(19)

SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 951046 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 951046

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 9/04 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **07.09.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **07.03.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **07.03.1995**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **07.09.1993 PCT/US1993/008411**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

08.09.1992 US 941414 P

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Rutgers, the State University of New Jersey,** Old Queens Building, Somerset and George Streets, New Brunswick, NJ 08903, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Lazarus, Robert A.,** Millbrae, CA 94030, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Hurle, Mark,** Bridgeport, PA 19405, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • **Anderson, Stephen,** Princeton, NJ 08540, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 • **Powers, David B.,** Somerset, NJ 08873, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Parannettuja entsyymejä 2-keto-L-gulonihapon tuotantoon

Förbättrade enzym till produktion av 2-keto-L-gulonsyra

Parannettuja entsyymejä 2-keto-L-gulonihapon tuotantoon - Förbättrade enzym till produktion av 2-keto-L-gulonsyra

Keksinnön ala

Keksintö koskee teollisesti arvokkaiden entsyymien parannettuja mutanttimuotoja kohtasuunnatun mutageneesin tuloksena. Erityisemmin keksintö koskee 2,5-diketo-D-glukonihappo(2,5-DKG)-reduktaasi A:n mutasoituja muotoja, joka 2,5-DKG-reduktaasi A on luonnollisesti esiintyvän DKG-reduktaasin muunnos. Mutasoiduilla muodoilla on parantunut katalyyttinen aktiivisuus 2,5-DKG:n muuttamisessa stereoselektiivisesti 2-keto-L-gulonihapoksi (2-KLG), joka on askorbiinihapon (C-vitamiinin) prekursori. Lisäksi mutasoiduilla muodoilla on kasvaneet in vivo -ekspressiotasot ja/tai parantunut lämpötilastabiilisuus.

Keksinnön tausta

Johtuen ihmisten kasvavasta terveystietoisuudesta kautta maailman C-vitamiinilla on lisääntynyttä kysyntää. Askorbiinihappokysyntään myötävaikuttaa myös sen laajalle levinnyt käyttö hapetuksenestoaineena elintarvikkeiden säilytyksessä. Yksi lähestymistapa tämän vaatimuksen tyydyttämiseksi on saavuttaa 2-KLG:n, askorbiinihappotuotannon välituotteen, lisääntynyt tuotanto. Välituote, 2-KLG, voidaan helposti muuttaa askorbiinihapoksi happo- tai emäskatalysoidulla syklisoinnilla. Sillä on myös suurempi stabiilisuus ja varastoinninkestävyys kuin askorbiinihapolla. Sen vuoksi askorbiinihapon suoraan tuottamisen sijasta on käytännöllisempää kasata 2-KLG:tä seuraavaa askorbiinihapoksi muuttamista varten.

Joukko mikro-organismien ensimmäisen ryhmän lajeja, Erwinia, Acetobacter ja Gluconobacter, voivat tuottaa 2,5-DKG:tä D-glukoosista. Mikro-organismien toinen ryhmä bakteerien koryneformryhmästä (Corynebacterium, Brevibacterium ja Arthrobacter) samoin kuin species of Micrococcus, Staphylococcus,

Pseudomonas, Bacillus ja Citrobacter pystyvät muuttamaan 2-KLG:ksi 2,5-DKG:tä, jota ensimmäisen ryhmän mikro-organismi tuottaa. Tämä sopivien mikro-organismien fermentointia yhdessä 2-KLG:n tuottamiseksi yksinkertaistettiin yhdistämällä sekä Erwinia sp.:n että Corynebacterium sp.:n relevantit ominaisuudet yhdessä ainoassa mikro-organismissa (Anderson et al., Science 23:144 (1985)). Tämä toteutettiin tunnistamalla Corynebacterium sp.:ssä 2,5-DKG-reduktaasin, joka muuttaa 2,5-DKG:n 2-KLG:ksi. Sitten tämän reduktaasin geeni kloonattiin ja ekspressoitiin Erwinia herbicola'ssa, Enterobacteriaceae-suvun bakteerissa, joka muuttaa D-glukoosin 2,5-DKG:ksi yhdessä ainoassa fermentoinnissa. Tulokseksi saatu yhdistelmä-DNA-bakteerikanta, jossa on 2,5-DKG-reduktaasi keskeisenä entsyyminä, pystyi muuttamaan D-glukoosin 2-KLG:ksi yhdessä ainoassa fermentointiprosessissa (Lazarus et al., Fourth ASM Conf. Genet. Molec. Biol. Indust. Microorg., 187-193 (1989)).

2,5-DKG-reduktaasin katalyyttisen tehokkuuden parantaminen yksifermentointiprosessissa on merkittävä tapa 2-KLG:n tuotannon lisäämiseen. Myös puhdistettua 2,5-DKG-reduktaasi A:ta, jolla on lisääntynyt katalyyttinen aktiivisuus, voitaisiin käyttää in vitro-prosessissa 2,5-DKG:n muuttamiseen 2-KLG:ksi. Sellainen prosessi sallisi esimerkiksi 2-KLG:n jatkuvatoimisen tuotannon puhdistetun entsyymin immobilisoinnilla kiinteälle kantajalle.

Alla esitetyn Michaelis-Menten-kaavion mukaan

$$E + S \underset{}{\overset{Km}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{kcat} E + P$$

entsymaattisen reaktion tehokkuus voidaan mitata kahdella kineettisellä parametrillä, kcat ja Km. Katalyyttinen nopeusvakio, kcat, joka tunnetaan myös nimellä "turnover number", on entsyymi-substraatti(ES)-kompleksin hajoamisen mitta. Se edustaa myös maksimaalista lukumäärää substraatti-

molekyylejä (S), jotka muuttuvat tuotteeksi (P) ES-kompleksin kautta entsyymin (E) aktiivista kohtaa kohden aikayksikköä kohden. Vmax on entsyymikatalysoidun reaktion maksiminopeus kun entsyymi on kyllästetty substraatilla. Sen vuoksi Vmax on vakio substraatin kyllästyskonsentraatiossa ja pysyy muuttumattomana millä hyvänsä substraattikonsentraation kasvulla. kcat substraatin kyllästyskonsentraatioilla liittyy Vmax:iin ja kokonaisentsyymikonsentraatioon, $[E_T]$, seuraavalla yhtälöllä: Vmax = kcat $[E_T]$. Michaelis-vakio, Km, on yhtäsuuri kuin ES-kompleksin dissosiaatiovakio. Sen vuoksi Km on ES-kompleksin lujuuden mitta. Km-arvojen vertailussa pienempi Km edustaa kompleksia, jolla on voimakkaampi, edullisempi sitoutuminen, kun taas suurempi Km edustaa kompleksia, jolla on heikompi, vähemmän suotuisa sitoutuminen. Suhde, kcat/Km, jota kutsutaan spesifisyysvakioksi, edustaa entsyymin spesifisyyttä substraattia kohtaan, ts., katalyyttistä tehokkuutta entsyymimolekyyliä kohden substraatille. Mitä suurempi spesifisyysvakio on, sitä edullisempi substraatti on entsyymillä.

Vaikuttavia 2-KLG-saantoja on saatu Corynebacterium'in 2,5-DKG-reduktaasilla (2,5-DKG reduktaasi A, tunnetaan myös 2,5-DKG-reduktaasi II:na) (Anderson et al., Science 230:144 (1985) ; Miller et al., J. Biol. Chem. 262:9016 (1987)), joka on ekspressoitu sopivissa isäntäkannoiussa (2,5-DKG-tuottajissa) kuten Erwinia sp. Nämä tulokset on saavutettu huolimatta 2,5-DKG-reduktaasi A:sta, jolla on alhainen spesifisyysvakio 2,5-DKG:tä varten. Koska Corynebacterium ei luonnollisesti kohtaa 2,5-DKG:tä, ei ole hämmästyttävää, että tämä yhdiste on hiono 2,5-DKG reduktaasi A:n substraatti.

Tämä alhainen spesifisyysvakio 2,5-DKG-reduktaasi A:ta varten on vastakohta toiselle, homologiselle Corynebacteriumin 2,5-DKG-reduktaasille (2,5-DKG reduktaasi B, tunnetaan myös 2,5-DKG-reduktaasi I:nä), jolla on suurempi spesifisyysvakio 2,5-DKG:lle (Sonoyama ja Kobayashi, J. Ferment. Technol.

65:311 (1987)). Lisäksi molemmat 2,5-DKG-reduktaasit ovat homologisia useille tunnetuille aldoosi- ja keto-reduktaaseille, joilla on suuremmat spesifisyysvakiot tunnettuja substraattejaan kohtaan. Tällaiset havainnot osoittavat, että 2,5-DKG-reduktaasi A:n aktiivinen kohta ei ole konfiguroitunut ihanteellisesti 2,5-DKG:n katalyyttistä muutosta varten 2-KLG:ksi. Sen vuoksi vaikuttaa siltä, että 2,5-DKG-reduktaasi A-spesifisen aktiivisuuden lisäämiseksi yksifermentointiprosessissa, entsyymin aktiiviseen kohtaan on tehtävä aminohappokorvauksia kohtasuunnatulla mutageneesillä.

Entsyymin kineettisten parametrien parantamisen lisäksi kohtasuunnattu mutageneesi voi lisätä rakenteellista stabiilisuutta aminohappokorvauksilla, deleetioilla tai inserti-oilla. Seuraavat ovat esimerkkejä rakenteellisesti stabiloivista mutaatioista. Uusien disulfidisidosten lisäämistä kovalenttisten ristiliitosten luomiseksi proteiinin eri osien välille on käytetty parantamaan bakteriofagi T4-lysotsyymin (Matsumura et al., Nature 342:291-293 (1989)), bakteriofagi λ-repressorin (Sauer et al., Biochem. 25:5992-5998 (1986)), E. coli'n dihydrofolaattireduktaasin (Villafranca et al., Biochem. 26:2182 (1987)), ja subtilisin BPN':n (Pantoliano et al., Biochem. 26:2077-2082 (1987)) lämpöstabiilisuutta. On olemassa tietokoneohjelma (Pabo et al., Biochem. 25:5987-5991 (1986)), joka sallii proteiinin kristallografisesti määritetyn kolmiulotteisen rakenteen tehokkaan skannauksen niiden kohtien ehdottamiseksi, joissa kahden kysteiinin lisääminen saattaisi johtaa disulfidisidoksiin. Sellaiset sidokset eivät riko suurempipittakaavaista konformaatiota, samalla kun ne stabiloivat paikallista konformaatiota.

