei der prozentualen Sekretion handelt es sich um den "nach Zellwandentfernung freigesetzten" Prozentsatz plus dem Prozentsatz "außerhalb der Zellen". Wenn keine Sphäroplastenbildung durchgeführt wurde, schliesst der "Prozentsatz der sekretierten Aktivität" nicht die Zellwandsekretionsaktivität ein, so dass der Prozentsatz niedriger ist (möglicherweise 1/2), als er tatsächlich sein sollte.

Der erste Bereich ist innerhalb der Zelle. Diese Fraktion wird gemessen, indem man nach Entfernen der Zellwand einen Zell-extrakt herstellt und die nicht-sekretierte Interferonaktivität bestimmt. Bei den anderen Bereichen handelt es sich um die Medien (von Hefezellen vollständig abgetrenntes Material) und die von den Zellen nach Zellwandentfernung unter Verwendung von Zymolase freigesetzte Aktivität (sekretiertes, aber nicht-kovalent in der Zellwand festgehaltenes Material). Die Medien-fraktion und die nach Entfernung der Zellwand freigesetzte Fraktion stellen das gesamte sekretierte Material dar. Werden die Zellwände nicht entfernt (vgl. Methoden) so umfasst die Aktivität innerhalb der Zellen auch die sekretierte Aktivität, die an den Zellwänden haftet.

Es ist festzuhalten, dass in Tabelle I (pre D/A) LeIFA ein reifes LeIFA-Gen mit einer hybriden Signalpeptidsequenz (vgl. Fig. 1 und 8) ist. Dieser Aufbau wurde früher erörtert; zusammenfassend wird darauf hingewiesen, dass er unter Verwendung der DdeI-Restriktionsstelle, die sowohl preLeIFD und preLeIFA gemeinsam ist, aufgebaut wurde. Fig. 1 zeigt diese DdeI-Stelle an der Aminosäure-10. Die unterstrichenen Aminosäuren zeigen die Unterschiede zwischen der Aminosäuresequenz von preLeIFD und preLeIFA. Das Hybrid (pre D/A) LeIFA entspricht mehr preD als preA.

Reife LeIFA- und LeIFD-Gene (Bauteile I und III) werden in der Hefe in Konzentrationen von 1,0 Prozent des gesamten Zellproteins exprimiert (Konzentrationen von 2,0 Prozent wurden ebenfalls beobachtet). Die falschen Orientierungen dieser Gene oder die pre-Gene exprimieren nicht. Für diese beiden Gene sowie für das reife IFN- α -Gen erfolgt keine Sekretion.

Werden jedoch Präsequenzen an diesen Genen verwendet, so finden sich alle drei Proteinprodukte in den Medien als sekretierte

Produkte. Konzentrationen in der Höhe von 8 Prozent der Gesamtaktivität wurden in Medien von (pre D/A) LeIFA bei $A_{660} = 3-4$ beobachtet. Es ist festzuhalten, dass alle diese Plasmide in 95 Prozent der Zellen einer Kultur, die unter Trp^+ -selektivem Druck gezüchtet werden, vorhanden sind, was die Anwesenheit eines autonomen Replikationsplasmids bestätigt.

Wachstumskurve und Produktion in den Medien durch Hefe, die das (pre D/A)LeIFA-Gen enthält

Zwei Interferon bildende Hefen wurden zur weiteren Charakterisierung untersucht. Es handelte sich um YEp1PT-preLeIFA53t/pep4-3 und YEp1PT-LeIFA1/pep4-3. Die erste enthält 2 Kopien des Bauteils IV (Fig. 8) in der EcoRI-Stelle von YEp1PT und führt zu Aktivität innerhalb der Zelle, in der Zellwand und ausserhalb der Zelle (Medien). Dieses Zweikopiengen (in Tandemstellung- beide in Orientierung für geeignete Expression), das das Plasmid enthält, wurde anstelle des Einzelkopiebauteils verwendet, da es in den Medien gelegentlich zu höheren Interferonaktivitäten führt. Pep 4-3-Hefe wurde verwendet, da sie stark verringerte intrazelluläre und extrazelluläre Proteaseaktivitäten aufweist (23), was von Vorteil für die Bildung von nicht-abgebautem Protein (Interferon) aus den Medien sein kann.

Die letztgenannte Hefe enthält das Bauteil III (Fig. 8) in YEp1PT und exprimiert reifes LeIFA innerhalb der Zellen, sekretiert aber nicht.

Fig. 9 erläutert eine Wachstumskurve dieser beiden Hefestämme in YNB+CAA (Trp^+ -selektives Wachstum). Die logarithmische Phase setzt sich bis zu einer Absorption bei 660 μm von 3-4 fort. Dann beginnt die stationäre Phase. Beide Kurven sind im wesentlichen identisch, was darauf schliessen lässt, dass die Bildung der beiden unterschiedlichen Proteine $\overline{\text{LeIFA}}$ und (pre D/A) LeIFA das Wachstum oder die Lebensfähigkeit der Hefe

nicht beeinflusst. Bioassays wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während des Zellwachstums an den Medien durchgeführt, um die Abhängigkeit der Wachstumskurve von der Interferonbildung in den Medien durch diese beiden Stämme zu untersuchen. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die Präsequenz an LeIFA eine Freisetzung von Interferonaktivität in die Medien verursacht. Ohne diese Sequenz wird im wesentlichen keine Aktivität freigesetzt. Es ergibt sich auch, dass die Aktivitätsspiegel in den Medien nahe der stationären Phase ein Maximum erreichen.

Reinigung von (pre D/A) LeIFA aus den Medien

Um die Natur des Sekretionsverfahrens für (pre D/A) LeIFA in Hefemedien zu bestimmen, war es erforderlich, das Proteinprodukt aus den Medien zu reinigen. Ist Hefe zur Sekretion des Proteins in der Lage, so schneidet sie vermutlich während des Sekretionsverfahrens das aminoterminal Ende irgendwie ab, wie es bei Säugetierzellen normalerweise mit pre-Interferonprotein der Fall ist. Um die Natur dieses Processings zu bestimmen, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

A) 5 Liter-Fermentation

Fig. 10A zeigt die Interferonaktivität innerhalb der Zellwand und in der Zelle während des gleichen Fermentationsvorgangs. Diese Extraktionsschritte wurden durch Pelletisieren unter anschließender Behandlung mit Glasperlen in 7 M GHCl durchgeführt, so dass die Aktivität sowohl das intrazelluläre als auch das innerhalb der Zellwand befindliche Material umfasst. Diese Aktivität umfasst bei $A_{660 \mu m}$ von 1,5 bis 2,0 ein Maximum von etwa 25×10^6 U/Liter, was darauf schliessen lässt, dass die intrazelluläre Interferonbildung anders wie beim extrazellulären Material in der logarithmischen Phase vor Erreichen der stationären Phase endet. Somit werden etwa 8 Prozent der Aktivität frei in die Medien sekretiert. Jedoch kann sich auch hier wieder ebenso viel Aktivität in der Zellwand befinden

(vgl. Tabelle I). Die Extraktmaterialien enthalten den Gross-
teil des intrazellulären Interferons. Dieses Material wird
zur Zeit gereinigt, um festzustellen, ob es einem Processing
unterworfen worden ist oder nicht.

Fig. 10B zeigt eine Wachstumskurve für eine 5 Liter-Fermenta-
tion von YEp1PT-preLeIFA 53t/pep4-3 in YNB+CAA. Am Ende der
Fermentation findet man durch MDBK-Tests eine Interferonaktivi-
tät von etwa $2,0 \times 10^6$ U/Liter. Wiederum wird die maximale
Bildung in der stationären Phase festgestellt. Es ist festzu-
halten, dass das Interferonprodukt in diesen Medien sehr sta-
bil ist, selbst wenn nach Erreichen der stationären Phase noch
weitere 24 Stunden bei 30°C geschüttelt wird. Diese Medien
werden für weitere Reinigungsschritte eingesetzt.

B) Medienkonzentrat auf Immunoaffinitätssäule

Die Medien von YEp1PT-preLeIFA53t/pep4-3 wurden zunächst ultra-
filtriert. Das Konzentrat wurde auf eine Säule mit einem Ge-
halt an einem monoklonalen Antikörper gegen reifes LeIFA auf-
gesetzt. Nach Waschen mit 0,2 m NaCl in tris/cys/EDTA, pH-Wert
8,0 wurde das Interferon mit H_2O (pH-Wert 5,5), wie in Fig.
11 gezeigt, eluiert. Der eluierte Peak A (der Pfeil bedeutet
das Aufsetzen von H_2O) wurde dabei erhalten. Er repräsentiert
50 Prozent der auf die Säule aufgesetzten Aktivität. Der Peak
A wurde vereinigt, wie durch die Klammer angegeben ist, und
für die weitere Reinigung eingesetzt. Durch Elution mit 0,2 m
Essigsäure erhielt man den Peak B (der Pfeil bedeutet die
Stelle des Pufferwechsels). Die Stelle C gibt den Punkt an,
an dem der ursprüngliche Waschpuffer angewendet wurde.

C) HPLC-Untersuchung der Aktivität von Peak A

Die dem Peak A entsprechenden Fraktionen wurden zur Trockne
lyophilisiert und anschliessend mittels HPLC (vgl. Methoden)

untersucht. Fig. 12 erläutert die Ergebnisse dieses Versuchs. Eine 2,5 µg-Probe von gereinigtem LeIFA (aus E. coli) wurde dann separat zur Kontrolle eingesetzt. Sowohl der Standard als auch (pre D/A) LeIFA (oder preLeIF A) weisen identische Retentionszeiten auf, wie aus der Figur hervorgeht. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Interferon aus diesen Medien dem Processing unterworfen ist, da preLeIF A eine stark abweichende Retentionszeit aufweist. Die punktierte Fraktion dieses HPLC-Versuchs wurde sodann für die Proteinsequenzierung verwendet.

NH₂-terminale Sequenz von (pre D/A) LeIF A, gereinigt aus Hefemedien

Fig. 13 zeigt teilweise die Ergebnisse der Sequenzierung des gereinigten Interferons. Die obere Sequenz ist die für (pre D/A) LeIF A erwartete Sequenz, wenn kein Processing erfolgt. Die normale Spaltungsstelle dieses Interferons, die vermutlich durch Säugetierzellen erkannt wird, ist gezeigt.

Die Proteinsequenz wurde interpretiert, indem man die PTH-Aminosäure, die bei jedem korrespondierenden Edman-Zyklus zunahm und im folgenden Zyklus abnahm, feststellte. PTH-Aminosäuren, die normalerweise geringe Ausbeuten ergeben (cys, ser, thr, arg, his) wurden angenommen, wenn kein Anstieg der anderen PTH-Aminosäuren festgestellt wurde. Die Menge in mg wurde ermittelt, indem man die Flächen des interpretierten Restes mit der Fläche eines Standardgemisches von PTH-Aminosäuren, die dem gleichen HPLC-Versuch unterworfen wurden, verglich. Ein interner Standard von Norleucin wurde in jedes Chromatogramm eingeführt, um festzustellen, dass die Retentionszeiten reproduzierbar waren.

Fig. 13 zeigt die Ergebnisse der Proteinsequenzierung für gereinigtes (pre D/A) LeIF A. Die zu erwartende Sequenz, wenn kein Processing erfolgte, und die normale Spaltungsstelle dieses Präinterferons in Säugetierzellen sind ebenfalls angegeben.

Zwei unabhängige Sequenzuntersuchungen wurden an zwei unterschiedlichen, aus Zellen und Medien gereinigten Proben durchgeführt. Fig. 13 zeigt, dass der Grossteil des Interferons im Medium sauber abgeschnitten ist (64 Prozent), dass aber auch eine andere Form (36 Prozent) vorhanden ist, die 3 zusätzliche Präsequenzamino-säuren enthielt. Das intrazelluläre Interferon enthielt ebenfalls diese beiden Formen, aber in geringfügig abweichenden Mengenverhältnissen, sowie ferner eine dritte Form mit einem Gehalt an 8 Präsequenzamino-säuren. Die volle Präsequenzlänge wurde nie beobachtet, was darauf schliessen lässt, dass Hefe das gesamte pre-IFN in gleicher Weise abschneidet.

Es ist möglich, dass die dem Processing unterworfenen Form, die 3 Präsequenzamino-säuren enthält, auf die Hybridnatur der pre D/A-Signalsequenz zurückzuführen ist. Daher wurde auch das Processing von nicht-hybridem (pre D) LeIF D untersucht. Pre D unterscheidet sich von pre D/A nur in der Aminosäurestellung -2 (leu anstelle von val). Bei Untersuchung des Processings bei aus dem Medium gereinigten pre IFN- α 1 wurden wieder sowohl die +1 als auch -3-Formen beobachtet (Fig. 13). Jedoch war im Medium auch eine untergeordnete Spezies als -14-Form vorhanden, die für (pre D/A) LeIF A nicht beobachtet wurde.