Alaniinin aminohappokorvauksien glysiinin tilalle α-heliksissä on osoitettu lisäävän bakteriofagi λ-repressorin (Hecht et al., Proteins: Struct. Funct. Genet. 1:43-46 (1986)) ja Bacillus stearothermophilus'ista olevan neutraalin proteaasin (Imanaka et al., Nature 324:695-697 (1986))

lämpöstabiilisuutta. Bakteriofagi T4-lysotsyymin sulamislämpötilan, Tm, kohoaminen toteutettiin kahdella aminohappokorvauksella, joissa alaniini korvattiin proliinilla ja glysiini alaniinilla (Matthews et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:6663-6667 (1987)). Aminohappojen korvaus proteiinin hydrofobisessa ytimessä aromaattisilla tähteillä kuten tyrosiini, erityisesti asemissa lähellä aromaattisten sivuketjujen ennalta esiintyvien ryhmien lähellä on osoitettu edistävän lämpöstabiilisuutta kanamysiininukleotidyylitransferaasissa (Liao et al., Biochem. 83:576-580 (1986)) ja bakteriofagi λ-repressorissa (Hecht et al., Biochem. 81:5685-5689 (1984)).

Transkription- ja translaationkontrollisekvenssit ekspressiovektoreissa ovat avainelementit, joita vaaditaan proteiinien korkean tason tuotantoon bakteereissa. E. coli Trp-, bakteriofagi λPc_L-, E. coli lac UV5- ja Trp-lacUV5-fuusio-(Tac)-promoottorit kuuluvat useimmin käytettyihin prokaryoottisiin promoottoreihin (de Boer et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983); Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press (1989); Remaut et al., Gene 15:81-93 (1981)). Ei ole olemassa tapaa määrittää ekspressoituuko erityistä proteiinia paljon kun transkriptio indusoidaan näistä promoottoreista. Lähettimen, mRNA, translaation tehokkuuden stabiilisuus ja proteiinin luontainen stabiilisuus ovat tärkeimmät tekijät korkean tason ekspressiossa. Sen vuoksi, milloin hyvänsä proteiinissa tapahtuu mutageneesiä, on aina mahdollista, että sen ekspressiotasoon vaikutetaan.

Kohtasuunnattu mutageneesi käyttämällä synteettisiä DNA-oligonukleotideja, joilla on haluttu sekvenssi, sallii valittujen nukleotidien korvauksen, deleetion tai insertion kiinnostavaa proteiinia koodittavan DNA-sekvuenssin sisällä. Yhdistelmä-DNA-menettelytapoja käytetään lisäämään halutun mutaation korvaamalla kohdesekvenssin synteettisellä sekvenssillä. Plasmidien kehittäminen, jotka sisältävät replikaation alun, joka on johdettu lankamaisesta bakteriofagista

(Vieira ja Messing, Methods in Enzymology 153:3 (1987)), sallii fragmenttien kloonaamisen plasmidien yksisäikeisiin muotoihin, joyka pystyvät autonomiseen replikaation. Sellaisten plasmidien käyttö poistaa DNA-fragmenttien plasmideista lankamaisiin bakteriofagivektoreihin alikloonaamisen vaihean tehtävän. Reagenssipakkaukset kohtasuunnatun mutageneesin suorittamiseksi ovat kaupallisesti saatavissa.

2,5-DKG-reduktaasi A:n mutantit, joilla on ominaispiirteet, jotka vaihtelevat natiivista entsyymistä, olisivat käyttökelpoisia. Erityisesti mutantit, joilla on parantunut katalyyttinen aktiivisuus, lisääntynyt lämpöstabiilisuus ja kohonneet ekspressiotasot, olisivat käyttökelpoisia entsyymin kaupallisen hyödyntämisen laajentamisessa.

Epäonneksi ellei proteiineilla ole oleellista sekvenssi- tai rakenteellista homologiaa, ei ole mahdollista tehdä yleistyksiä proteiinien joukossa ennustamaan tarkkaan, yhden proteiinin edullisen mutaation perusteella, missä toista proteiinia koodittavaa sekvenssiä olisi muutettava proteiinin suorituskyvyn parantamiseksi. Sen vuoksi on välttämätöntä suorittaa erityisen muutettavan proteiinin täsmällisten rakenteellisten ja funktionaalisten ominaispiirteiden analyysi. Tämä määrittää, mitkä aminohapot muutetaan halutun tuloksen, kuten lisääntyneen katalyyttisen aktiivisuuden, lämpöstabiilisuuden tai ekspression tuottamiseksi.

Tämä keksintö aikaansaa entsymaattisesti aktiivisen prokaryootti-2,5-DKG-reduktaasi A:n mutasoituja muotoja. Suoritettiin 2,5-DKG-reduktaasi A:n rakenteen analyysi muutosten valitsemiseksi, jotka koodittavat entsyymiä tulokseksi saatujen mutanttien stabiilisuuden, ekspression ja/tai aktiivisuuden lisäämiseksi. Suunniteltiin entsyymiä koodittavan sekvenssin kohtasuunnattu mutageneesi mutanttien tuottamiseksi.

Keksinnön yhteenveto

Keksintö aikaansaa mutantteja, jotka sisältävät 2,5-DKG-reduktaasi A:n erityisiä modifikaatioita, ja materiaaleja ja menetelmiä, jotka ovat käyttökelpoisia näiden proteiinien tuottamisessa, samoin kuin modifioituja mikro-organismeja ja solulinjoja, jotka ovat käyttökelpoisia niiden valmistuksessa. Keksinnön muita näkökantoja ovat mm. ekspressiokonstruktiot ja niiden tuotteet modifioituja 2,5-DKG-reduktaaseja varten, samoin kuin kloonausvektorit, jotka sisältävät modifioituja 2,5-DKG-reduktaaseja koodittavan DNA:n.

Villityyppi 2,5-DKG-reduktaasi A:ta koodittavaa DNA:ta modifioidaan käyttämällä kohtasuunnattua mutageneesiä käyttäen plasmidin yksisäikeistä muotoa, mikä mahdollistaa muutoksen luomisen 2,5-DKG-reduktaasi A:n koodialueen valitussa kohdassa. Tällä menetelmällä 2,5-DKG-reduktaasi A:ta koodittavaan eristettyyn DNA:han lisätään muutos, joka DNA:n ekspression yhteydessä antaa tulokseksi 2,5-DKG-reduktaasi A:ssa ainakin yhden aminohapon korvauksen ennalta määrätyssä kohdassa. Tätä menetelmää käyttämällä 2,5-DKG-reduktaasi A:ta koodittavaan eristettyyn DNA:han myös lisätään muutos, joka DNA:n transkription yhteydessä antaa tulokseksi 2,5-DKG reduktaasi A:n mRNA:ssa ennalta määrätyssä paikassa ainakin yhden nukleotidin korvauksen, joka sallii lisääntyneen ekspression.

Keksinnön mukaisilla modifioiduilla 2,5-DKG-reduktaaseilla ja koodisekvensseillä voi olla parantunut stabiilisuus, ekspressio ja/tai katalyyttinen aktiivisuus, ja niillä voi olla vaihteleva Km ja Vmax.

Piirrosten lyhyt kuvaus

Kuviossa 1 esitetään ekspressiovektori 2,5-DKG-reduktaasi A-geeniä varten;

Kuviossa 2 esitetään ekspressiovektori 2,5-DKG-reduktaasi A:n mutanttimuotojen tuottamiseksi; ja

Kuviossa 3 esitetään kaaviomaisesti ehdotettu malli 2,5-DKG-reduktaasi A:ta varten.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Määritelmiä

Tässä käytettäessä "villityyppi"-2,5-DKG-reduktaasi A viittaa proteiiniin, joka pystyy katalysoimaan stereoselektiivisesti 2,5-DKG:n muutoksen 2-KLG:ksi. Villityyppientsyymi on entsyymi ennen tässä kuvattuja modifikaatioita. Entsyymi on saatu Corynebacterium sp.:stä, joka on johdettu ATCC-kannasta no. 31090 tavalla, joka on kuvattu US-patenttijulkaisussa 5,008,193, joka liitetään tähän viitteeksi.

"Mutantti" "villityyppi"-2,5-DKG-reduktaasi A:n yhteydessä viittaa proteiiniin, jolla on sukulaisaminohapposekvenssi, jolla on oleellisesti sama entsymaattinen aktiivisuus kuin vertailu-2,5-DKG-reduktaasi A:lla siinä, että entsyymi muuttaa 2,5-DKG:tä 2-KLG:ksi. Se sisältää kuitenkin yhden tai useita aminohappokorvauksia, -deleetioita tai aminohappotähteiden insertioita. Nämä tähteet on valittu käyttämällä määrättyjä lähestymistapoja proteiinin niiden alueiden ennustamiseksi, jotka todennäköisimmin sisältävät aktiivisen kohdan tähteet. Yhteen menettelytapaan liittyy sekundaaristen rakenteellisten ennusteiden käyttäminen 2,5-DKG-reduktaasi A:n osoittamiseksi 8-juosteiseksi α/β-tynnyrirakenteeksi. Suoritetaan joukko modifikaatioita geenin modifioimiseksi koodittamaan entsyymin mutantteja, joilla on parantuneet ominaispiirteet verrattuna villityyppientsyymiin 2,5-DKG:n muuttamisessa stereoselektiivisesti 2-KLG:ksi.

Tekniikan alalla on hyvin ymmärrettyä, että useat tässä selityksessä käsitellyistä yhdisteistä, kuten proteiinit ja sakkaridien happamat johdannaiset, voivat esiintyä erilaisissa ionisoitumistiloissa niiden ympäröivistä väliaineista riippuen, jos ne ovat liuoksessa, tai poissa liuoksista, joista ne on valmistettu, jos ne valmistetaan kiinteässä muodossa. Käsitteen kuten esimerkiksi glukonihapon käyttö

merkitsemässä sellaisia molekyylejä on tarkoitettu sisältämään viitatun orgaanisen molekyylin kaikki ionisointitilat. Siten esimerkiksi sekä "D-glukonihappo" että "D-glukonaatti" viittaavat samaan orgaaniseen ryhmään, eikä tarkoitus ole määritellä erityisiä ionisaatiotiloja. On hyvin tunnettua, että D-glukonihappo voi esiintyä ionisoimattomassa muodossa, tai ne voivat olla saatavissa esimerkiksi natrium-, kalium- tai muuna suolana. Ionisoitu tai ionisoimaton muoto, jossa yhdiste liittyy kuvaukseen, joko ilmenee ammattimiehelle asiayhteydestä tai on irrelevanttia. Siten 2,5-DKG-reduktaasi A-proteiini itse ja sen eri mutantit voivat pH-arvosta riippuen esiintyä erilaisissa ionisaatiotiloissa. Käsitteet "2,5-DKG-reduktaasi A" ja "2,5-DKG reduktaasi A:n mutanttimuoto" kattavat kaikki näistä ionisaatiotiloista.