Um die Sekretion von heterologen Proteinen aus *S. cerevisiae* zu untersuchen, wurden Plasmide für die in vivo-Transkription der Gene für verschiedene reife Interferone (IFNs) und verschiedene pre IFNs aufgebaut. Immer wenn die kodierenden Sequenzen für hydrophobe Signalpeptide vorhanden waren, konnte IFN-antivirale Aktivität aus den Wirtszellen und dem Kulturmedium gewonnen werden, während das gesamte IFN, dessen Synthese durch reife IFN-Gene dirigiert wurde, innerhalb der Zellen verblieb. Es wurde versucht, die Erfordernisse für die Sekretion durch Bereitstellung von Bauteilen zu untersuchen,

bei denen das Interferon mit seinen eigenen natürlichen Signalsequenzen, wie in (pre D) LeIF D, oder mit einer Hybrid-signal-frequenz, bezeichnet als eine Zusammensetzung von 2 IFN- α -Spezies, wie in (pre D/A) LeIF A, versehen wurde. Während im allgemeinen die Hefezellen, die diese Bauteile beherbergten, IFN in das Kulturmedium sekretierten, unterschied sich die Aktivitätsmenge innerhalb der Stämme. Auch die gereinigte und sequenzierte IFN-Spezies zeigte Unterschiede.

Drei Formen von nicht-sekretiertem Interferon, die 90 Prozent des gesamten exprimierten Interferons darstellen, wurden aus Zellen, die das (pre D/A) LeIF A-Gen beherbergen, gereinigt. Eine Form (33 Prozent) war sauber abgeschnitten (+1, Fig. 13), eine zweite Form (55 Prozent) enthielt 3 zusätzliche Aminosäuren (-3, Fig. 13) und eine dritte Form (11 Prozent) enthielt 8 zusätzliche Aminosäuren (-8). Die letztgenannte Form wurde im Medium nicht festgestellt, während IFN mit voller Präsequenzlänge in den Zellen oder Medien nie beobachtet wurde.

Processing von (pre D) LeIF D

Anstelle der für die Züchtung von (pre D/A) LeIF A-Hefe verwendeten Schüttelflasche wurde (pre D) LeIF D-exprimierende Hefe in einem 10 Liter fassenden Fermenter bis zu einem A₅₅₀-Wert von 60 gezüchtet.

Bei Untersuchung des Processings von (pre D) LeIF D, das aus dem Medium gereinigt worden war (Reinigung wie bei pre D/A LeIF A) wurden sowohl die +1- als auch -3-Formen beobachtet (Fig. 13). Eine weitere untergeordnete Spezies war ferner im Medium als -14-Form vorhanden. Es gab keine Anzeichen für eine Zellysis in der Kultur, wie durch SDS-Gelelektrophorese des Mediumproteins im Vergleich mit zellulären Proteinen festgestellt wurde. Interessanterweise wurde für LeIF D bei sehr hoher Wachstumsdichte ein sehr hoher prozentualer Anteil (30 Prozent) der Sekretion in das Medium beobachtet. Hoch-

dichte Fermentationen von (pre D/A) LeIF A exprimierender Hefe zeigen ebenfalls diese höhere prozentuale Sekretion.

Hefe scheint sowohl sekretiertes als auch nicht-sekretiertes Interferon dem Processing zu unterwerfen. Der Anteil der sekretierten Aktivität hängt vom Wachstumsstadium der Zellen ab, wobei maximale Prozentanteile in der stationären Phase in Schüttelkolben und am Ende der hochdichten Fermentationen (30 Prozent in Medien) auftreten.

Bestätigung der Zusammensetzung der Plasmide in Hefen mit einem Gehalt an YEp1PT-preLeIFA53t und YEp1PT-LeIFA1

Die Hefe mit einem Gehalt an diesen beiden Plasmiden, die für die vorstehenden Untersuchungen eingesetzt worden war, wurde durch Wiedergewinnung der Plasmide aus der Hefe weiter untersucht. Dies wurde durch Isolierung der Plasmid-DNA aus Hefextrakt durch Transformation von E. coli, anschliessende Miniscreen-DNA-Präparation und Restriktionsanalyse der Plasmid-DNAs durchgeführt. Einige aus E. coli isolierte Plasmid-DNAs wurden für beide Hefetypen charakterisiert. In sämtlichen Fällen enthielten die Plasmide die erwartete Restriktionssequenz, was die Anwesenheit der Präsequenz am (pre D/A) LeIF A enthaltenden Plasmid und dessen Fehlen an Plasmid mit einem Gehalt an reifem LeIF A bestätigt.

Restriktionskarte und partielle Sequenzierung des 3,1 kb-Inserts von pB1

300 µg pB1 (37a) wurden gründlich mit HindIII in 500 µl Reaktionsvolumen verdaut und anschliessend der Elektrophorese an 1-prozentigem Agarosegel aus präparativer Agarose (Sea Kem) unterworfen. Das 3,1 kb HindIII-Insert wurde aus dem mit Ethidium gefärbten Gel geschnitten, der Elektroelution (39) unterworfen, 2 mal mit gleichen Volumina an mit Puffer gesättigtem Phenol und Chloroform extrahiert und sodann mit Äthanol ge-

fällt. Portionen des resuspendierten DNA-Fragments wurden aufgeteilt und mit einer Gruppe von verschiedenen Restriktionsenzymen Restriktionsschnitten unterworfen, wodurch man die in Fig. A wiedergegebene partielle Restriktionskarte erhielt.

30 µg des gereinigten 3,1 kb-Inserts wurden mit Sau3A geschnitten und sodann auf einem 6-prozentigen Acrylamidgel laufen gelassen. Die Fragmente, entsprechend den 265 bp und 141 bp, wurden auf die vorstehend genannte Weise separat durch Elektrophorese gereinigt. Jedes DNA-Fragment wurde sodann der DNA-Sequenzanalyse (39) unterworfen.

Ein Teil dieser DNA-Sequenz ist in Fig. B angegeben. Die Aminosäuren, entsprechend den N-terminalen Aminosäuren des PGK-Strukturgens, sind oberhalb der DNA-Sequenz aufgeführt.

Insertion einer Restriktionsstelle in den PGK 5'-Promotorbereich

Ein synthetisches Oligonucleotid mit der Sequenz 5'ATTGTTGTAAA3' wurde nach üblichen Methoden (40) synthetisiert. 100 ng dieses Primers wurden am 5'-Ende unter Verwendung von 10 Einheiten T4-Polynucleotid-kinase in 20 µl Reaktionsmedium, das ferner 200 µCi γ -³²P-ATP enthielt, markiert. Diese markierte Primerlösung wurde in einer Primer-Reparatur-Reaktion verwendet, die als erste Stufe in einem mehrstufigen Verfahren angewandt wurde, um eine EcoRI-Restriktionsstelle in die PGK 5'-flankierende DNA unmittelbar vor der PGK-Strukturgenesequenz zu bringen. Dieses mehrstufige Verfahren ist nachstehend erläutert.

Stufe 1 (Fig. C)

Primer-Reparatur-Reaktionen und Klonieren des 39bp XbaI- bis Sau3A PGK-Stücks

100 µg pB1 wurden vollständig mit HaeIII verdaut und sodann auf

einem 6-prozentigen Polyacrylamidgel laufengelassen. Die oberste Bande des mit Ethidium gefärbten Gels (den PGK-Promotorbereich enthaltend) wurde auf die vorstehend erläuterte Weise durch Elektroelution isoliert. Dieses 1200 bp HaeIII-Stück von DNA wurde der Restriktion mit HindII unterworfen und sodann auf einem 6-prozentigen Acrylamidgel laufengelassen. Die 650 bp-Bande wurde durch Elektroelution isoliert. 5 µg DNA wurden isoliert. Dieses 650 bp HaeIII-bisHindII-Stück von DNA wurde in 20 µl dH₂O resuspendiert und sodann mit 20 µl der vorstehend beschriebenen phosphorylierten Primerlösung vermischt. Das Gemisch wurde 1 mal mit Phenol/Chloroform extrahiert und sodann mit Äthanol gefällt. Die getrocknete DNA wurde in 50 µl H₂O resuspendiert und sodann 7 Minuten in einem siedenden Wasserbad erwärmt. Diese Lösung wurde dann rasch (10 bis 20 Sekunden) in einem Trockeneis/Äthanol-Bad gekühlt und dann in ein Eis/Wasser-Bad übertragen. Diese Lösung wurde mit 50 µl einer Lösung mit einem Gehalt an folgenden Bestandteilen versetzt: 10 µl 10X DNA Polymerase I-Puffer (Boehringer Mannheim), 10 µl einer vorher hergestellten Lösung, die jeweils 2,5 millimolar an den einzelnen Desoxynucleosidtriphosphaten (dATP, dTTP, dGTP und dCTP) ist, 25 µl dH₂O und 5 Einheiten DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment. Das 100 µl umfassende Reaktionsgemisch wurde 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde sodann 1 mal mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Äthanol gefällt, durch Lyophilisation getrocknet und schliesslich mit 10 Einheiten Sau3A gründlich der Restriktion unterworfen. Diese Lösung wurde sodann auf einem 6-prozentigen Acrylamidgel laufengelassen. Die in der Grösse 39 bp entsprechende Bande wurde aus dem Gel geschnitten und sodann auf die vorstehend geschilderte Weise durch Elektroelution isoliert. Diese 39 bp-Bande weist ein stumpfes Ende und ein Sau3A-kohäsives Ende auf. Dieses Fragment wurde in einen modifizierten pFIFtrp69-Vektor (10) geklont. 10 µg an pFIFtrp69 wurden mit XbaI linearisiert, 1 mal mit Phenol/Chloroform extrahiert und sodann mit Äthanol gefällt.

Das XbaI-kohäsive Ende wurde unter Verwendung von DNA-Polymerase I-Klenow-Fragment in einem 50 µl umfassenden Reaktionsmedium mit einem Gehalt an 250 millimolar der einzelnen Nucleosidtriphosphate gefüllt. Diese DNA wurde mit BamHI geschnitten und anschliessend auf einem 6-prozentigen Acrylamidgel laufengelassen. Das Vektorfragment wurde vom Gel durch Elektroelution isoliert und sodann in 20 µl dH₂O resuspendiert. 20 ng dieses Vektors wurden mit 20 ng des vorstehend synthetisierten 39bp-Fragments 4 Stunden bei Raumtemperatur der Ligation unterworfen. 1/5 des Ligationsgemisches wurde verwendet, um Ampicillinresistenz (auf LB +20 µg/ml amp-Platten) auf E. coli Stamm 294 zu transformieren. Plasmide aus den Transformanten wurden durch ein Raschsichtungsverfahren (20) untersucht. Ein Plasmid, pPGK-39 (Fig. C) wurde für die Sequenzanalyse ausgewählt. 20 µg dieses Plasmids wurden mit XbaI verdaut, mit Äthanol gefällt und sodann mit 1000 Einheiten bakterieller alkalischer Phosphatase 45 Minuten bei 68°C behandelt. Die DNA wurde 3 mal mit Phenol/Chloroform extrahiert und sodann mit Äthanol gefällt. Die dephosphorylierten Enden wurden sodann in einem 20 µl umfassenden Reaktionsgemisch mit einem Gehalt an 200 µCi γ -³²P-ATP und 10 Einheiten T₄-Polynucleotid-kinase markiert. Das Plasmid wurde mit SalI geschnitten und auf einem 6-prozentigen Acrylamidgel laufengelassen. Die markierte Insertbande wurde aus dem Gel isoliert und durch chemischen Abbau sequenziert (39). Die DNA-Sequenz am 3'-Ende dieses Promotorstücks entsprach den Erwartungen.

Stufe 2 (Fig. D)

Aufbau eines 312 bp PvuI-bis-EcoRI-PGK-Promotorfragments

25 µg PGK-39 (Fig. C) wurden gleichzeitig mit SalI und XbaI (jeweils 5 Einheiten) verdaut und anschliessend der Elektrophorese an einem 6-prozentigen Gel unterworfen. Die 390 bp-Bande, die das 39 bp-Promotorstück enthielt, wurde durch Elek-

troelution isoliert. Die resuspendierte DNA wurde der Restriktion mit Sau3A unterworfen und sodann der Elektrophorese an einem 8-prozentigen Acrylamidgel unterzogen. Die 39 bp PGK-Promotorbande wurde durch Elektroelution isoliert. Diese DNA enthielt 39 bp am 5'-Ende des PGK-Promotors an einem Sau3A-bis XbaI-Fragment.

25 µg pB1 wurden der Restriktion mit PvuI und KpnI unterworfen und anschliessend der Elektrophorese an einem 6-prozentigen Gel unterzogen. Die 0,8 kbp-Bande von DNA wurde durch Elektroelution isoliert und sodann mit Sau3A der Restriktion und anschliessend der Elektrophorese an einem 6-prozentigen Gel unterworfen. Die 265 bp-Bande aus dem PGK-Promotor (Fig. A) wurde durch Elektroelution isoliert.