Käsitteeseen "ekspressiovektori" luetaan mukaan vektorit, jotka pystyvät ekspressoimaan niiden sisältämiä DNA-sekvenssejä, kun sellaiset sekvenssit ovat toimintakykyisesti liittyneet muihin sekvensseihin, jotka voivat aikaansaada niiden ekspression. Annetaan ymmärtää, vaikkakaan ei nimenomaisesti mainita, että ekspressiovektorien on oltava replikoituvia isäntäorganismeissa joko episomeina tai kromosomaalisen DNA:n kokonaisuuteen kuuluvana osana. Selvästi replikaation puute tekisi ne tehokkaasti toimintakyvyttömiksi. Lyhyesti, "ekspressiovektorille" annetaan myös funktionaalinen määritelmä. Yleensä ekspressiovektorit, joilla on käyttöä yhdistelmä-DNA-tekniikoissa, ovat usein "plasmidien" muodossa. Plasmidit viittaavat joko rengasmaisiin kaksijuosteisiin DNA-molekyyleihin tai rengasmaisiin yksijuosteisiin DNA-molekyyleihin, jotka sisältävät replikaation aloituskohdan, joka on johdettu lankamaisesta bakteriofagista. Nämä DNA-molekyylit, vektorimuodossaan, eivät ole liittyneet kromosomeihin. Muita tavallisesti käytettyjä tehokkaita vektoreita ovat fagi ja ei-rengasmainen DNA. Tässä selityksessä "plasmidia" ja "vektoria" käytetään usein keskenään vaihdettavasti. Keksintö on kuitenkin tarkoitettu sisältämään sellaiset ekspressiovektorien muut muodot, joilla on samanar-

voiset tehtävät ja jotka ovat tunnettuja tai seuraavaksi tulevat tunnetuiksi.

"Yhdistelmä-DNA-isäntäsoluja", "isäntäsoluja", "soluja", "soluviljelmiä" ja niin edelleen käytetään keskenään vaihdettavasti merkitsemään yksittäisiä soluja, solulinjoja, soluviljelmiä ja kerättyjä soluja, jotka on transformoitu tai on tarkoitettu transformoitavaksi keksinnön mukaisilla yhdistelmä-DNA-vektoreilla. Käsitteisiin luetaan myös alunperin vektorin vastaanottavien solujen jälkeläiset.

"Transformoitu" viittaa mihin hyvänsä prosessiin isännän DNA-sisällön muuttamiseksi. Tähän luetaan mukaan in vitro -transformointimenettelytavat kuten kalsiumfosfaatti- tai DEAE-dekstraani -välitteinen transfektio, elektroporaatio, tumainjektio, fagi-infektio tai muut tekniikan tasolla tunnetut vastaavat tavat DNA:n kontrolloituun vastaanottoon.

Käsitteet "aminohappo" ja "aminohapot" viittaavat kaikkiin luonnollisesti esiintyviin L-α-aminohappoihin. Tämä määritelmä on tarkoitettu sisältämään norleusiinin, ornitiinin ja homokysteiinin. Aminohapot tunnistetaan joko yksikirjaimisilla tai kolmikirjaimisilla nimillä:

Asp	D	asparagiinihappo	Ile	I	isoleusiini
Thr	T	treoniini	Leu	L	leusiini
Ser	S	seriini	Tyr	Y	tyrosiini
Glu	E	glutamiinihappo	Phe	F	fenyylialaniini
Pro	P	proliini	His	H	histidiini
Gly	G	glysiini	Lys	K	lysiini
Ala	A	alaniini	Arg	R	arginiini
Cys	C	kysteiini	Trp	W	tryptofaani
Val	V	valiini	Gln	Q	glutamiini
Met	M	metioniini	Asn	N	asparagiini

Nämä aminohapot voidaan luokitella sivuketjujensa kemiallisen koostumuksen ja ominaisuuksien mukaan. Lyhyesti ne voidaan luokitella kahteen ryhmään, varauksellisiin ja varauk-

settomiin. Kumpikin näistä ryhmistä on jaettu alaryhmiin aminohappojen tarkemmin luokittelemiseksi:

I. Varaukselliset aminohapot
Happamat tähteet: asparagiinihappo, glutamiinihappo
Emäksiset tähteet: lysiini, arginiini, histidiini

II. Varauksettomat aminohapot

Hydrofiiliset tähteet:	seriini, treoniini, asparagiini, glutamiini
Alifaattiset tähteet:	glysiini, alaniini, valiini, leusiini, isoleusiini
Poolittomat tähteet:	kysteiini, metioniini, proliini
Aromaattiset tähteet:	fenyylialaniini, tyrosiini, tryptofaani

Taulukko 1

Alkuperäinen tähde	Konservatiiviset korvaukset
Ala	ser
Arg	lys
Asn	gln; his
Asp	glu
Cys	ser; ala
Gln	asn
Glu	asp
Gly	pro
His	asn; gln
Ile	leu; val
Leu	ile; val
Lys	arg; gln; glu
Met	leu; ile
Phe	met; leu; tyr
Ser	thr
Thr	ser
Trp	tyr
Tyr	trp; phe
Val	ile; leu

Oleellisia muutoksia toimintaan tai stabilisointiin tehdään valitsemalla korvauksia, jotka ovat vähemmän konservatiivisia kuin taulukossa 1 olevat, ts., valitsemalla tähteitä, jotka eroavat merkittävämmin vaikutukseltaan (a) polypeptidirungon rakenteen ylläpitoon korvausalueella, esimerkiksi arkki- tai heliksikonformaatiossa, (b) molekyylin varauksen tai hydrofobisuuden ylläpitoon kohdekohdassa tai (c) sivuketjun pääosan ylläpitoon. Korvauksia, joiden yleensä odotetaan tuottavan suurimmat muutokset, ovat niitä, joissa (a) hydrofiilinen tähde, esimerkiksi seryyli tai treonyyli korvaa hydrofobisen tähteen, esimerkiksi leusyylin, isoleusyylin, fenyylialanyylin, valyylin tai alanyylin(, tai hydrofobinen tähde korvaa hydrofiilisen tähteen); (b) kysteinyyli tai prolyyli korvaa minkä hyvänsä muun tähteen(, tai mikä hyvänsä muu tähde korvaa kysteinyylin tai prolyylin); (c)

tähde, jossa on elektropositiivinen sivuketju, esimerkiksi lysyyli, arginyyli tai histidyyli, korvaa elektronegatiivisen tähteen, esimerkiksi glutamyylin tai aspartyyli(, tai elektronegatiivinen tähde korvaa tähteen, jossa on elektropositiivinen sivuketju); tai (d) tähde, jossa on suurikokoinen sivuketju, esimerkiksi fenyylialanyyli, korvaa tähteen, jossa ei ole sivuketjua, esimerkiksi glysyylin(, tai tähteetön sivuketju korvaa tähteen, jossa on suurikokoinen sivuketju).

Yleiset menetelmät

Useimmat tekniikoista, joita käytetään solujen transformointiin, vektorien konstruointiin, aikaansaamaan hybridisoitumisen koettimen kanssa, suorittamaan kohtasuunnatun mutageneesin, ja vastaaviin tehtäviin, samoin kuin mutanttien valintaan, ovat tekniikan alalla laajalti harjoitettuja. Useimmat ammatinharjoittajat tutntevat standardilähdemateriaalit, joissa kuvataan erityiset olosuhteet ja menettelytavat (katso esimerkiksi teosta Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboracory Manual, Cold Spring Harbor Press (1989). Seuraavat kappaleet esitetään kuitenkin lisäohjeeksi.

2,5-DKG-reduktaasi A-ekspressio

Täydellinen funktionaalinen geeni liitetään sopivaan ekspressiovektoriin, joka sisältää promoottorin ja ribosomin sitoutumiskohdan, joka on toimintakykyinen isäntäsolussa, johon koodisekvenssi transformoidaan. Tekniikan nykytilassa on saatavilla joukko promootio/kontrolli-järjestelmiä ja sopivia prokaryoottisia isäntiä, jotka ovat keksinnön mukaisesti sopivia. Samanlaisia isäntiä voidaan käyttää sekä kloonaukseen ja ekspressioon, koska prokaryootit ovat yleensä edullisia DNA-sekvenssien kloonaukseen. Menetelmä 2-KLG-tuotantoon liittyy mukavimmin sellaisiin mikrobijärjestelmiin. E. coli K12 kanta 294 (ATCC No 31446) on erityisen käyttökelpoinen kloonausisäntänä. Muita mikrobikantoja, joita voidaan käyttää, ovat mm. E. coli-kannat kuten E. coli B,

E. coli X1776 (ATCC No. 31537) ja E. coli DH-1 (ATCC No. 33489). Ekspressioon voidaan käyttää edellä mainittuja kantoja, samoin kuin E. coli W3110:tä (F-, λ-, prototrofinen ATCC No. 27325), basilleja kuten Bacillus subtilus, ja muita enterobakteereja kuten Salmonella typhimurium tai Serratia marcesans, ja erilaisia Pseudomonas-lajeja. Erääseen erityisen edulliseen isäntäryhmään luetaan mukaan ne kulttuurit, jotka pystyvät muuttamaan glukoosia tai muita yleisesti saatavia metaboliitteja 2,5-DKG:ksi. Esimerkkejä sellaisista isännistä esiintyy yleensä suvuissa Acetobacter, Gluconobacter, Acetomonas ja Erwinia. Näiden sukujen taksonomia ja terminologia ovat sellaiset, että samoille tai samanlaisille kannoille annetaan toisinaan erilaiset nimet. Esimerkiksi Acetobacter cerinus, jota käytetään alla olevassa esimerkissä, kutsutaan myös nimellä Gluconobacter cerinus. Esimerkkejä erityisistä isännistä ovat rajoittumatta mm. Erwinia herbicola ATCC No. 21998 (kutsutaan myös nimellä Acetomonas albosesamae US-patenttijulkaisussa 3,998,697); Acetobacter (Gluconobacter) oxydans alalaji melanozenes, IFO 3292, 3293 ATCC No. 9937; Acetobacter (Gluconobacter) cerinus IFO 3263 IFO 3266; Gluconobacter rubiginous, IFO 3244; Acetobacter fragum ATCC No. 21409; Acetobacter (Acetomonas) suboxydans alalaji industrious ATCC No. 23776.

Yleensä näiden isäntien yhteydessä käytetään plasmidiekspressio- tai kloonausvektoreita tai konjugatiivisia plasmideja, jotka sisältävät replikaatio- ja kontrollisekvenssit, jotka on johdettu lajista, joka on yhteensopiva isäntäsolun kanssa. Tavallisesti vektori sisältää replikaation alun samoin kuin merkkigeenit, jotka pystyvät aikaansaamaan fenotyyppivalinnan transformoiduissa soluissa. Esimerkiksi E. coli transformoidaan tyypillisesti käyttämällä pBR322:ta, plasmidia, joka on johdettu E. coli -kannasta (Bolivar et al., Gene 2:95 (1977)). pR322 sisältää geenit ampisilliini- ja tetrasykliiniresistenssiä varten ja antaa siten käyttöön helpon tavan transformoitujen solujen tunnistukseen. Ekspressiossa käyttöä varten pBR322-plasmidin tai muun mikro-

biaalisen plasmidin on myös sisällettävä, tai oltava modifioitu sisältämään, promoottorit, joita mikrobiorganismi voi käyttää omien proteiiniensa ekspressioon. Promoottoreita, joita tavallisimmin käytetään yhdistelmä-DNA-konstruktiossa, ovat mm. ß-laktamaasi(penisillinaasi)- ja laktoosipromoottorijärjestelmät (Chang et al., Nature 273:615 (1978); Itakura et al., Science 198:1056 (1977); Goeddel et al., Nature 281:544 (1979)) ja tryptofaani(trp) -promoottorijärjestelmä (Goeddel et al., Nucleic Acids Res. 8:4057 (1980); EPO-patenttihakemus 0036776). Vaikka nämä ovat tavallsiimmin käytettyjä, on keksitty ja käytetty muita mikrobipromoottoreita. Niiden nukleotidisekvensseihin liittyvät yksityiskohdat on julkaistu, mahdollistaen ammattimiehen liittää ne funktionaalisesti toimintakykyiseen suhteeseen transformaatiovektoreissa oleviin geeneihin. (Siebenlist et al., Cell 20: 269 (1980)).

Sopivalla katkaisulla ja liittämisellä edellä mainittuihin vektoreihin voidaan sisällyttää edellä luonnehditulla tavalla DNA-sekvenssejä, jotka koodittavat 2,5-DKG-reduktaasi A:ta. Kaikki tarpeettomat ja estosekvenssit voidaan poistaa, ja sitten prokaryoottinen entsyymi voidaan puhdistaa; tai ehjiä tai rikottuja soluja käytetään suoraan katalysaattoreina. Vaihtoehtoisesti isäntä voidaan valita niin, että kerran transformoiduttuaan se pystyy aikaansaamaan glukoosin tai muun sopivan metaboliitin koko muutoksen halutuksi 2-KLG-tuotteeksi.

Sekä villityyppiplasmidi-DNA että mutanttiplasmidi-DNA 2,5-DKG-reduktaasi A:ta varten transfektoidaan isäntään entsyymiekspressiota varten. Yhdistelmä-DNA-isäntäsoluja kasvatetaan entsyymiekspressiota suosivissa olosuhteissa. Tavallisesti valintapaine toimitetaan antibiootin läsnäololla. Antibioottiresistenssiä koodittaa vektori. Kasvatus näissä olosuhteissa antaa tulokseksi suuremmat entsyymisaannot kuin emäorganismin villityyppientsyymisynteesi. Näin on tapaus, vaikka juuri emäorganismi on transformoitu.

Vektorin konstruointi mutageneesiä varten

Anderson et al. on kuvannut plasmidi ptrp1-35:n konstruoinnin US-patenttijulkaisussa 5,008,193, joka liitetään tähän viitteeksi, joka sisältää kloonatun DKG-reduktaasi A-geenin E. coli trp-promoottorin kontrollin alaisena (kuvio 1). Eräs tämän plasmidin johdannainen konstruoidaan, muutamin vähäisin modifikaatioin 2,5-DKG-reduktaasi A:n mutanttimuotojen konstruoinnin ja karakterisoinnin helpottamiseksi. Nämä modifikaatiot kuvataan alla. Lopullista plasmidikonstruktiota kutsutaan nimellä pSStac.DKGR.AAA, ja se esitetään kuviossa 2.

A) 2,5-DKG-reduktaasi A:n rakennegeeni mutasoidaan sisältämään kolme uutta restriktioentsyymikohtaa muiden mutageneesitutkimusten helpottamiseksi. Nämä kolme kohtaa ovat "hiljaisia," ts., tulokseksi saadun DKGR A-proteiinin aminohapposekvenssi pysyy muuttumattomana.

B) Promoottori pSStac.DKGR.AAA:ssa on tac II-promoottori, joka on kuvattu julkaisussa: Boer et al.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983), trp-promoottorin sijasta, joka esiintyy ptrp1.35:ssä. Tämä on modifioitu versio trp-promoottorista, joka sisältää sitoutumiskohdan lac-repressoria varten, sallien geenin ekspression säätelyn soluissa, jotka ekspressoivat lac-repressoria.

C) Plasmidia modifioidaan edelleen sisältämään replikaation alun yksijuosteisesta lankamaisesta fagista f1.

Tämän DNA-sekvenssin käyttö plasmideissa on tekniikan alalla hyvin tunnettu plasmidin yksijuosteisen muodon tuottamiseksi sekvensöintiä ja mutageneesiä varten.

Kohtasuunnattu mutageneesi

Haluttujen modifikaatioiden valinnan jälkeen 2,5-DKG-reduktaasi A:ta koodittava DNA-sekvenssi alistetaan kohtasuunnatulle mutageneesille ennalta määrätyissä asemissa sekvenssin

sisällä valittuja aminohappoja koodittavien nukleotidien korvaamiseksi.

Edullinen menettelytapa kohtasuunnattua mutageneesiä varten suoritetaan kloonaamalla villityyppientsyymiä koodittavan DNA-sekvenssin yhdistelmä-DNA-plasmidiin, joka sisältää replikaation alun, joka on johdettu yksijuosteisesta bakteriofagista. Sitten käytetään sopivaa aluketta muuttamaan tähteen identifioidussa asemassa esimerkiksi konservatiiviseksi aminohappokorvaukseksi. Synteettistä oligonukleotidialuketta, joka on komplementaarinen halutulle sekvenssille, paitsi rajallisen yhteensopimattomuuden alueilla, käytetään alukkeena syntetisoitaessa juostetta, joka on komplementaarinen yksijuosteiselle villityyppi-2,5-DKG-reduktaasi A-sekvenssille plasmidivektorissa. Tulokseksi saatu kaksijuosteinen DNA transformoidaan isäntäbakteeriin. Transformoitujen bakteerien viljelmiä siirrostetaan agarlevyille, jotka sallivat kolonian muodostumisen yksittäisistä soluista, jotka sisältävät plasmidin. Teoreettisesti 50 % kolonioista koostuu plasmidista, joka sisältää mutanttimuodon; 50 %:ssa on alkuperäinen sekvenssi. Koloniat hybridisoidaan radioleimatun synteettisen alukkeen kanssa ankarissa olosuhteissa, jotka sallivat hybridisoinnin vain mutanttiplasmidin kanssa, joka muodostaa täsmällisen vastineen koettimen kanssa. Sitten hybridisoituvat koloniat poimitaan ja kasvatetaan, ja mutanttiplasmidi-DNA otetaan talteen.

Kohtien valinta mutanttien mutageneesiin villityyppi-2,5-DKG-reduktaasi A-geeniä varten

Ratkaisevaa kohtien valinnalle mutageneesiä varten on villityyppientsyymin sekundaarisen ja tertiaarisen rakenteen ennustaminen. Sekundaarisen rakenteen ennustukset suoritetaan seuraavalla tavalla. Ensiksi 2,5-DKG-reduktaasien A ja B ja viiden muun homologisen entsyymin (prostaglandiini F-syntaasi, naudan linssin ja rotan linssin aldoosireduktaasi, ihmisen maksan aldehydireduktaasi, ja ρ-kristalliini sammakon silmän sinssistä) sekvenssit asetetaan rinnakkain konservoi-

tujen tähteiden lukumäärän paljastamiseksi. Toiseksi, sekvenssit alistetaan joukolle rakenteenennustusalgoritmejä (Chou ja Fasman, Adv. Enzymol. 47:45-148 (1978); Garnier et al., J. Mol. Biol. 120:97-120 (1978); Wilmot ja Thornton, J. Mol. Biol. 203:221-232 (1988); Karplus ja Schulz, Naturwissenschaften 72:212-214 (1985); Eisenberg et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81:140-144 (1984); Rose ja Roy, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77:4643-4647 (1980)), jotka ovat tekniikan alalla hyvin tunnettuja. Nämä ennusteet järjestetään ja verrataan entsyymin sekundaarisen rakenteen raakamallin johtamiseksi 8-juosteisena α/ß-tynnyrinä. Tämä sekundaarisen rakenteen ennuste on yhdenmukainen aikaisemmin ratkaistujen homologisten entsyymien sekundaaristen rakenteiden kanssa, joissa on 8-juosteisen α/ß-tynnyrin laskos (Rondeau et al., Nature 355:469-472 (1992); Wilson et al., Science 257:81-84 (1992)).

Tynnyrirakenne koostuu kahdesta komponentista. Ensimmäinen komponentti on ydin kahdeksasta yhteenpunotusta samansuuntaisesta ß-juosteesta, jotka ovat järjestäytyneet tiiviisti yhteen, kuten sauvat, tynnyriksi. Tätä tynnyrirakennetta ympäröi toinen komponentti kahdeksasta α-heliksistä, jotka ovat liittyneet ß-juosteisiin erimittausten silmukoiden kautta. Tätä 8-juosteista α/ß-tynnyrirakennetta kutsutaan triosefosfaatti-isomeraasi(TIM)-tynnyriksi entsyymistä, jolla tämä rakenne ensin havaittiin. α/ß-tynnyrin laskosmuoto esiintyy 17 entsyymillä, joiden kiderakenteet tunnetaan. Itse asiassa noin 10 % tunnetuista entsyymirakenteista on α/ß-tynnyreitä (Farber ja Petsko, TIBS 15 (kesäkuu 1990)). 17 tunnetulla α/ß-tynnyrientsyymillä on yhteinen α/ß-tynnyriydin; substraatti- ja kofaktorispesifisyys tulee vaihtelevista silmukoista, jotka liittävät ß-juosteet ja α-heliksit yhteen.

2,5-DKG-reduktaasi A:n ehdotettu sekundaarinen rakennemalli, perustuen aldoosireduktaasiperheen (katso edellä) jäsenten sekundaarisen rakenteen ennustusten yhtäpitävyyden perus-

teella, esitetään kaaviomaisesti kuviossa 3, jossa ß-juosteet esitetään muolilla ja α-heliksit esitetään sylintereinä. Polypeptidiketjun alueet, jotka yhdistävät sekundaarisen rakenteen ennustetut elementit, näytetään määrittelemättömän rakenteen omaavina. Läsnä on N- ja C-terminaaliset ulokkeet, joiden pituudet ovat 34 ja 17 aminohappoa, vastaavasti. Sellaiset ulokkeet TIM-tynnyrientsyymeissä muodostavat usein α-heliksejä, jotka menevät kokoon tynnyrin päälle tai alle. Jonkin kahdeksan silmukan alaryhmän ß-arkin C-terminaalisessa päässä (kuvion 3 yläosaa kohden), samoin kuin C-terminaalisen "hännän" (asemat 262-278) ajatellaan käsittävän entsyymin aktiivisen kohdan, kuten muissakin TIM-tynnyrientsyymeissä. Vaikka tämä rakenne on vain karkea malli, se helpottaa entsyymin järkiperäistä rakennusta sallimalla polttopisteen kohdistamisen niiden tähteisiin, jotka esiintyvät ehdotetuissa aktiivisen kohdan silmukoissa. On selvää, että lisätähteet ehdotettujen silmukoiden ja "hännän" lähellä voivat myös käsittää osan aktiivisesta kohdasta.