Diese DNA wurde sodann mit dem 39 bp-Promotorfragment (vgl. oben) 2 Stunden bei Raumtemperatur verknüpft. Das Ligationsgemisch wurde der Restriktion mit XbaI und PvuI unterworfen und sodann der Elektrophorese an einem 6-prozentigen Acrylamidgel unterzogen. Das 312 bp Xba-bis-PvuI-Restriktionsfragment wurde durch Elektroelution isoliert, anschliessend zu einem Ligationsgemisch mit einem Gehalt an 200 ng pBR322 (33) (vorher isoliert unter Weglassen des 162 PvuI-bis-PstI-Restriktionsfragments) und 200 ng XbaI-bis-PstI LeIFA-cDNA-Gen (vorher isoliert aus 20 µg pLEIFtrpA) gegeben. Dieses Ligationsgemisch mit 3 Faktoren wurde zur Transformation von E. coli Stamm 294 zur Verleihung von Tetracyclinresistenz verwendet. Transformantenkolonien wurden einem Miniscreening unterworfen. Eine der Kolonien, pPGK-300, wurde isoliert. Sie wies 304 bp PGK-5'-flankierende DNA, verschmolzen mit dem LeIFA-Gen in einem Vektor auf der Basis von pBR322 auf. Das 5'-Ende des LeIFA-Gens weist folgende Sequenz auf: 5'-CTAGAAATTC 3', so dass das Verschmelzen der XbaI-Stelle aus dem PGK-Promotorfragment in diese Sequenz die Addition einer EcoRI-Stelle an die XbaI-Stelle ermöglicht.

pPGK-300 enthält somit einen Teil des PGK-Promotors, isoliert in einem PvuI-bis-EcoRI-Fragment.

Stufe 4

Aufbau eines 1500 bp EcoRI-bis-EcoRI-PGK-Promotorfragments

10 µg pBI wurden mit PvuI und EcoRI verdaut und an einem 6-prozentigen Acrylamidgel laufengelassen. Die 1,3 kbp PvuI-bis-EcoRI-DNA-Bande aus der PGK 5'-flankierenden DNA wurde durch Elektroelution isoliert. 10 µg des pPGK-300 wurden mit EcoRI und PvuI verdaut. Nach Elektrophorese des Verdauungsgemisches an einem 6-prozentigen Gel wurde das 312 bp-Promotorfragment durch Elektroelution isoliert. 5 µg pFRL4 wurden mit EcoRI geschnitten, mit Äthanol gefällt und sodann 45 Minuten mit bakterieller alkalischer Phosphatase bei 68°C behandelt. Nach 3-maliger Behandlung der DNA mit Phenol/Chloroform, Fällung mit Äthanol und Resuspendierung in 20 ml dH₂O wurden 200 ng des Vektors mit 100 ng 312 bp EcoRI-bis-PvuI-DNA aus pPGK-300 und 100 ng EcoRI-bis-PvuI-DNA aus pBI verknüpft. Das Ligationsgemisch wurde zur Transformation von E. coli Stamm 294 zur Verleihung von Ampicillinresistenz verwendet. Aus einer der Ap^R-Kolonien wurde pPGK-1500 erhalten. Dieses Plasmid enthält das 1500 bp PGK-Promotorfragment als ein EcoRI-bis-EcoRI- oder HindIII-bis-EcoRI-Stück von DNA.

Aufbau von Expressionsplasmiden für reifes HGH (menschliches Wachstumshormon) und preHGH

Die Bauteile A bis E von Fig. 14 wurden in Vektoren mit entsprechenden Stellen eingebaut. Beim Bauteil A wurde eine synthetische DNA hergestellt, um die DNA-Sequenz zu Beginn der preHGH-cDNA (42) von der Hpa II-Stelle unter Bildung eines EcoRI in Front des ATG-Translationsstarts zu verdoppeln. Das HpaII-bis-PstI-Fragment wurde aus preHGH cDNA (42) erhalten. Dieses Fragment mit der synthetischen DNA wurde mit einem

EcoRI-bis-PstI-Vektor (pHGH 207-1, EcoRI-bis-PstI-Fragment, das einen Teil des Ap^R-Gens enthält, entfernt und beide Seiten nach Klenow-Füllung religiert, um beide Seiten zu entfernen), der die PstI-bis-SmaI-Stelle von HGH cDNA (43) erhält, verknüpft, um das Bauteil A zu erhalten. Das Bauteil B wurde aus einem Plasmid mit einem Gehalt am reifen HGH-Gen, das vorher für die direkte Expression mit einem Gehalt an 23 Aminosäuren der synthetischen kodierenden Sequenz am NH₂-terminalen Ende aufgehakt worden ist, hergestellt. Ein Plasmid mit einem Gehalt an diesem Gen wurde mit PvuII im HGH-Gen und BamHI im Tc^R-Gen geschnitten. Das grosse Fragment mit einem Gehalt am Grossteil des Gens wurde sodann mit synthetischer DNA, die das Ende des HGH-Gens (TAG) dupliziert und eine HindIII-Stelle schafft, verknüpft. Die HindIII-Stelle wurde mit dem HindIII/BamHI-Fragment von pBR322 als der dritte Faktor einer Verknüpfung mit 3 Faktoren verknüpft, wodurch man ein Plasmid mit einem Gehalt am Bauteil B erhielt.

A und B wurden sodann gemäss Fig. 14 zu Bauteil C vereinigt. C wurde weiter unter Bildung von D modifiziert, wo die HindIII-Stelle in eine EcoRI-Stelle verwandelt war. Das so erhaltene EcoRI-Stück wurde in die EcoRI-Stelle des Hefeexpressionsplas- mids YEpIPT zur Expression des preHGH-Gens in Hefe eingesetzt. Das Bauteil E wurde ebenfalls unter Verwendung des bei D ein- gesetzten Konverters hergestellt, um ein reifes Interferongen (ohne Sekretionssignalfrequenz) an einem EcoRI-Fragment zur Expression in YEpIPT zu erhalten.

Expression von reifem HGH und preHGH in Hefe

Das mHGH-Bauteil (E) in YEpIPT wurde in den Stamm pep4-3 trp1 (20B-12) gebracht. Extrakte unter Verwendung von Glasperlen wurden gemäss der vorstehend geschilderten Methodik hergestellt. Jedoch wurden die Glasperlen zu 10 ml pelletisierten Zellen

mit 0,5 ml 0,1-prozentigem SDS gegeben. Verdünnungen wurden in Pferdeserum durchgeführt. RIA-Tests erfolgtem gemäss (44). RIA ergab, dass HGH in einer Menge von etwa 0,5 Prozent des gesamten Hefeproteins bei A_{660} an 1,0 ($0,5 \text{ mg/Liter}/A_{660}$) exprimiert wurde. Im Medium wurde kein HGH nachgewiesen.

Das preHGH-Bauteil (D) in YEpIPT wurde ebenfalls in Hefe eingebracht. Zellen und Medium wurden auf HGH getestet. Ein geringerer Expressionsgrad wurde in den Zellen ($0,08 \text{ mg/Liter}/A_{660}$) festgestellt, entsprechend 0,08 Prozent des gesamten Hefeproteins. Somit beträgt der Expressionsgrad etwa 1/6 der Expression von reifem HGH, ein Ergebnis, das starke Ähnlichkeit mit dem Ergebnis bei Leukozyteninterferon zeigt. Jedoch ist dieser Vergleich möglicherweise nicht angebracht, da die Kodonverwendung von reifem HGH (44) sich für 23 Aminosäuren von den gleichen Aminosäuren für preHGH unterscheidet. Dieser Unterschied kann zum unterschiedlichen Expressionsgrad der beiden Produkte führen (45). 10 Prozent oder $8 \text{ } \mu\text{g/Liter}/(A_{660} = 1)$ des in der Zelle exprimierten Anteils finden sich im Medium von preHGH exprimierender Hefe. In einem 10 Liter-Fermenter bei $A_{550} = 85$ erfolgt ebenfalls eine etwa 10-prozentige Sekretion mit 1 mg/Liter HGH in den Medien.

Natur der preHGH-Expression

Ein Vergleich des HGH-Proteins in der Zelle mit dem ausserhalb der Zelle wurde mit dem vorstehend erläuterten Western-Blottingverfahren durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen ein Medium hochdichter Fermentierung ($A_{550} = 85$) von preHGH exprimierender Hefe. Eine einzige Bande entsprechend der Grösse von reifem HGH, ist vorhanden. Diese Bande entspricht 1 bis 2 Prozent des Hefe-Mediumproteins.

Wird dieses Medium-HGH durch Antikörperaffinitätschromatographie (Hybritech Ab) und HPLC, wie bei den Interferonen, gerei-

nigt, so zeigt die NH_2 -terminale Sequenzierung, dass es sich bei nahezu 100 Prozent des HGH um reifes HGH handelt (die Sequenzierung wurde für 10 Reste durchgeführt), wie teilweise in Fig. 13 gezeigt ist. Somit wird das gesamte Medium HGH genau dem Processing unterworfen, wie es bei menschlichen Zellen der Fall ist.

Literaturliste

1. Novick, P., Field, C., and Schekman, Cell 21, 205-215 (1980).
2. Duntze, et al., Science 168, 1472 (1970).
3. Woods, et al., J. Gen. Microbiol. 51, 115 (1968).
4. Cabib, et al., J. Bacteriology 124, 1586 (1975).
5. Farkas, Microbiol. Rev 43, 117 (1979).
6. Moor, Arch. Mikrobiol. 57, 135 (1967).
7. Goeddel, et al., Nature 287, 411 (1980).
8. Goeddel, et al., Nature 290, 20 (1981).
9. Yelverton, et al., Nucleic Acids Research 9, 731 (1981).
10. Goeddel, et al., Nucleic Acids Research 8, 4057 (1980).
11. Wetzel, American Scientist 68, 664 (1980).
12. Wetzel, et al., Biochemistry 19, 6096 (1980).
13. Davis, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78, 5376 (1981).
14. Hitzeman, et al., Nature 293, 717 (1981).
15. Kleid, et al., Science 214, 1125 (1981).
16. Lawn, et al., Nucleic Acids Res. 9, 6103 (1981).
17. Weck, et al., Nucleic Acids Res. 9, 6153 (1981).
18. Clarke, L. and Carbon, J. Cell 9, 91-99 (1976).
19. Clarke, L. and Carbon, J. PNAS 72, 4361-4365 (1975).
20. Birnboim, H.C., and Doly, J. Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523 (1979).
21. Hinnen, A., Hicks, J.B., and Fink, F.R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929-1933 (1978).
22. Backman, K., Ptashne, M., and Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4174-4178 (1976).

23. Jones, E. Genetics 85, 23 (1976).
24. Faye, G., Leung, D.W., Tachell, K., Hall, B.D., and Smith, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2258-2262 (1981).
25. Miller, J.H., Experiments in Molecular Genetics, pp. 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
26. Stewart, W.E. II The Inteferon System (Springer, New York, 1979).
27. P. Edman, G. Begg, "A Protein Sequencer" Eur. J. Biochem., 1, 80-91 (1967).
28. Tarr, G.E., Beecher, J.F. Bell, M. and McKean, D.J. Anal. Biochem. 84, 622-627, (1978).
29. Wittmann-Liebold, B., Graffunder, H., and Kohls, H. Anal. Biochem. 75, 621-633 (1976).
30. Gray, P.W., et al., Nature 295, 503-508 (1982).
31. Emr, S.D., et al., Nature 285, 82-85 (1980).
32. Novick, P. and Schekman. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1858-1862 (1979).
33. Bolivar, F., Rodriguez, R.L, Green, P.Y., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, Y.H., and Falkow, S. Gene 2, 95-113 (1977).
34. Stinchcomb, D.T., Struhl, K., and Davis, R.W. Nature 282, 39-43 (1979).
35. Kingsman, A.J., Clarke, L., Mortimer, R., and Carbon, J. Gene 7, 141-153 (1979).
36. Tschumper, G., and Carbon, J. Gene 10, (1980).

37. Hartley, J.L. and Donelson, J.E. Nature 286, 860-865 (1980).
- 37a. Hitzeman, R.A., Clarke, L., and Carbon, J. J. Biol. Chem. 255, 12073 (1980).
- 37b. Broach et al., Gene 8, 121 (1979).
38. Messing, et al., Nucleic Acids Research 9, 309 (1981).
39. Maxam, A.M., and Gilbert, W. Methods in Enzymol. 65, 490-565 (1980).
40. Crea, R. and Horn, T. Nucleic Acids Res. 8, 2331-2348.
41. Oakley, B.R. et al., Anal. Biochem. 105, 361 (1980).
42. Goodman, H.M., et al. in Specific Eukaryotic Genes (Eds. Engberg, J., Klenow, H., and Leick, V.) 179-190 (Munskagaard, Copenhagen, 1979).
43. DeBoer, H., et al. in Promoters: Structure and Function (eds. Prayer) pp. 468-481 (1982).
44. Goeddel, D.V. et al., Nature 281, 544 (1979).
45. Bennetzen, J.L., and Hall, B.D., J. Biol. Chem. 257, 3026 (1982).
46. Ames, G.F.-L., J. Biol. Chem. 249, 634 (1974).
47. Towbin, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4350 (1979).

248613 3

AP C 12 N /248 613.3

62 177 12

Erfindungsanspruch

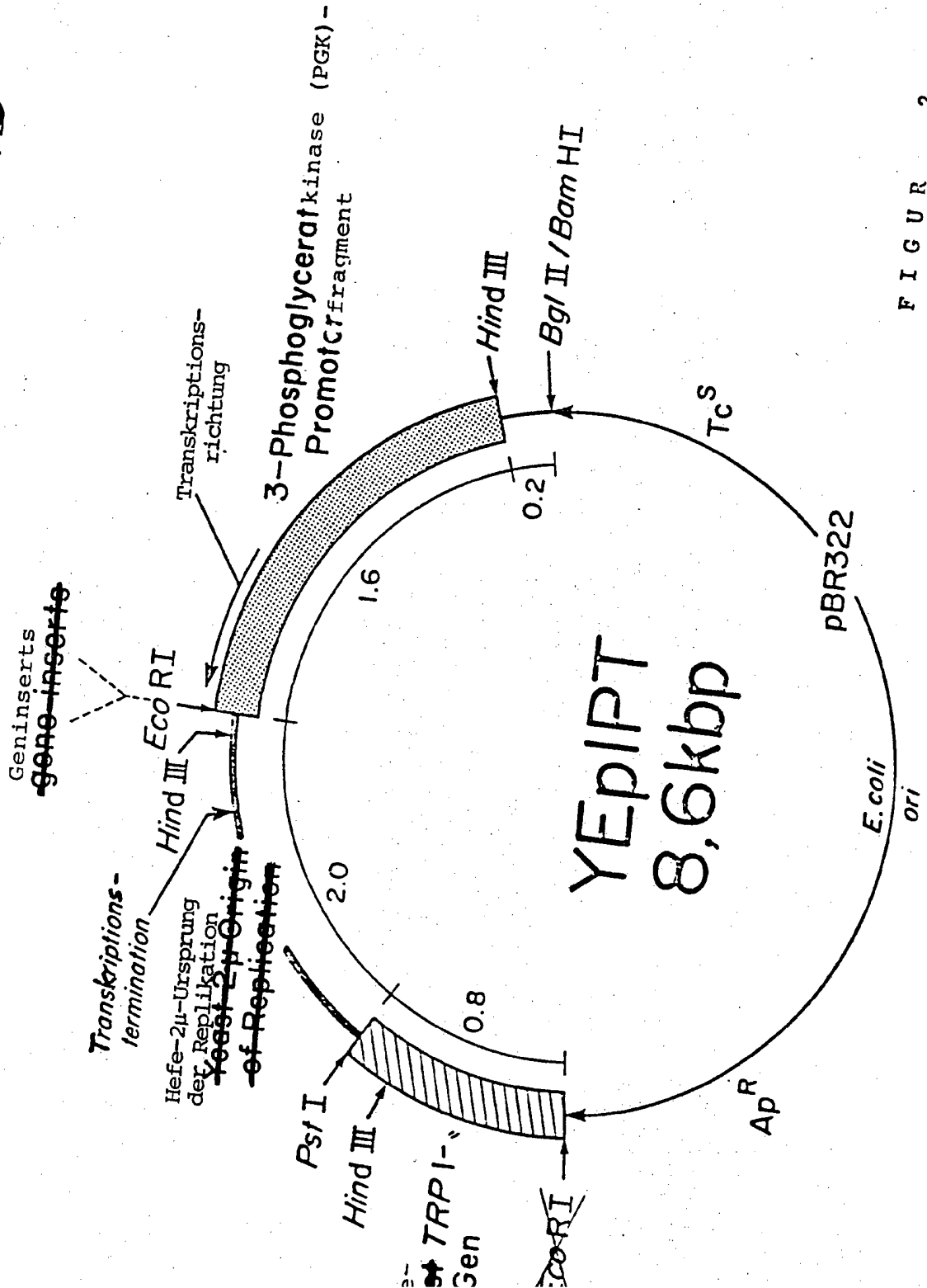
1. Verfahren zur Herstellung von für einen Hefeorganismus heterologem Protein mittels Expression, Processing und Sekretion durch Hefe, gekennzeichnet dadurch, daß man einen Hefeorganismus mit einem Expressionsträger transformiert, der funktionell DNA beherbergt, die das Protein und ein heterologes Signalpolypeptid kodiert, eine Kultur des transformierten Organismus herstellt, die Kultur züchtet und das heterologe Protein aus dem Kulturmedium gewinnt.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß man Humaninterferon herstellt.
3. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß man Humanleukozyteninterferon herstellt.
4. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß man Humanleukozyteninterferon A oder D herstellt.
5. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß man den Hefeorganismus *Saccharomyces cerevisiae* verwendet.
6. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß man als heterologes Signalpolypeptid ein Hybrid des für dieses Protein nativen Signals und eines zweiten heterologen Signalpolypeptids verwendet.