Sellaista informaatiota kuin mitkä aminohapot käsittävät entsyymin aktiivisen kohdan, voidaan kerätä kyseessä olevan entsyymin tosiasiallisen kolmiulotteisen muodon tuntemuksesta, joka saadaan röntgenkristallografisista - tai NMR-tutkimuksista. 2,5-DKG-reduktaasin tapauksessa ei sellaista rakenneinformaatiota vielä ole julkaistussa kirjallisuudessa. Sen vuoksi eräs vaihtoehtoinen toimintasuunnitelma sellaisessa tapauksessa olisi mallin käyttö 2,5-DKG-reduktaasi A:ta varten edellä kuvattuna α/ß-tynnyrinä mahdollisten yhden aminohapon korvausten rajoittamiseksi niihin tähteisiin, jotka esiintyvät ehdotetuissa aktiivisen kohdan silmukoissa.

Sellaisella lähestymistavalla tunnistetaan kolme pintasilmukkaa, jotka ovat 2,5-DKG-reduktaasi A:n substraatinsitomiskohta. Nämä silmukat ovat asemissa 165 - 168, 187 - 198 ja 224 - 234. Näissä silmukoissa tehdään 12 2,5-DKG-reduktaasi A-mutantin sarja. Tämä sarja käsittää lähes kaikki

mahdolliset pistekorvaukset 2,5-DKG-reduktaasi B-sekvenssistä. Monilla näistä mutanteista nähdään merkitykselliset alenemiset aktiivisuudessa 2,5-DKG:n muuttamiseksi 2-KLG:ksi, myös vaikka aminohappoihin tehdään vain vähäisiä tai konservatiivisia muutoksia. Yhdellä mutanteista, jossa on glutamiini korvattu arginiinilla 2,5-DKG-reduktaasi A-sekvenssin asemassa 192, on parantunut kyky muuttaa 2,5-DKG:tä 2-KLG:ksi. Tämän "Q192R"-nimisen mutantin konstruointi kuvataan esimerkissä 2.

Nämä 12 mutanttia ekspressoidaan Acetobacter cerinus'issa ja määritetään 2,5-DKG:n 2-KLG:ksi muuttamisen suhteen raakalysaattivaiheessa. Taulukko 2 alla sisältää kahdentoista 2,5-DKG-reduktaasi A-mutantin aktiivisuuksien vertailun villityyppi-2,5-DKG-reduktaasi A:han ja -2,5-DKG-reduktaasi B:hen verrattuna. Taulukon 2 määritykset suoritetaan alla taulukossa 3 kuvatulla tavalla. Vaikka Q192R:n lisääntynyttä aktiivisuutta raakalysaattitasolla peittävät jonkin verran taustareduktaasiaktiivisuuden korkeat tasot, kuten pBR322-kontrollilysaateissa nähdään, se on siitä huolimatta merkittävä ja toistettavissa. Tiedot pBR322:lle, villityyppientsyymille, ja Q192R-mutantille taulukossa 2 ovat keskiarvo kolmesta erillisestä lysaattimäärityksestä. Olettamalla, että taustareduktaasiaktiivisuudella on näissä lysaateissa yksinkertainen additiivinen myötävaikutus, nämä tiedot osoittavat, että Q192R-mutantti on kaksi kertaa niin aktiivinen kuin villityyppientsyymi 2,5-DKG:tä kohtaan. Puhdistetun Q192R:n kineettisten vakioiden karakterisointi antaa tälle entsyymille tulokseksi parantuneen Km- ja Vmax-arvon villityyppi-2,5-DKG-reduktaasi A:han verrattuna. Katso esimerkkiä 5. Siten Q192R:llä nähdään parannus luonnolliseen entsyymiin verrattuna sekä spesifisyydessä (Km) että muutosnopeudessa (Vmax).

Samalla tavalla kuin edellä kuvattiin, C-terminaalinen "häntä" tunnistetaan myös aktiivisen kohdan osaksi. Suunnitellaan katkaisumutantti, joka antaa tulokseksi polypeptidi

päättymisen 2,5-DKG-reduktaasi A:n kahdeksan viimeisen aminohappotähteen edellä. Tämän mutantin havaitaan ekspressoituvan hyvin, ja kofaktorinsitoutumiskohta on säilynyt, mutta, kuten taulukossa 2 alla esitetään, se on ehdottomasti tehoton käytettäessä 2,5-DKG:tä substraattina. Näillä kriteereillä C-terminaalisen "hännän" päätellään käsittävän osan sitoutumistaskusta 2,5-DKG:tä varten.

Taulukko 2

	Lysaatin identiteetti	% villityypistä 2,5-DKG:llä
pBR322 (kontrolli)		0 %
2,5-DKG-reduktaasi A		100 %
2,5-DKG-reduktaasi B		>>>600 %
(glysiini alaniiniksi asemassa 191)	G191A-mutantti	1 %
(glutamiini arginiiniksi asemassa 192)	Q192R-mutantti	200 %
(glysiini poistettu asemassa 193)	G193-deletoitu mutantti	0 %
(lysiini arginiiniksi asemassa 194)	K194R-mutantti	8 %
(tyrosiini seriiniksi asemassa 195)	Y195S-mutantti	6 %
(alaniini tyrosiiniksi asemassa 167)	A167Y-mutantti	0 %
(tyrosiini fenyylialaniiniksi asemassa 168)	Y168F-mutantti	2 %
(glutamiini proliiniksi asemassa 169)	Q169P-mutantti	15 %
(lysiini leusiiniksi asemassa 225)	K225L-mutantti	5 %
(fenyylialaniini seriiniksi asemassa 227)	F227S-mutantti	12 %
(valiini treoniiniksi asemassa 228)	V228T-mutantti	23 %
(valiini proliiniksi asemassa 229)	V229P-mutantti	22 %
(lopetuskodoni asemassa 271)	katkaisumutantti (viimeiset 8 aminohappoa puuttuvat)	0 %

Käyttämättä α/β-tynnyrimallia ohjeena on kaikkien mahdollisten yksittäisten aminohappokorvausten sattumanvarainen haku välttämätön. Tämä vaatii 170 sellaisen entsyymin konstruoinnin ja määrityksen, mikä heijastaa entsyymien välisiä eroja

mahdolliseen 2,5-DKG-reduktaasi B-tyyppisen aktiivisuuden hankkimiseen 2,5-DKG-reduktaasi A-kehään.

Glysiinitähteet α-helikseissä, jotka voivat hyväksyä korvatusta metyyliryhmästä johtuvan lisääntyneen tilavuuden, korvataan alaniinitähteillä stabilisoinnin lisäämiseksi. Aromaattisten amiinihappotähteiden kuten tyrosiinin, fenyylialaniinin ja tryptofaanin lisääminen aromaattisten ryhmien lähelle entsyymin sisällä kuuluvat myös keksinnön suojaalaan. Nämä aromaattiset lisätähteet stabiloivat entsyymiä kohdissa, joissa sellaisten aromaattisten ryhmien lisääminen ei vääristä kokonaiskonformaatiota.

Mutaatiot erityisissä kohdissa proteiinissa voivat johtaa tuon proteiinin lisääntyneeseen ekspressioon bakteereissa. Nykyisin ei ole olemassa tapaa ennustaa mitkä mutaatiot johtavat lisääntyneeseen ekspressioon. On kuitenkin tunnettua, että translaation tehokkuuden, mRNA-stabiilisuuden ja lisääntyneen proteiinistabiilisuuden tekijöillä on keskeinen merkitys korkean tason ekspressiossa.

Useat muista mahdollisista pistemutanteista luodaan 1 - 4 läheisesti sijatsevan aminohappokorvauksen ryhmissä. Stabiilisti laskostuneista mutanteista vain niillä, jotka kuuluvat 165 - 168-silmukkaan, 187 - 198-silmukkaan, 224 - 234-silmukkaan ja C-terminaaliseen "häntään" (262 - 278), on villityyppientsyymiin verrattuna selvästi erilainen aktiivisuus. Tämä on lisävarmistus sille, että nämä silmukka- ja häntäalueet käsittävät entsyymin aktiivisen kohdan.

Mikä hyvänsä joukko tässä ehdotetuista mutaatioista voidaan yhdistyä yhdessä ainoassa mutantissa. Ilmeisesti erityinen korvaus yhdessä paikassa sulkee pois korvauksen toisella aminohapolla tuossa samassa asemassa tuossa erityisessä mutantissa.

Seuraavat esimerkit esitetään keksinnön kuvaamiseksi ja aut-

tamaan ammattimiestä sen tekemisessä ja käytössä. Esimerkkejä ei ole tarkoitettu millään lailla muuten keksinnön suojaalaa rajoittaviksi.

Esimerkki 1

Plasmidin pSStac.DKGR.AAA konstruointi mutageneesiä varten

Erä plasmidia ptrpl-35 sulatettiin EcoRI- ja HindIII-restriktioentsyymillä, ja tulokseksi saatu 1690 emäsparin fragmentti puhdistettiin agaroosigeelielektroforeesilla. Sitten tämä fragmentti liitettiin EcoRI:llä ja HindIII:lla sulatettuun vektori M13 mp19:ään. Tulokseksi saatua yhdistelmä-DNA-fagia (nimeltään M13 mp19.DKGRA) käytettiin fagin yksijuosteisen templaattimuodon eristämiseen seuraavaa mutageneesiä varten. Templaatti mutagenisoitiin kolmella oligonukleotidilla kolmen uuden restriktioentsyymikatkaisukohdan lisäämiseksi 2,5-DKG-reduktaasi A-geeniin. Nämä kohdat ovat kaikki 'hiljaisia' siinä, että vaikka ne lisäävät DNA-sekvenssiin uuden restriktiohatkaisukohdan, koodattu proteiinin aminohapposekvenssi pysyy muuttumattomana geneettisen koodin degeneraatiosta johtuen. Kolme mutageenistä oligonukleotidia ja lisätyt muutokset ovat seuraavanlaiset: 1) oligonukleotidi XbaA:lla on sekvenssi 5'CGCGAAGCTGGCTCTAGATCAGGTCGAC 3' ja lisää uuden XbaI-kohdan aminohappoasemaan 98; 2) oligonukleotidi ApaA:lla on sekvenssi 5' ATCGTGGGGGCCCCTCGGTCAGGGC 3' ja lisää uuden ApaI-kohdan aminohappoasemaan 188; ja 3) oligonukleotidi KpnA:lla on sekvenssi 5' GAGGTCGACTGAGGTACCCGAACACCCG 3' ja lisää uuden KpnI-kohdan välittömästi lopetuskodonin (TGA) jälkeen viimeisen aminohapon jälkeen. Mutageneesireaktio ja olosuhteet olivat oleellisesti samat kuin esimerkissä 2 kuvataan mutantin Q192R konstruoinnille. Mutageneesireaktion jälkeen positiiviset täplät tunnistettiin hybridisoimalla mutageeniseen oligonukleotidiin ankarissa olosuhteissa, ja koko 2,5-DKG-reduktaasi A-fragmentin koodialue sekvensöitiin mutaatioiden varmistamiseksi.