48

FIGURE 1

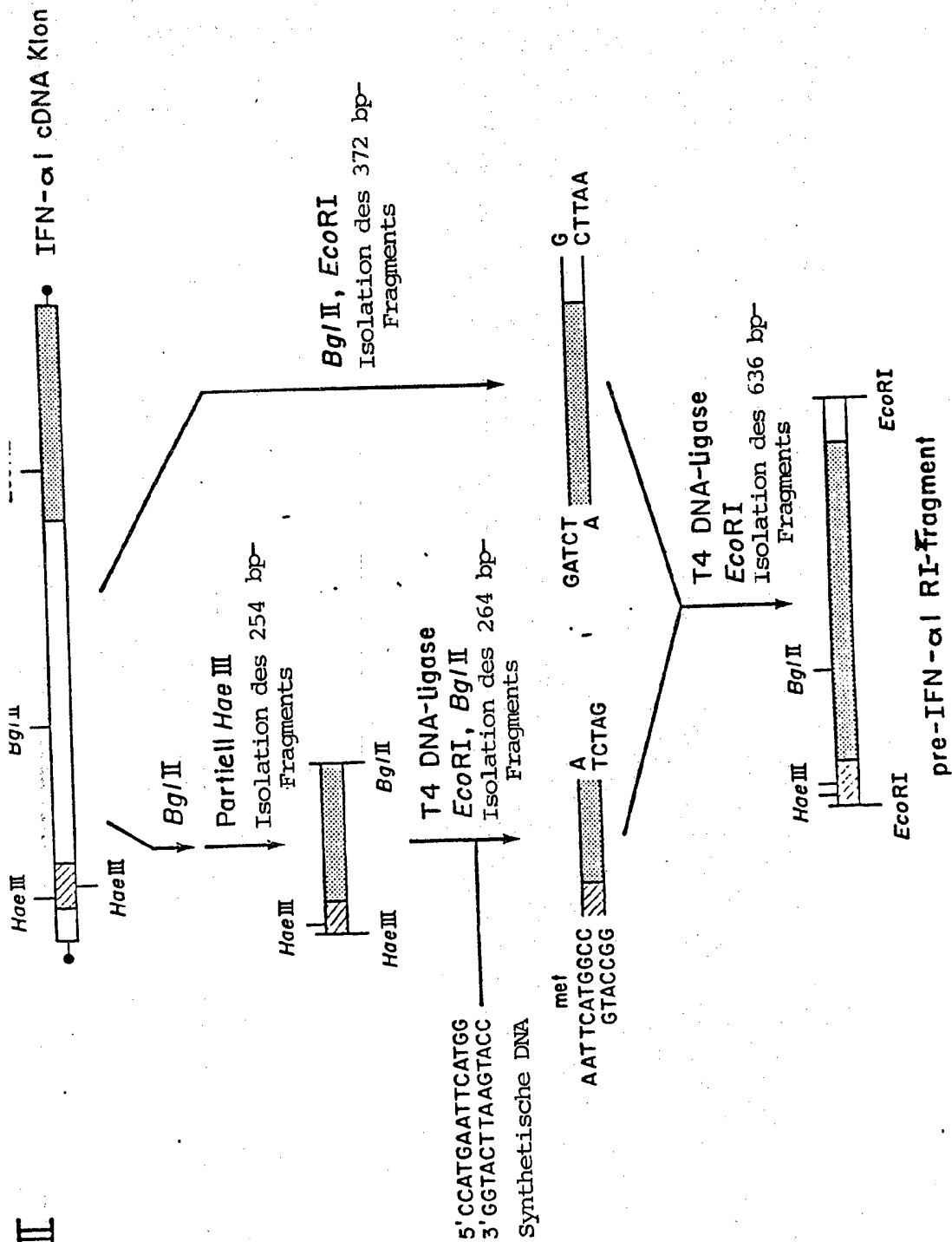
YEAST EXPRESSION PLASMID

HEF⁺ EXPRESSION PLASMID

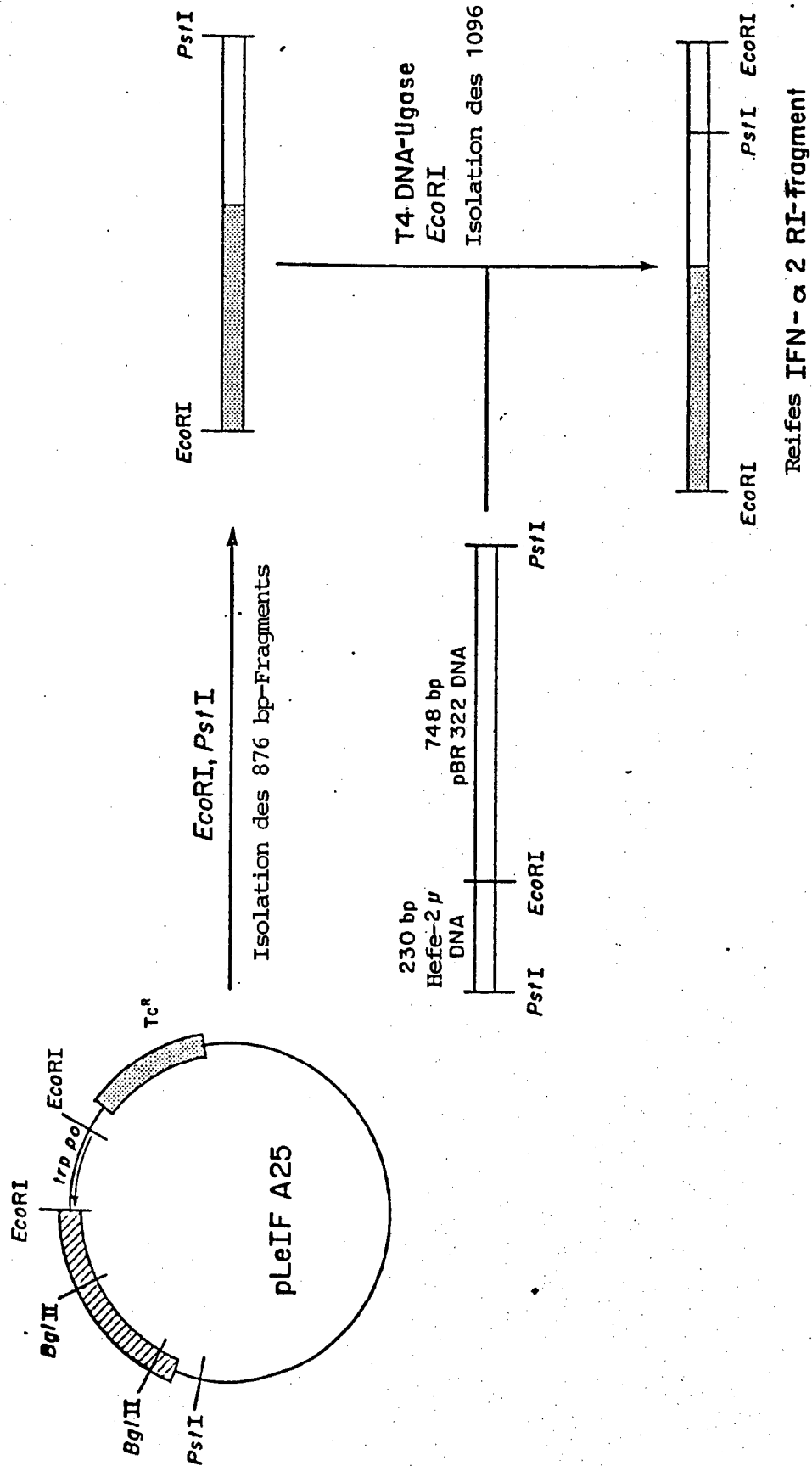


FIGUR 2

II



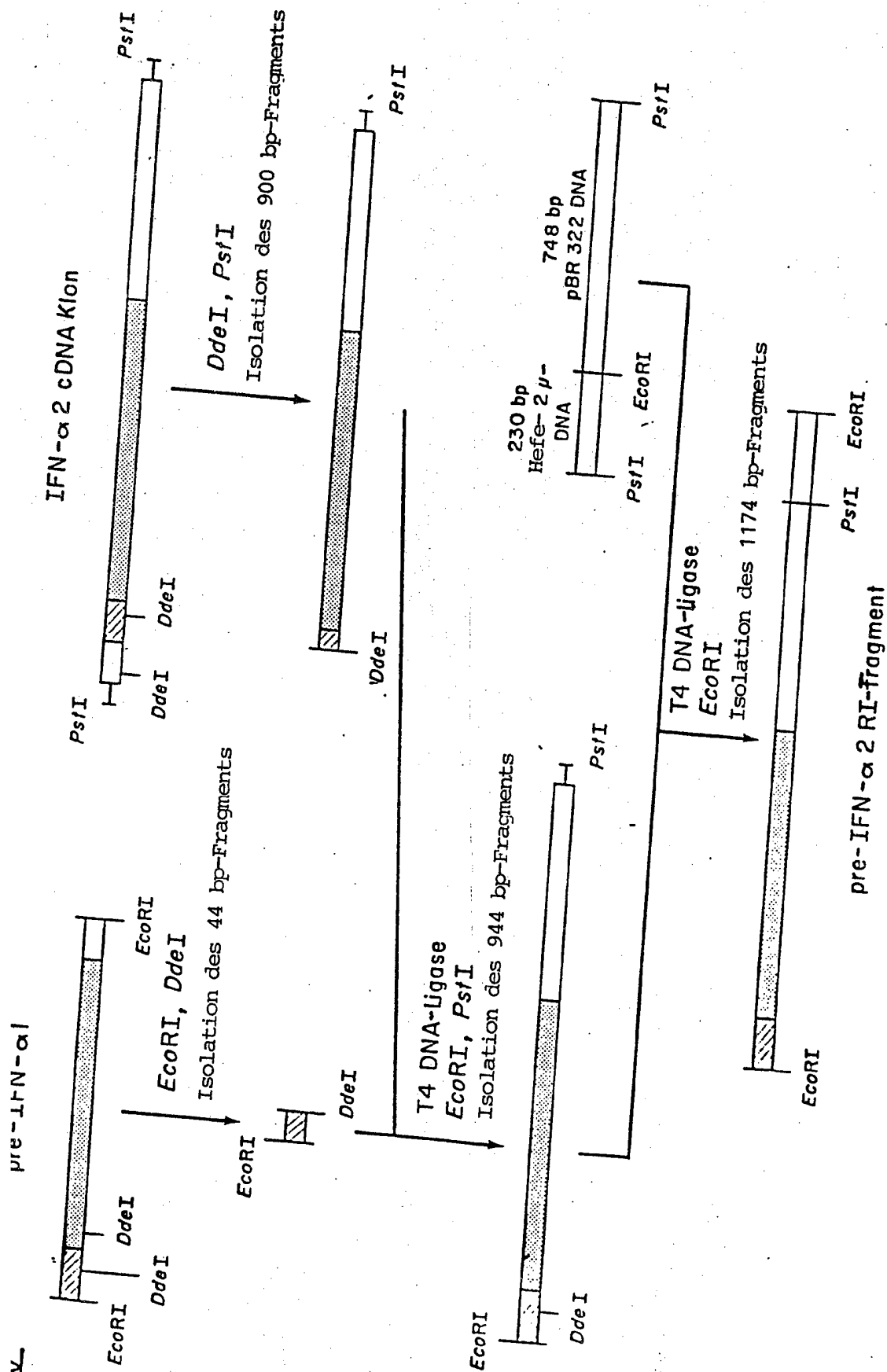
FIGUR 3



FIGUR 4

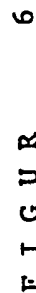
248613 3

52



FIGUR 5

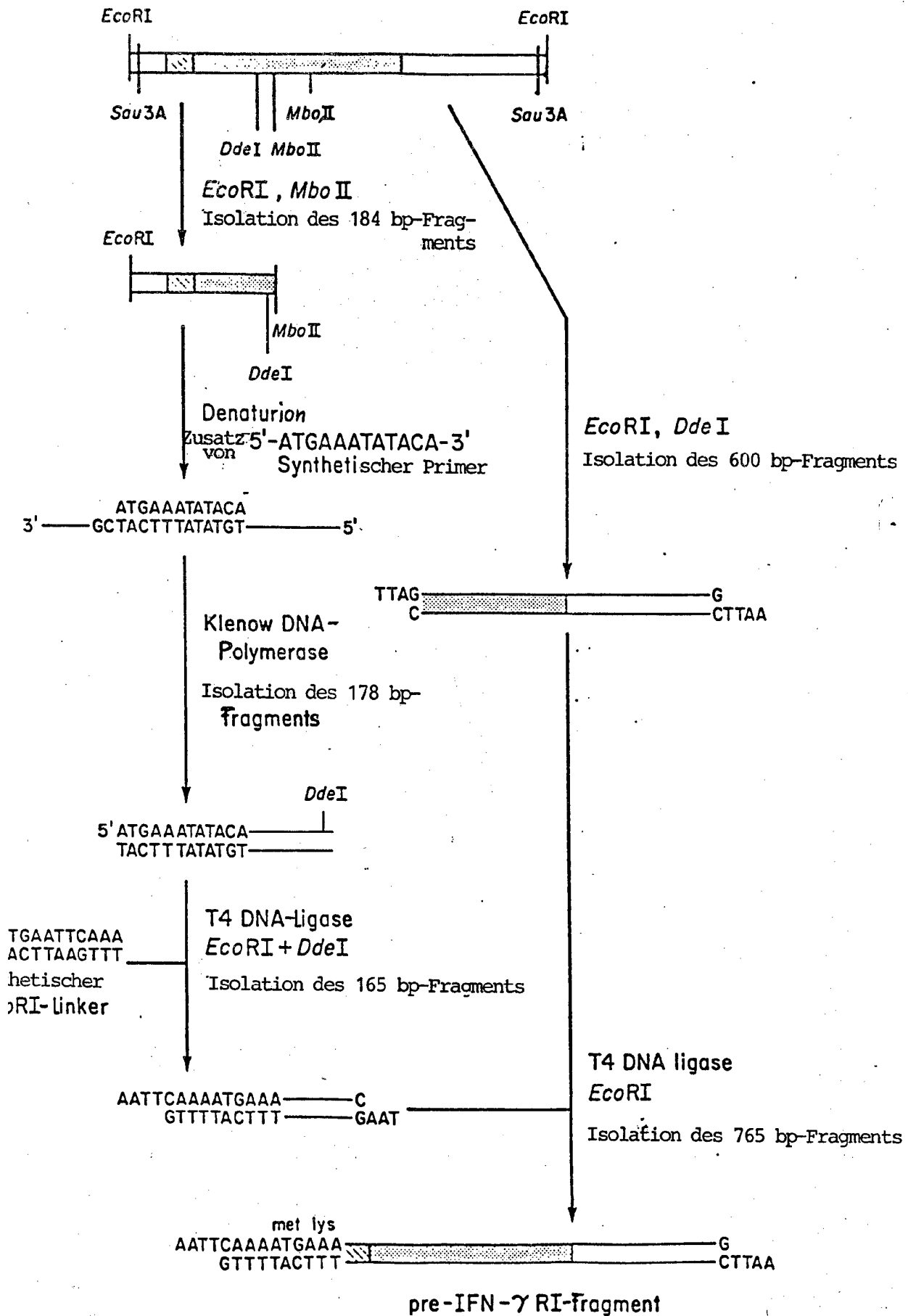
IFN- γ cDNA-Klon



248613 3

54

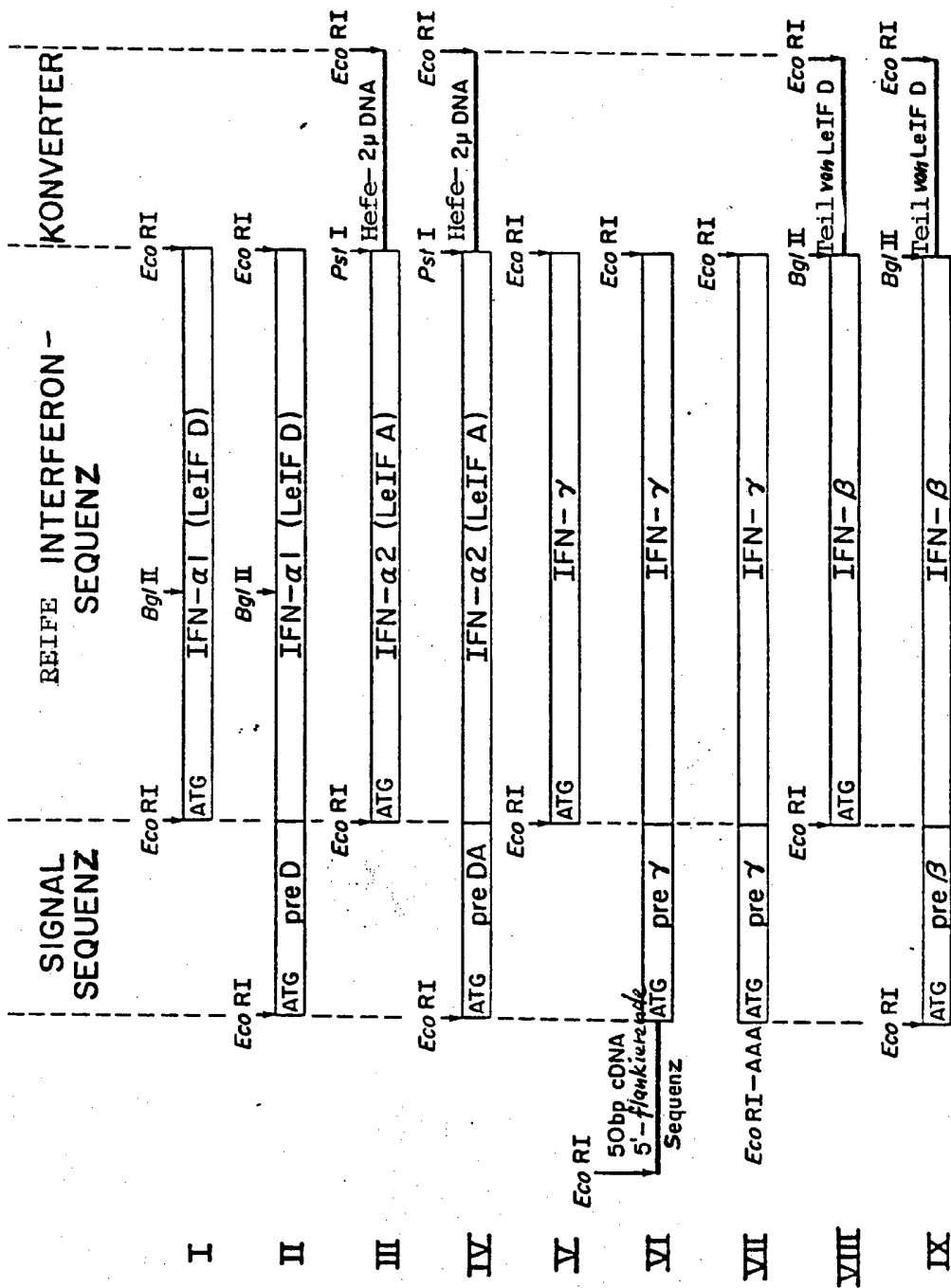