Plasmidi pSStac.DKGR.AAA konstruoitiin seuraavien fragmeinttien kolmitieliitoksena: 1) EcoRI:stä HindIII:een mutageni-

soidusta fagi M13 mp19.DKGRA:sta, joka kuvataan edellä, tämä sisältää koodigeenin 2,5-DKG-reduktaasi A:ta varten; 2) PstI:stä EcoRI:een-fragmentti (850 emäsparia) plasmidista ptac6 (ptac6 on ekvivalentti plasmidin ptrpl-35 kanssa, mutta sisältää tac-promoottorin, jonka on kuvannut de Boer et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983)) ptrpl-35:ssä esiintyvän trp-promoottorin sijasta), ja 3) ~4 000 emäsparin vektorifragmentin plasmidi p690:n HindIII:sta PstI:een. p690-plasmidi on plasmidi pBR322:n johdannainen, jossa on RsaI/DraI-restriktiofragmentti bakteriofagi f1:n genomista (nukleotidit 5489 - 5946), joka sisältää yksijuosteisen DNA-replikaation alun PvuII-kohtaan insertoituna.

Edellä kuvatut kolme fragmenttia eristettiin agaroosigeeli-elektroforeesilla, puhdistettiin ja liitettiin suunnilleen ekvimolaarisissa suhteissa, ja käytettiin transformoimaan kompetentteja E. coli -soluja. Tulokseksi saadut koloniat analysoitiin restriktiokartoituksella oikean konstruktion tunnistamiseksi, jota kutsutaan nimellä pSStac.DKGR.AAA (kuvio 2).

Esimerkki 2

2,5-DKG-reduktaasi A-geenin kohtasuunnattu mutageneesi

A. Templaatti-DNA:n valmistus mutageneesiä varten

E. coli-soluja (kanta XL1-Blue, Stratagene Corporation), joka sisältää plasmidin pSStac.DKGR.AAA, kasvatettiin LB-väliaineessa (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, A.1 (1989)) varhaiseen log-faasiin, ja infektoitiin auttajafagi VCS-M13:lla (Stratagene). Infektio auttajafagilla aikaansaa tarvittavat faktorit plasmidi pSStac.DKGR.AAA:n yksijuosteisen muodon pakkausta ja eritystä varten. Infektoituja soluja kasvatettiin yön yli ravistellen 37 °C:ssa, ja seuraavana päivänä solut poistettiin sentrifugoimalla nopeudella 10 000 r/min 10 min ajan Sorvall SM24-roottorissa. Pakatun plasmidin sisältävä supernatantti pidätettiin, ja solupelletti heitettiin pois. Pakattu plasmidi saostettiin lisäämällä 1/4-tila-

vuuden 2,5 M NaCl:ää, 20 % PEG (polyetyleeniglykoli). Lisäyksen jälkeen seosta varastoitiin huoneenlämpötilassa 20 min ajan, ja sitten saostuma otettiin talteen sentrifugoimalla.

Saostuna liuotettiin 0,4 ml:aan TE-puskuria (10 mM tris, pH 7,5, 1 mM EDTA) ja puhdistettiin edelleen useilla peräkkäisillä uutoilla yhtäsuurella tilavuudella 50:50 kloroformi: fenolia. Kunkin uuton jälkeen (ylempi) vesifaasi säästettiin. Puhdas plasmidi saostettiin 2 tilavuudella jääkylmää etanolia. Saostuma otettiin talteen sentrifugoimalla, ja liuotettiin TE-puskuriin. Plasmidin konsentraatio arvioitiin mittaamalla optisen absorbanssin 260 nm:llä käyttämällä muunnosta 1 OD_{260} = 40 µg yksijuosteista DNA:ta/ml. Plasmidin konsentraatio säädettiin TE:llä tasolle 1 µg/ml.

B. Oligonukleotidialukkeen fosforylointi

Syntetisoitiin synteettinen oligonukleotidi, jolla on sekvenssi 5′ GCCCCTCGGTCGCGGCAAGTACG 3′, ja fosforyloitiin seuraavalla tavalla: oligonukleotidi laimennettiin konsentraatioon 5,0 OD_{260}-yksikköä/ml. Sitten 2,5 µl oligonukleotidia yhdistettiin 3 µl:n kanssa 10x kinaasipuskuria (1 M tris pH 8,0, 100 mM $MgCl_2$, 70 mM ditiotreitoli, 10 mM ATP), 25 µl:n kanssa vettä, ja 2 yksikön kanssa T4-polynukleotidikinaasia (New England Biolabs). Seosta inkuboitiin 37 °C:ssa 15 min ajan, sitten kinaasientsyymi inaktivoitiin kuumentamalla 70 °C:seen 10 min ajan.

C. Mutageneesireaktio

6 µl kinasoitua aluketta yhdistettiin 1 µg:n kanssa templaatti-DNA:ta ja 2,5 µl:n kanssa 10x RB-puskuria (70 mM tris, pH 7,5, 50 mM merkaptoetanolia, 550 mM NaCl:ää, ja 1 mM EDTA) kokonaistilavuudessa 10,5 µl. Aluke emäspariutettiin templaattiin kuumentamalla seosta 65 °C:seen 5 min ajan, sitten jäähdytettiin hitaasti huoneenlämpötilaan 30 minuutin aikana.





Emäspariutusseokseen lisättiin 1,5 µl 10x RB-puskuria, 1 µl 10 mM ATP:tä, 1 µl 10 mM DTT:tä (ditiotreitoli), ja 1 µl T4-DNA-ligaasia (New England Biolabs). 10 min kuluttua lisättiin 1 µl 1 M $MgCl_2$:ta, 1 µl 5 mM dNTP'itä (dATP:n, dCTP:n, dGTP:n ja dTTP:n ekvimolaarinen seos) ja 0,5 µl Klenow'ia (DNA-polymeraasi I:n suuri fragmentti, New England Biolabs), ja seosta inkuboitiin 15 °C:ssa yön yli.

Seuraavana päivänä pakastettuja kompetentteja E. coli MutL-soluja transformoitiin reaktioseoksen erän kanssa, ja siirrostettiin agarlevyille, jotka sisälsivät antibioottivalintaa (12,5 µg/ml tetrasykliiniä, 50 µg/ml ampisilliinia). Mutanttiplasmideja sisältävät koloniat tunnistettiin aluksi hybridisoimalla alkuperäiseen mutageeniseen oligonukleotidiin ankarissa olosuhteissa (Wood et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:1585-1588 (1988)). Sitten valmistettiin mutanttiplasmideja yksijuosteisessa muodossa kuten osassa A, ja varmistettiin plasmidin suodalla DNA-sekvensöinnillä (United States Biochemical Corporation, Sequenase-sekvensöintireagenssipakkaus). Tulokseksi saadulla mutantti-Q192R-2,5-DKG-reduktaasi A:lla, kuten esimerkissä 5 osoitetaan, oli parantunut katalyyttinen aktiivisuus villityyppi-2,5-DKG-reduktaasi A:han verrattuna.

Esimerkki 3

Villityyppi-2,5-DKG-reduktaasi A:n ekspressio Acetobacter cerinus'issa

Plasmidi-DNA:ta lisättiin Acetobacter cerinus'iin (ATCC No. 39140) elektroporaatiolla kuvatulla tavalla (Wirth et al, Mol. Gen. Genet. 216(1):175-177 (maaliskuu 1989)) Genepulser-laitetta (Biorad Corporation) käyttämällä. Soluja kasvatettiin log-faasin keskiväliin (OD_{550} ~0,2 - 0,8) 100 ml:ssa LB-väliainetta ja otettiin talteen sentrifugoimalla nopeudella 5 000 r/min Sorvall SS-34-roottorissa 5 min ajan 4 °C:ssa. Solut suspendoitiin uudelleen puoleen tilavuuteen jääkylmää elektroporaatiopuskuria (300 mM sakkaroosia, 7 mM natriumfosfaattipuskuria, pH 7,0, ja 1 mM $MgCl_2$:ta), pelle-

töitiin jälleen sentrifugoimalla, ja suspendoitiin lopuksi uudelleen 1/20-tilavuuteen elektroporaatiopuskuria, ja varastoidaan käyttöön asti jäissä.

Plasmidi-DNA:ta (0,1 - 1,0 µg) lisättiin 0,4-cm elektroporaatiokyvettiin (Biorad Corporation), joka sisälsi 0,8 ml valmistettuja Acetobacter-soluja. Solut ja DNA sekoitettiin kyvetissä ja jäähdytettiin jäissä 10 min ajan ennen elektroporaatiota. Solut ja DNA saivat yhden ainoan pulssin jännitteellä 2530 mV käyttämällä kapasitoriasetusta 25 µF, ja laimennettiin välittömästi 3,0 ml:aan tuoreilla LB-väliaineilla. Sitten laimennettujen solujen annettiin toipua ravistellen 30 °C:ssa 2 tunnin ajan. Erät (10 - 100 µl) transformoituja soluja siirrostettiin levyille selektiivisille väliaineille (LB-agarlevyt, jotka sisälsivät 50 µg/ml ampisilliinia ja 12,5 µg/ml tetrasykliiniä), ja levyjä kasvatettiin yön yli 30 °C:ssa.

Esimerkki 4

Mutantti-Q192R- ja villityyppi-2,5-DKG-reduktaasi A:n puhdistus

Yksittäisiä kolonioita transformoiduista Acetobacter cerinus -soluista kasvatettiin 200 ml:ssa 2 X YT-väliainetta (Sambrook et al., Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, A.3 (1989)), joka sisälsi antibiootteja (12,5 µg/ml tetrasykliiniä ja 50 µg/ml ampisilliinia) 30 °C:ssa yön yli. Solut otettiin talteen sentrifugoimalla (15 min nopeudella 8 000 r/min Sorvall GS3-roottorissa) ja varastoitiin pakastettuna. Sitten solut sulatettiin 1/5-tilavuudessa lyysipuskuria (50 mM tris, pH 8,0, 50 mM EDTA, 0,1 % Tween, 2 mg/ml lysotsymiä) ja liuotettiin kahden tunnin ajan jäissä. Liuotettuja soluja sentrifugoitiin jälleen kuten edellä, ja raakasolu-uutteen sisältävä supernatantti pidätettiin.

2,5-DKG-reduktaasi A-proteiini puhdistettiin raakasolu-uutteesta kromatografoimalla DEAE-selluloosalla. DEAE-sellu-

loosaa (Whatman DE-52-tuotemerkki) esitasapainotettiin 25 mM tris-puskurissa, pH 7,0. Yhteensä 5,0 ml geeliä kaadettiin kertakäyttöiseen muoviseen kromatografiakolonniin, johon raakasolu-uute lisättiin. Kun kaikki uute oli sitoutunut kolonniin, kolonni pestiin kahdella tilavuudella 25 mM tris-puskuria, pH 7,0, sitten yhdellä tilavuudella 25 mM tris-puskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,3 M NaCl:ää, ja lopuksi 2,5-DKG-reduktaasi A-proteiini eluoitiin 25 mM tris-puskurilla pH 7,0, joka sisälsi 0,6 M NaCl:ää. Valmisteista määritettiin proteiinikonsentraatio bikinkoniinihappomenetelmällä (Methods in Enzymology 182:60-62 (1990)), ja puhtaus tarkistettiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla.

Esimerkki 5

Villityyppi- ja mutantti-Q192R-2,5-DKG-reduktaasi A:n kineettinen karakterisointi

Villityyppi- ja mutantti-Q192R-2,5-DKG-reduktaasi A-entsyymien valmisteet karakterisoitiin kineettisesti niiden kyvyn suhteen pelkistää substraatti-2,5-DKG:tä 2-KLG. Määritykset tehtiin 1 ml:n kokonaistilavuudessa 50 mM tris-puskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,2 mM NADPH:ta, vakiomäärän entsyymiä (15 - 20 mg) ja substraatin määrät, jotka vaihtelivat välillä 2 - 14 mM. Määritykset tehtiin 25 °C:ssa, ja substraatin pelkistymistä mitattiin spektrofotometrisesti mittaamalla absorbanssin menetyksen aallonpituudella 340 nm (joka ilmaisee kofaktori-NADPH:n hapettumisen NADP+:ksi).

Tiedot analysoitiin hyvin tunnetun Michaelis-yhtälön mukaan kineettisten parametrien Vmax ja Km määrittämiseksi käyttämällä Enzfit-ohjelmistopakkausta (Biosoft, Cambridge, UK) Epson-pöytätietokoneella. Villityyppi-2,5-DKG-reduktaasi A:n Vmax oli 2,5-DKG-substraatilla 7,8 µmol/min/mg proteiinia, kun taas Q192R-mutantin Vmax oli 14,0, 1,8-kertainen parannus. Villityyppientsyymin Km- eli Michaelis-vakio oli 28 mM, kun taas Q192R-mutantin Km oli 21 mM tällä substraatilla. Tämä johti spesifisyysvakioon (kcat/Km) 140 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ villityyppientsyymillä ja spesifisyysvakioon 335 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ Q132R-mutan-

tilla, 2,4-kertainen parannus.

Esimerkki 6

2,5-DKG-reduktaasi A:n mutantti, jolla on lisääntynyt in vivo -ekspressio

Havaittiin 2,5-DKG-reduktaasi A:n mutanttimuoto, jolla vaikka oli samanlainen aktiivisuus kuin villityyppientsyymillä, oli Acetobacter-ekspressioisäntään kertyvän proteiinin kasvavat määrät. Tämä mutantti nimeltään "HS1" sisältää kolme aminohappomuutosta: asparagiini korvaa treoniinin asemassa kaksi, treoniini korvaa seriinin asemassa viisi, ja seriini korvaa valiinin asemassa seitsemän. Tämän mutantin synteesiä ohjasi 37 emäsparin oligonukleotidi, jolla oli sekvenssi 5' AATTCTATGAACGTTCCCACCATCAGCCTCAACGAC 3'. Mutageesireaktion vaiheet olivat oleellisesti samat kuin Q192R-mutantin konstruointiin luonnostellut.

Taulukossa 3 alla esitetään tulokset määrityksistä raakasolulysaateista Acetobacter cerinus'ista, jossa oli joko: plasmidi pBR322:sta, kontrolliplasmidista, joka ei sisällä 2,5-DKG-reduktaasi A-sekvenssiä, pSStac.DKGR.AAA:stä, plasmidista, joka ekspressoi villityyppigeeniä, tai pSStac.-DKGR.AAA.HS1:stä, joka sisältää HS1-mutaatioita. Raakasoluuutteet valmistettiin pakkaleessa 2,5-DKG-reduktaasi A:n ja Q192R-mutanttiproteiinin puhdistkselle. Tulokset esitetään kolminkertaisille rinnakkaissolukasvatuksille.

Taulukko 3

	määritysarvot*			keskiarvo	% villityypistä
pBR322	-0,031,	-0,030,	-0,041	-0,034	0 %
pSStac.DKGR.AAA	-0,158,	-0,192,	-0,186	-0,178	100 %
pSStac.DKGR.AAA.HS1	-0,207,	-0,214,	-0,217	-0,213	124 %

*arvot ovat absorbanssin muutos 340 nm:llä/min/50 µl raaka-

solu-uutetta, substraattikonsentraatiossa 10 mM 2,5-DKG ja 0,2 mM NADPH 50 mM tris-puskurissa, pH 7,0, 25 °C.

Näissä raakasolulysaattien määrityksissä on välttämätöntä ottaa huomioon taustareduktaasi itse Acetobacter cerinus -soluista. Tämä aktiivisuusmäärä on edustettuna pBR322-viljelmissä, ja se vähennetään muista arvoista termin "% villityyppiaktiivisuudesta" laskemiseksi.

Määritykset tehtiin kuten edellä, 1,0 ml:n kokonaistilavuudessa 50 mM tris-puskuria, pH 7,0, joka sisälsi 0,2 mM NADPH, yksinkertaisen kiinteän määrän 2,5-DKG:tä (10 mM), ja 50 μl raakasolulysaattia.

Soluviljelmissä, joissa on pSStac.DKGR.AAA.HS1:tä, nähdään yhdenmukaisesti 20 - 30-%:inen ekspressiotasojen kohoaminen verrattuna soluviljelmiin, jotka sisältävät villityyppiplasmidia pSStac.DKGR.AAA. Tämä ekspression lisääntyminen voi johtua mRNA:n stabiilisuuden, lähetin translaation tason, proteiinin stabiilisuuden muutoksesta, tai jostain näiden vaikutusten yhdistelmästä.

Esimerkki 7

2,5-DKG-reduktaasi A:n mutantti, jolla on lisääntynyt lämpötilastabiilisuus

Keksitään 2,5-DKG-reduktaasi A:n mutanttimuoto, jolla on lisääntynyt lämpötilastabiilisuus Acetobacter-ekspressioisännässä. Tämä mutantti sisältää kaksi aminohappomuutosta: alaniini korvaa glysiinin asemassa 55, ja alaniini korvaa glysiinin asemassa 57. Tämän mutantin synteesiä ohjaa emäsoligonukleotidi, jonka sekvenssi on 5′ GAAACGAAGAAGCGGTCGCGGCCGCGATCGCG 3′. Mutageneesireaktion vaiheet ovat oleellisesti samat kuin Q192R-mutantin konstruoinnille hahmotellut.

Esimerkki 8

2,5-DKG-reduktaasi A-mutantit, joilla on vähentynyt aktiivisuus

Keksittiin 2,5-DKG-reduktaasi A:n mutanttimuotoja, joilla nähtiin aktiivisuuden merkitykselliset pienenemiset 2,5-DKG:n muuttamisessa 2-KLG:ksi. Mutageneesireaktioiden vaiheet olivat oleellisesti samat kuin Q192R-mutantin konstruoinnille hahmotellut. Seuraavat emäsoligonukleotidit ohjasivat sellaisten mutanttien synteesiä, joilla mutanteilla oli vähentynyt aktiivisuus Acetobacter-ekspressioisännässä:

glysiinin korvauksella alaniinilla asemassa 191 G191A-mutantin konstruoimiseksi, 5′ GGGGCCGCTCGCCCAGGGCAAGT 3′;

glysiinin deleetiolla asemassa 193 G193-deleettiomutantin konstruoimiseksi, 5′ CCGCTCGGTCAGAAGTACGACCT 3′;

lysiinin korvauksella arginiinilla asemassa 194 K194R-mutantin konstruoimiseksi, 5′ CGGTCAGGGCCGCTACGACCTCT 3′;

tyrosiini korvauksella seriinillä asemassa 195 Y195S-mutantin konstruoimiseksi, 5′ TCAGGGCAAGTCGGACCTCTTCG 3′;

alaniinin korvauksella tyrosiinilla asemassa 167 A167Y-mutantin konstruoimiseksi, 5′ GCTGCACCCCTACTACCAGCAGC 3′;

tyrosiinin korvauksella fenyylialaniinilla asemassa 168 Y168F-mutantin konstruoimiseksi, 5′ GCACCCCGCCTTCCAGCAGCGCG 3′;

glutamiinin korvauksella proliinilla asemassa 169 Q169P-mutantin konstruoimiseksi, 5′ CCCCGCCTACCCGCAGCGCGAGA 3′;

lysiinin korvauksella leusiinilla asemassa 225 K225L-mutantin konstruoimiseksi, 5′ GCACCTGCAGCTCGGTTTCGTGG 3′;

fenyylialaniinin korvauksella seriinillä asemassa 227 F227S-mutantin konstruoimiseksi, 5′ GCAGAAGGGTTCGGTGGTCTTCC 3′;

valiinin korvauksella treoniinilla asemassa 228 V228T-mutantin konstruoimiseksi, 5′ GAAGGGTTTCACCGTCTTCCCGA 3′;

valiinin korvauksella proliiniksi asemassa 229 V229P-mutantin konstruoimiseksi, 5′ GGGTTTCGTGCCCTTCCCGAAGT 3′; ja

lopetuskodonilla asemassa 271 katkaistun mutantin konstruoimiseksi, 5′ GGGTCGCGTGTGAGCACACCCCG 3′.

Kuten keksinnön alan ammattimiehet ymmärtävät, keksinnöllä voi keksinnön hengestä ja oleellisista ominaispiirteistä poikkeamatta olla muita suoritusmuotoja kuin edellä erityisesti kuvatut. Sen vuoksi edellä kuvatun keksinnön erityiset suoritusmuodot on katsottava kaikissa suhteissa kuvaaviksi eikä rajoittaviksi. Keksinnön suoja-ala esitetään oheisissa patenttivaatimuksissa sen sijaan, että se rajoittuisi edeltävän kuvauksen sisältämiin esimerkkeihin.

Patenttivaatimukset

1. 2,5-DKG-reduktaasi A:n mutanttimuoto, **tunnettu** siitä, että se sisältää yhden tai useampia seuraavista:

(a) yksi tai useampia aminohapposubstituutioita, -insertioita tai -deleetioita 2,5-DKG-reduktaasi A:n, kuten kuvassa 3 on määritelty, asemissa 165-168, 187-198, 224-234 tai 262-278, minkä seurauksena on poikkeava aktiivisuus 2,5-DKG-reduktaasi A:n villityyppiin nähden;

(b) alaniinin substituutio glysiinin tilalle α-heliksissä, mikä johtaa villityyppiin nähden lisääntyneeseen stabiilisuuteen;

(c) aromaattisen aminohapon substituutio aromaattisten ryhmien lähelle entsyymin sisällä, mikä johtaa villityyppiin nähden lisääntyneeseen stabiilisuuteen; tai

(d) asparagiinin asemassa 2, treoniinin asemassa 5 ja seriinin asemassa 7 substituutio, kuten kuvassa 3 on määritelty, mikä johtaa kasvaneeseen proteiinin ilmentämiseen isännässä.