FIGUR 7

IFN- γ 862 bp *Eco*RI-Fragment

~~INTERFERON GENES USED IN YEAST~~

~~EXPRESSION PLASMID~~

IM HEFEEXPRESSIONSPLASMID VERWENDETE INTERFERONGENE

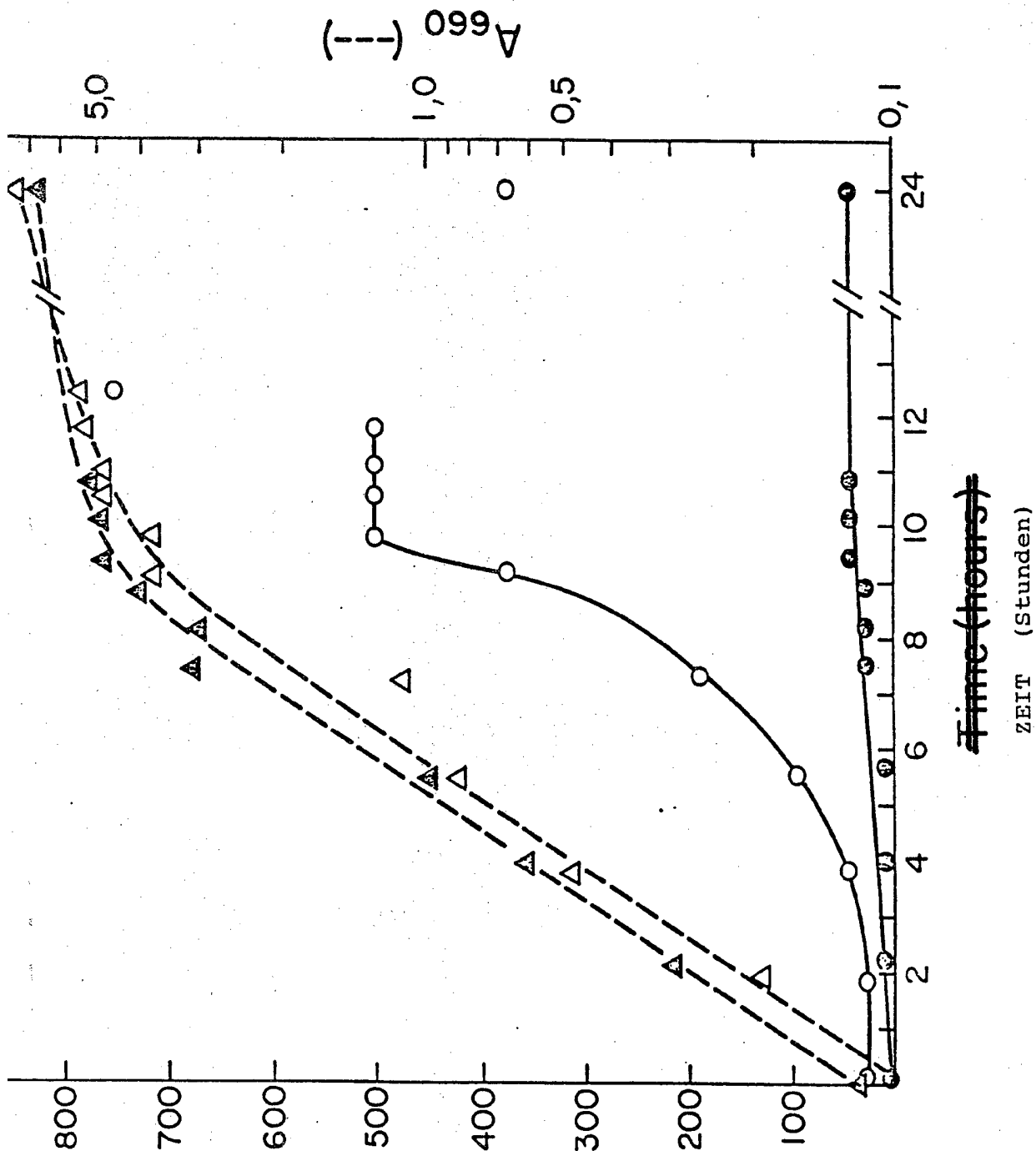


FIGUR 8

248613 3

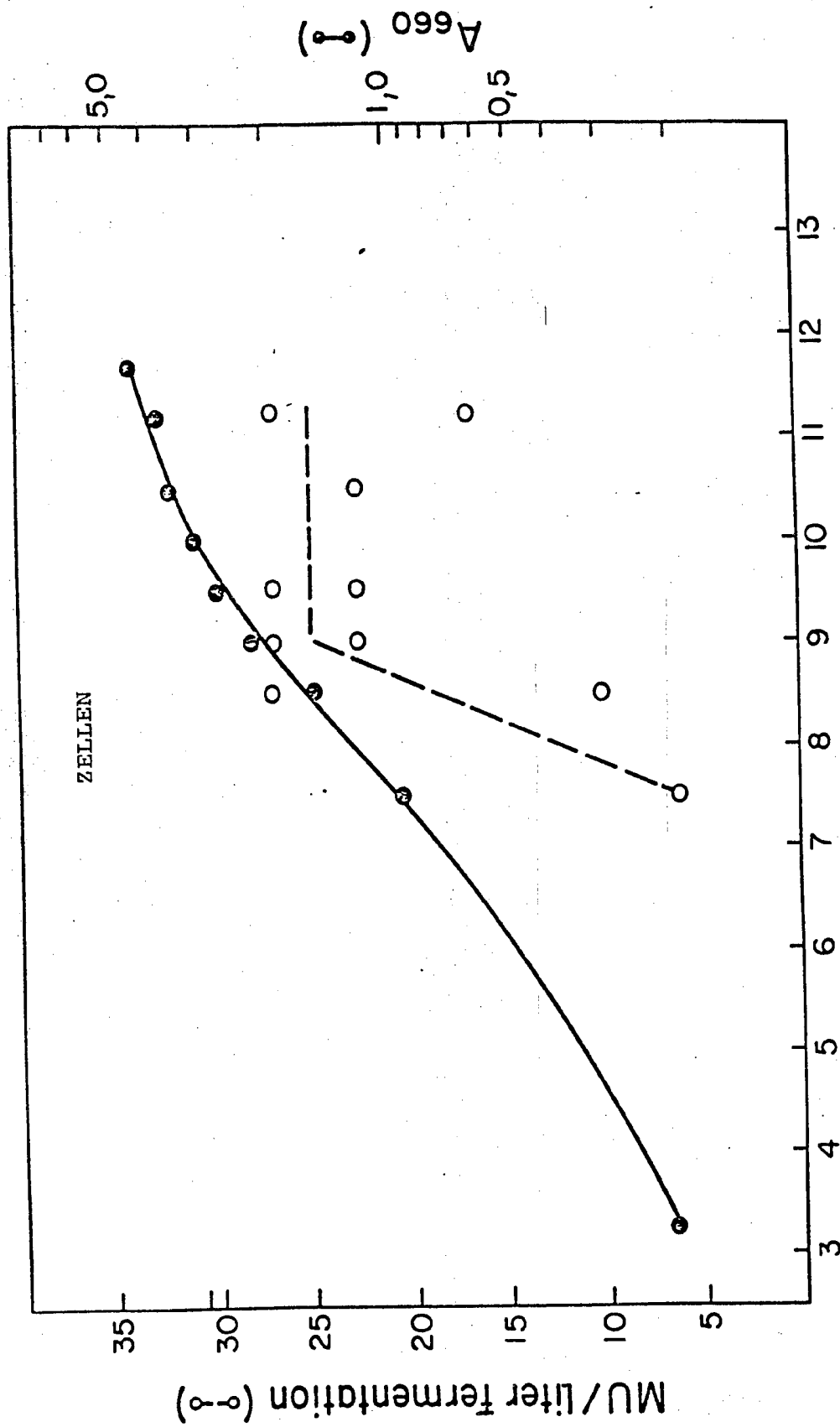
56

AKTIVITÄT BEI DER BIOLOGISCHEN BESTIMMUNG
(Einheiten/ml) (-)



FIGUR 9

248613 3

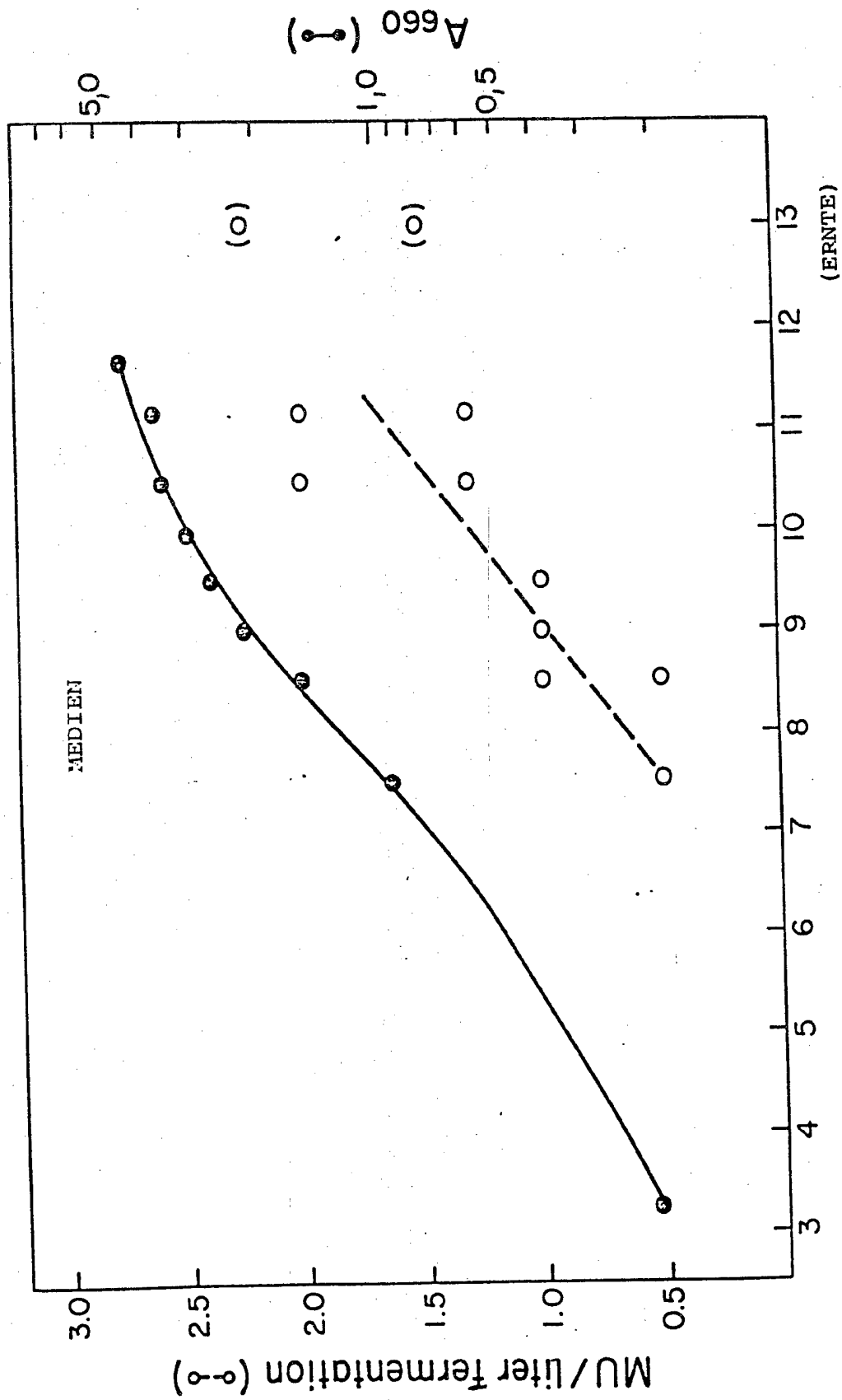


ZERT (Std.)

FIGUR 10a

248613 3

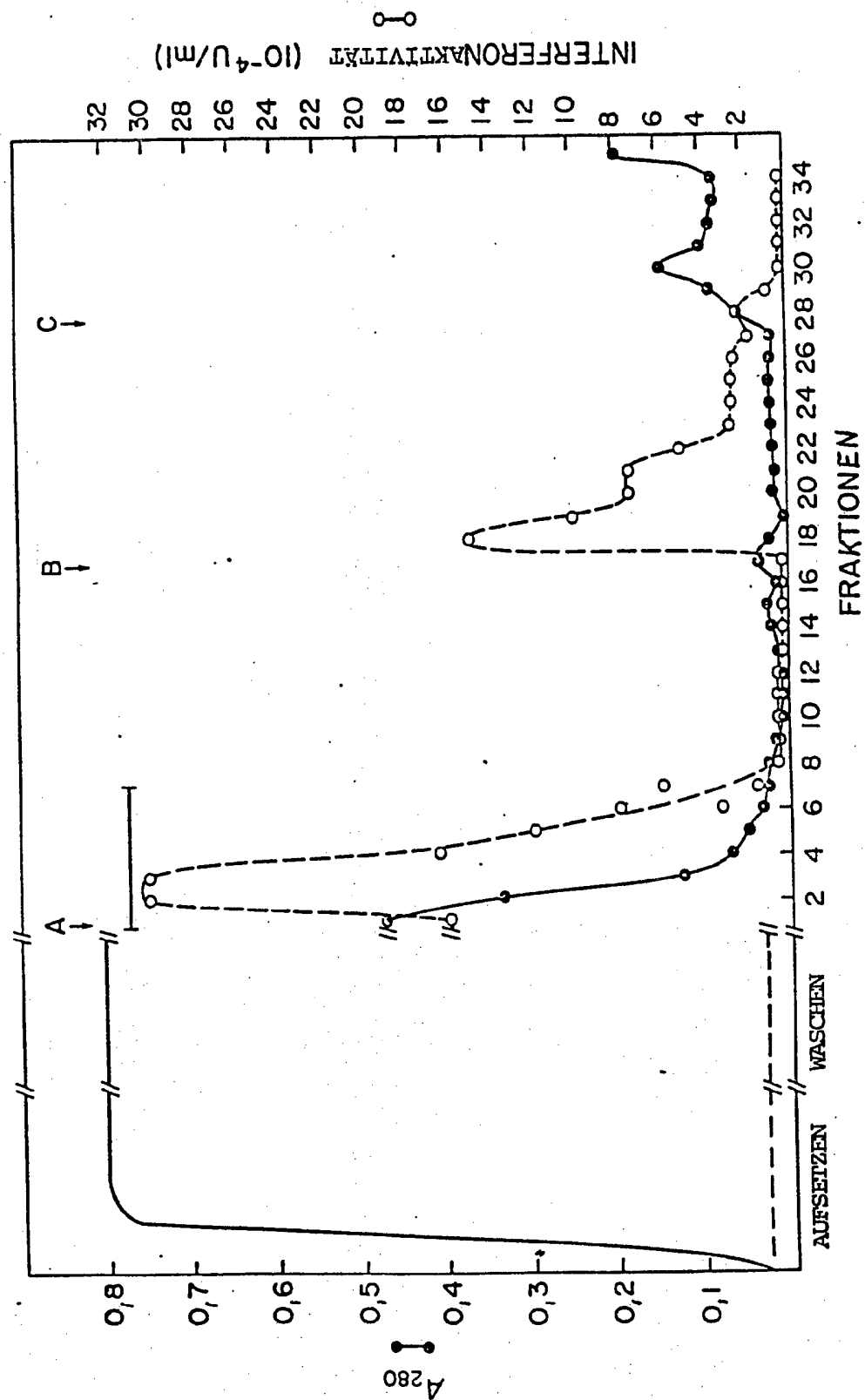
58



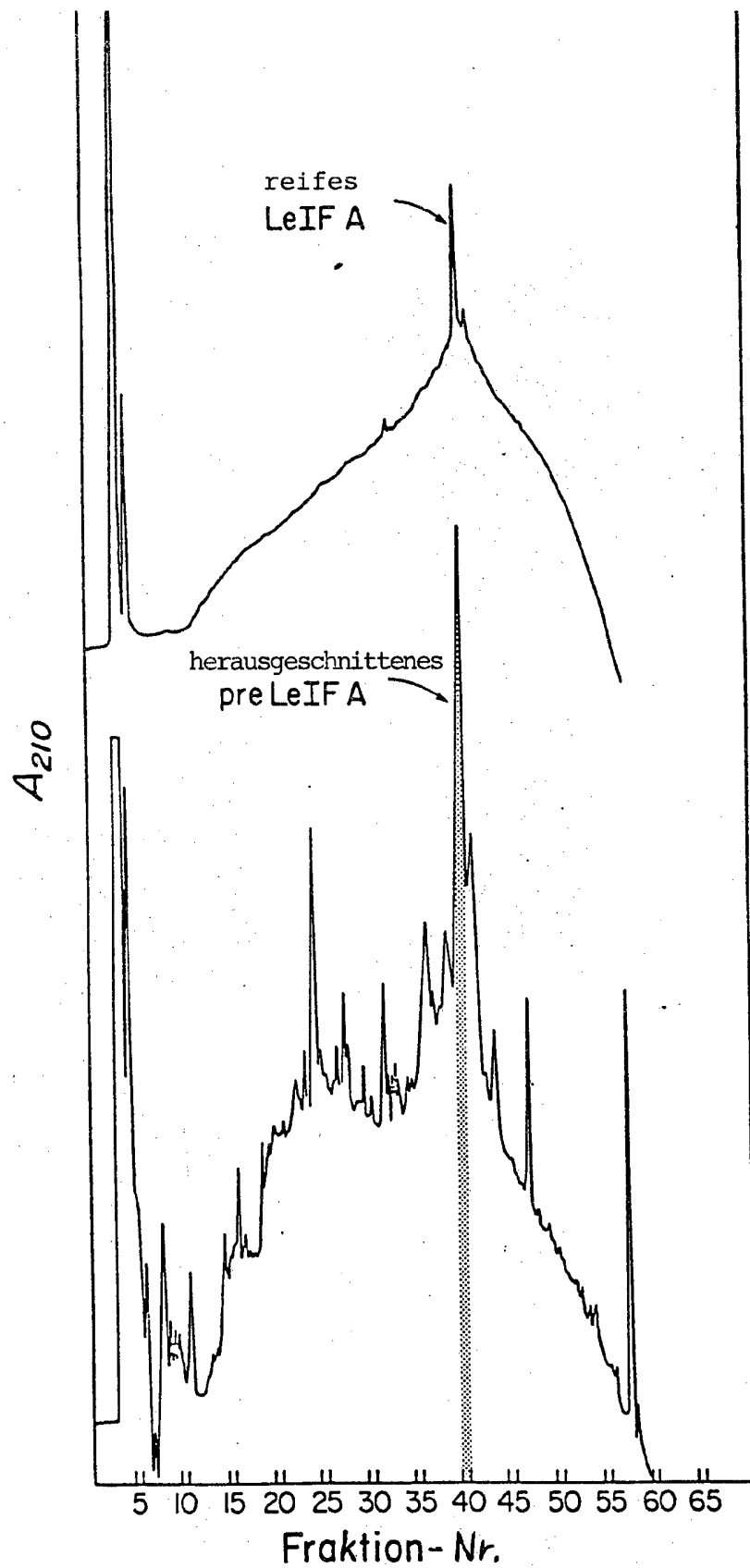
FIGUR 10b

248613 3

59



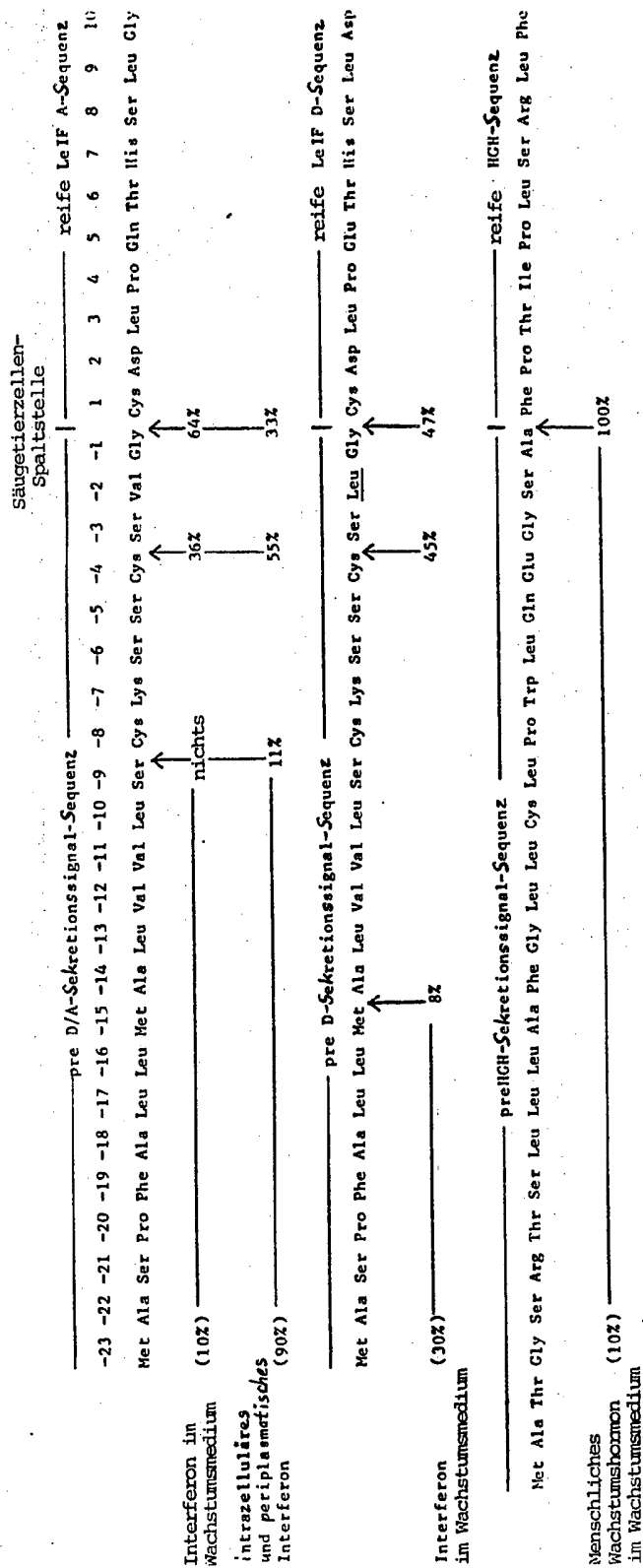
FIGUR 11



248613 3

61

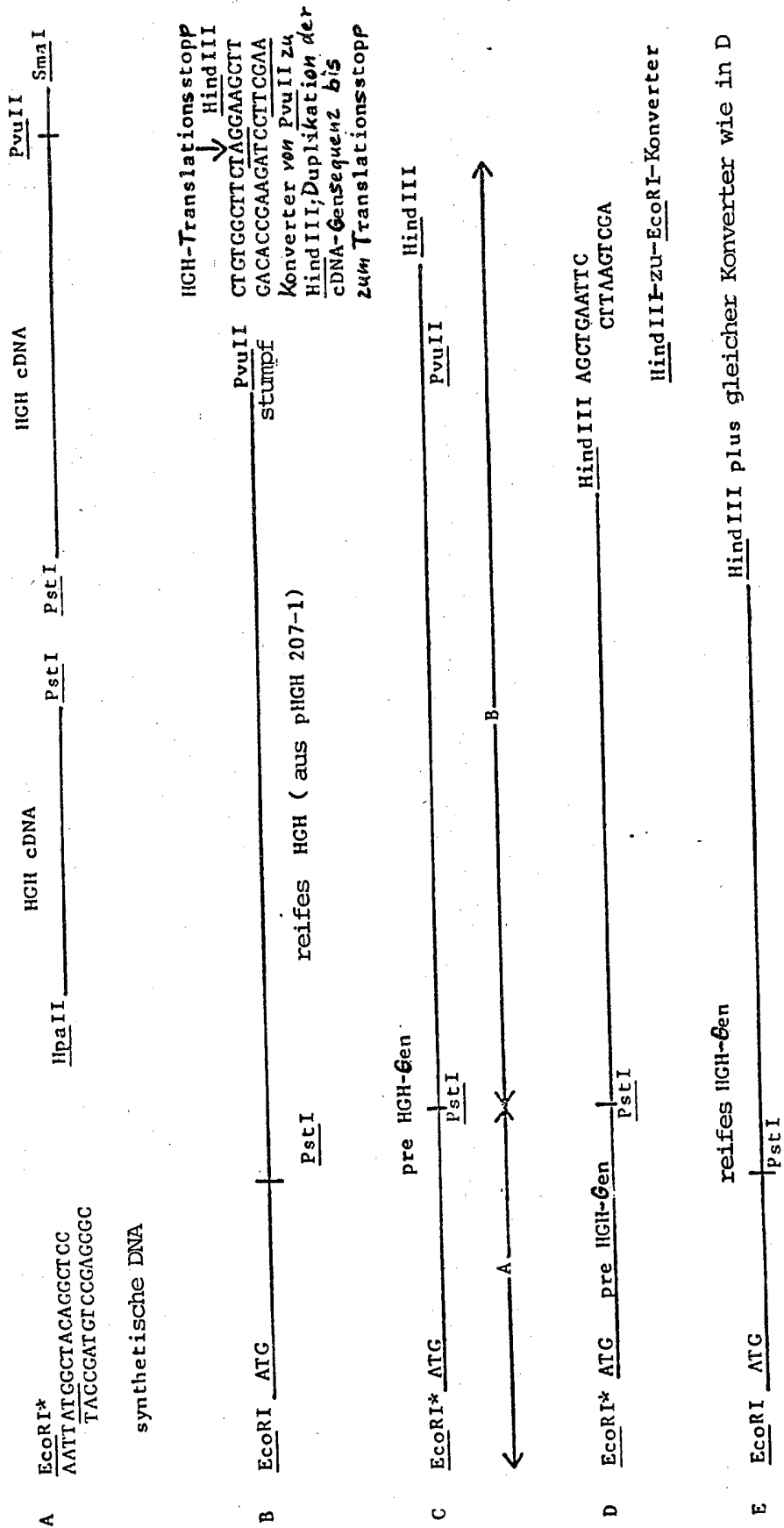
Processing von (pre D/A) LeIF A, (pre D) LeIF D, und preHCH durch Hefe



FIGUR 13

248613 3

62



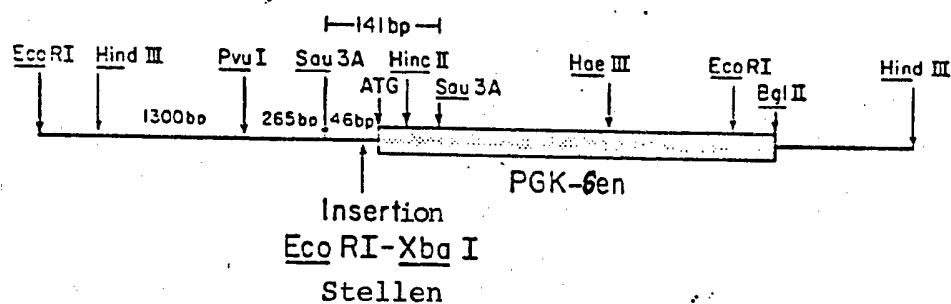
FIGUR 14

248613 3

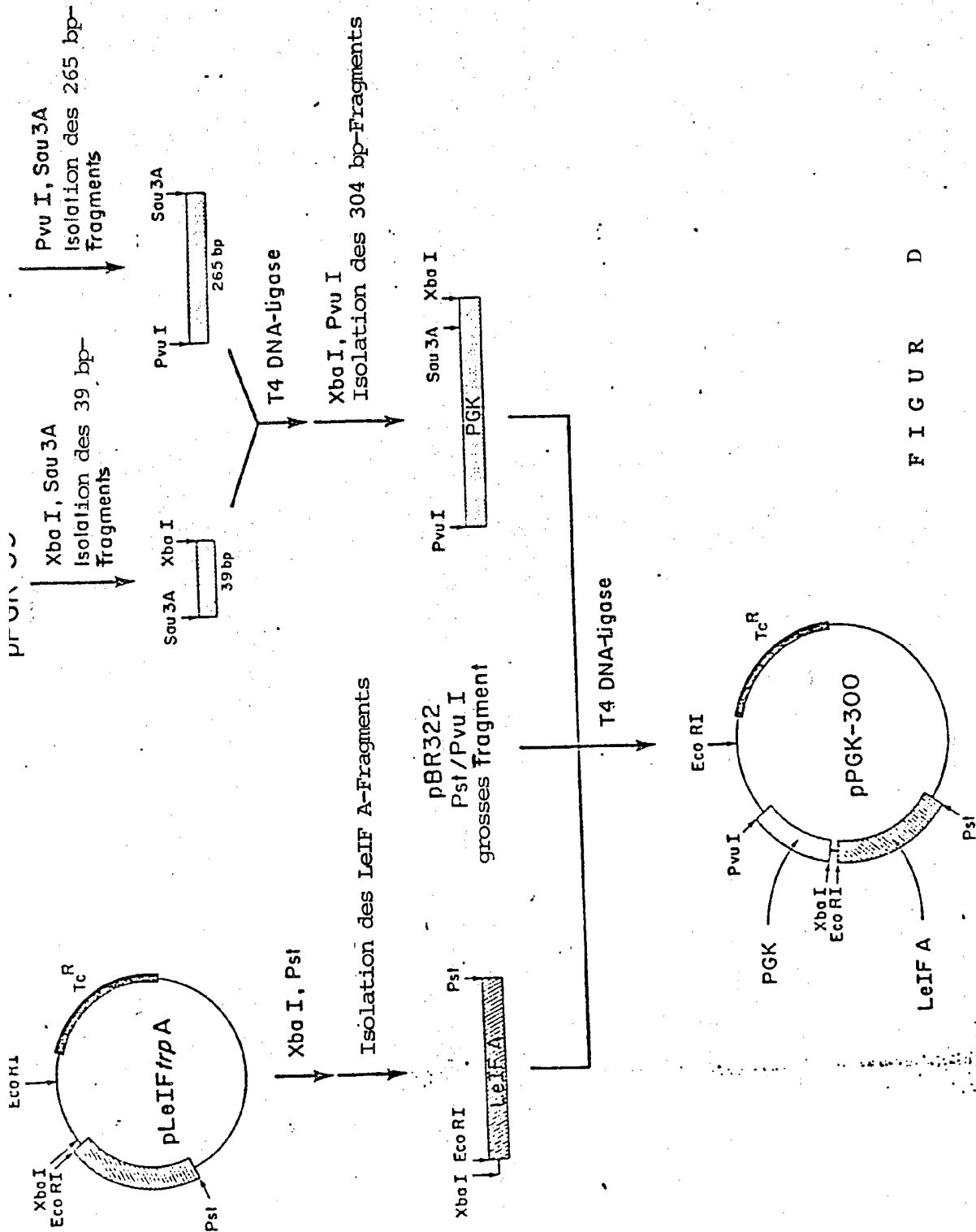
63

INSERTION EINER EcoRI-STELLE IN DIE 5'-FLANKIERENDE
DNA DES 3-PHOSPHOGLYCERAT-GENS von HEFE

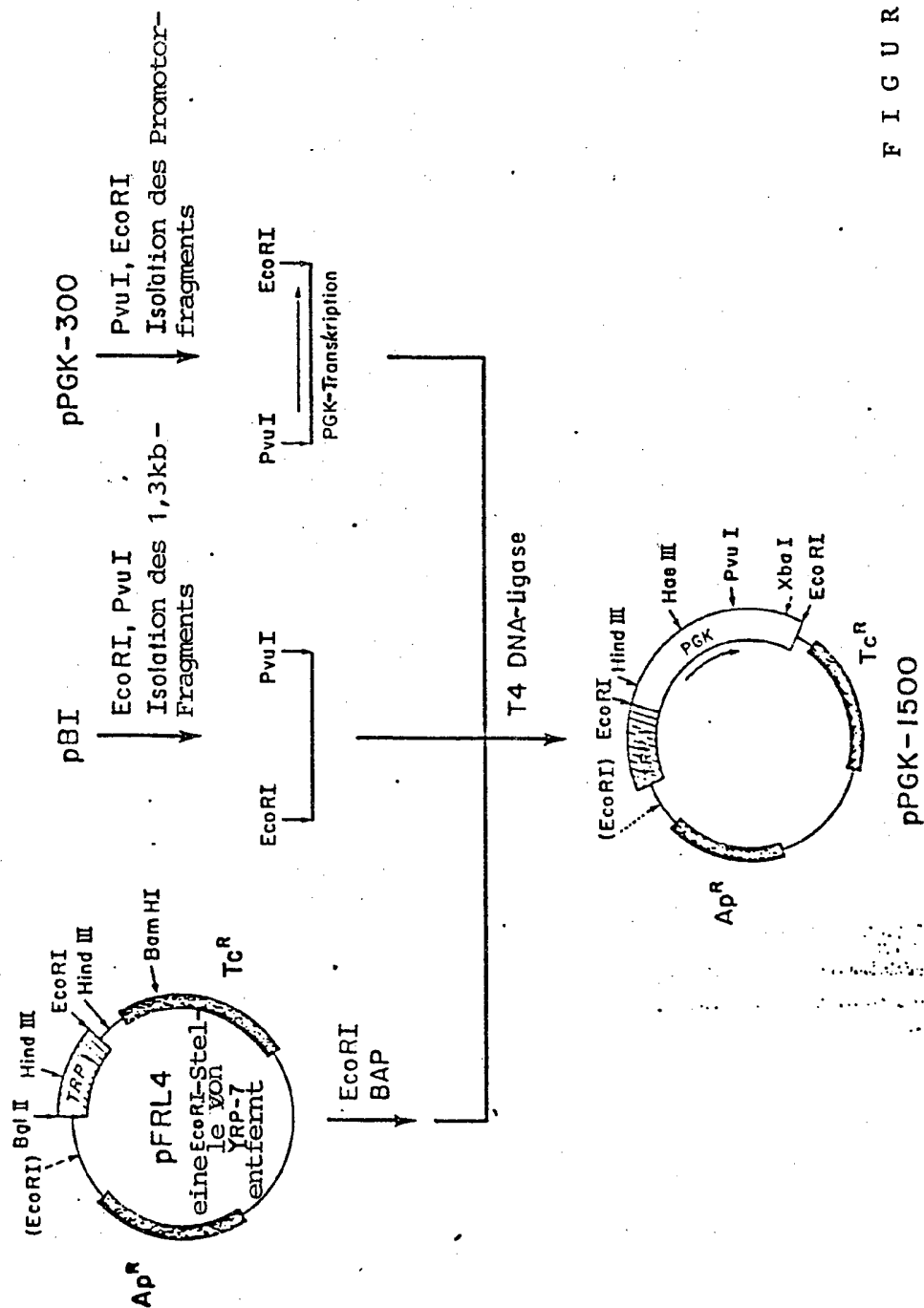
~~THE INSERTION OF AN EcoRI SITE IN THE 5' FLANKING DNA
OF THE 3-PHOSPHOGLYCERATE GENE OF YEAST~~



FIGUR A



FIGUR D



FIGURE

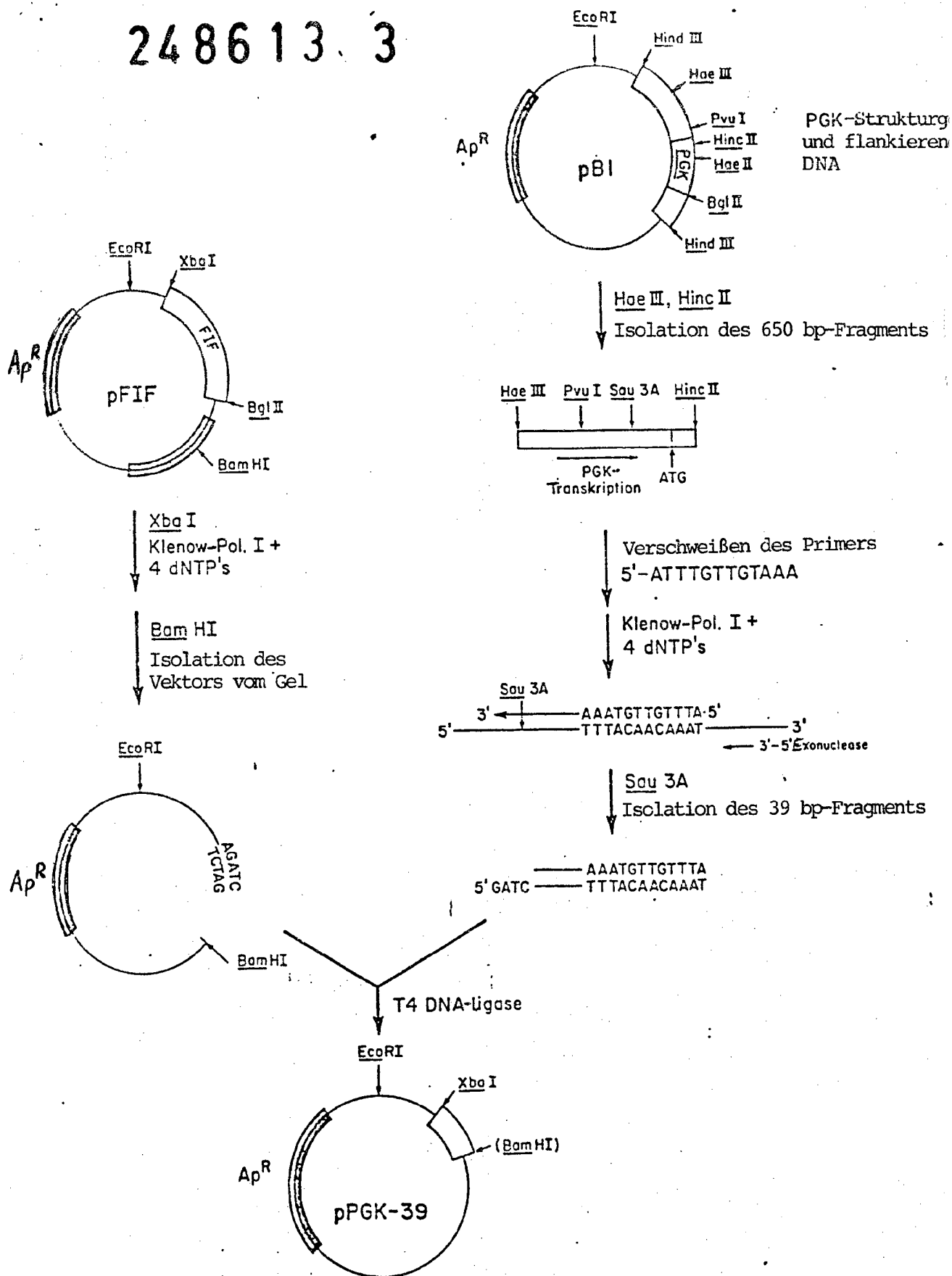
248613 3

DNA-SEQUENZ DES 5'-ENDES VON HEFE-
3-PHOSPHOGLYCERAT-KINASE-STRUKTURGEN
UND FLANKIERENDE DNA

5'-----GATCATAAGGAAGTAATTATCTACTTTTACACAACAATATAAACA ATG TCT TTA TCT TCA AAG TTG CTC GTC VAL
-40 -30 -20 -10 -1 MET SER LEU SER SER LYS LEU LEU VAL
TCT TCT TCA AAG TTG CTC GTC

Fig. B

248613.3



FIGUR C