2. Patenttivaatimuksen 1, kohdan (a) mukainen 2,5-DKG-reduktaasi A:n mutanttimuoto, jolla on 2,5-DKG-reduktaasi A:n villityyppiin nähden lisääntynyt spesifisyysvakio ja jossa mutantissa aminohappo glutamiini on substituoitu arginiinilla asemassa 192, kuten kuvassa 3 on määritelty.

3. Patenttivaatimuksen 1, kohdan (a) mukainen 2,5-DKG-reduktaasi A:n mutanttimuoto, jolla on 2,5-DKG-reduktaasi A:n villityyppiin nähden vähentynyt aktiivisuus ja jossa mutantissa on alaniini asemassa 191, deleetio asemassa 193, arginiini asemassa 194, seriini asemassa 195, tyrosiini asemassa 167, fenyylialaniini asemassa 168, proliini asemassa 169, leusiini asemassa 225, seriini asemassa 227, treoniini asemassa 228 tai proliini asemassa 229 kuten kuvassa 3 on määritelty.

4. Patenttivaatimuksen 1, kohdan (a) mukainen 2,5-DKG-reduktaasi A:n mutanttimuoto, jolla on 2,5-DKG-reduktaasi A:n villityyppiin nähden lisääntynyt lämpöstabiilisuus ja jossa mutantissa on alaniini asemassa 55 ja alaniini asemassa 57, kuten kuvassa 3 on määritelty.

5. Patenttivaatimuksen 1, kohdan (a) mukainen 2,5-DKG-reduktaasi A:n mutanttimuoto, joka on inaktiivinen käytettäessä 2,5-DKG:a substraattina ja jossa on lopetuskodoni asemassa 271, kuten kuvassa 3 on määritelty.

6. DNA-konstruktio, **tunnettu** siitä, että se käsittää rakennegeenin, joka sisältää ainakin yhden mutatoidun kodonin, joka mainittu geeni koodaa jonkin aikaisemman vaatimuksen mukaista 2,5-DKG-reduktaasi A:n mutanttimuotoa.

7. Isäntäsolu, **tunnettu** siitä, että se on transformoitu ekspressiovektorilla, joka sisältää patenttivaatimuksen 6 mukaisen DNA-konstruktion.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen isäntäsolu, **tunnettu** siitä, että se on bakteeri.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen isäntäsolu, **tunnettu** siitä, että bakteeri on Erwinia-suvusta.

10. Patenttivaatimuksen 8 mukainen isäntäsolu, **tunnettu** siitä, että bakteeri on Gluconobacter-suvusta.

11. Patenttivaatimuksen 8 mukainen isäntäsolu, **tunnettu** siitä, että bakteeri on Acetobacter-suvusta.

12. Patenttivaatimuksen 8 mukainen isäntäsolu, **tunnettu** siitä, että bakteeri on Acetobacter cerinus (IFO 3263).

13. Jonkin patenttivaatimuksen 7-12 mukainen isäntäsolu,

tunnettu siitä, että ekspressiovektori on plasmidi.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen isäntäsolu, **tunnettu** siitä, että plasmidi on pSStac.DKGR.AAA.HS1, kuten kuvassa 2 on määritelty ja jolloin plasmidiin sisältyvä 2,5-DKG-reduktaasi A-geeni sisältää seuraavat aminohappomuutokset:

(i) N korvaa T:n asemassa 2,

(ii) T korvaa S:n asemassa 5, ja

(iii) S korvaa V:n asemassa 7

mainittujen asemien ollessa määritetty kuvan 3 mukaisesti.

08-04-95 95146

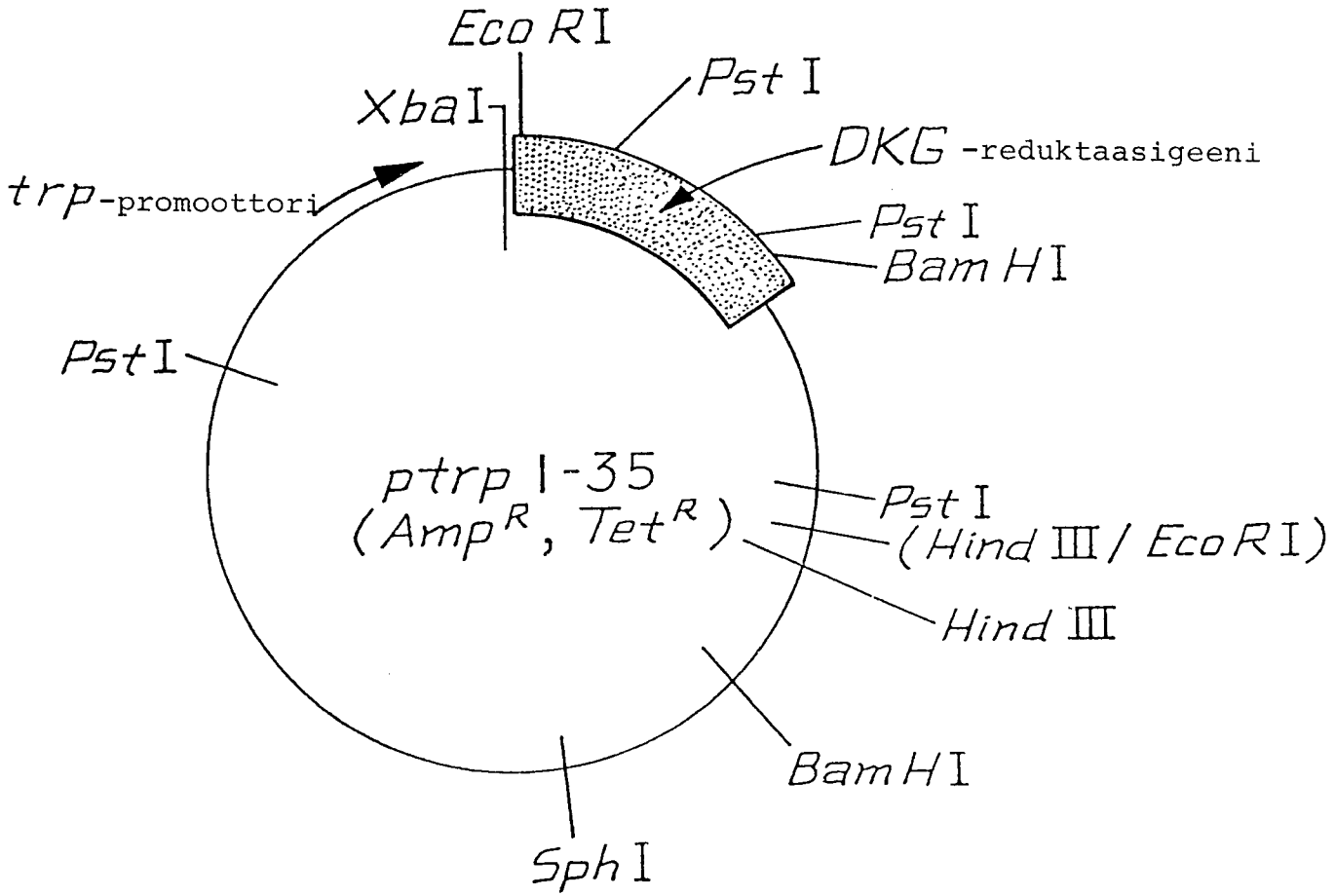

FIG. 1

05-04-95 9514646

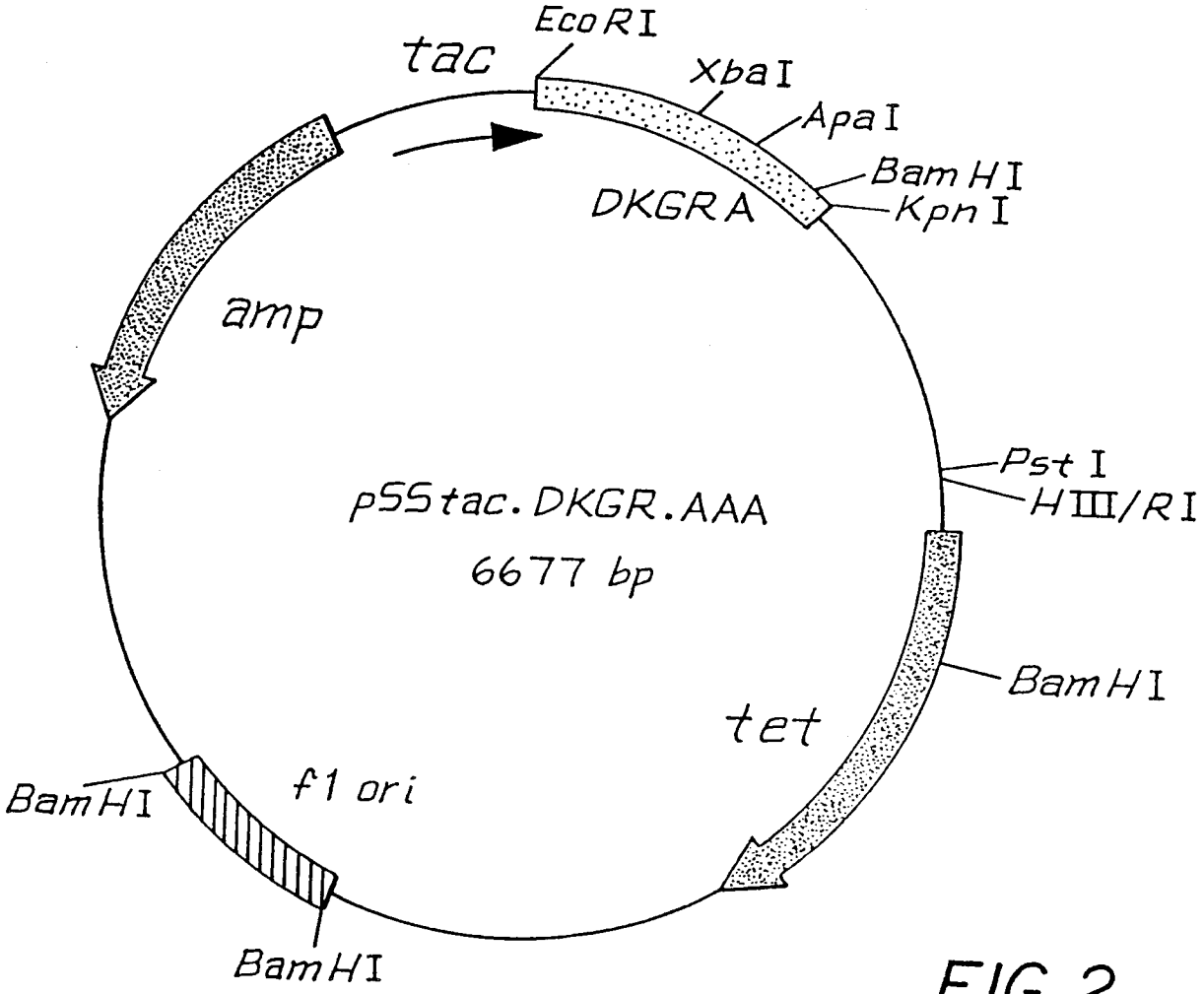

FIG. 2

08-04-95 95144

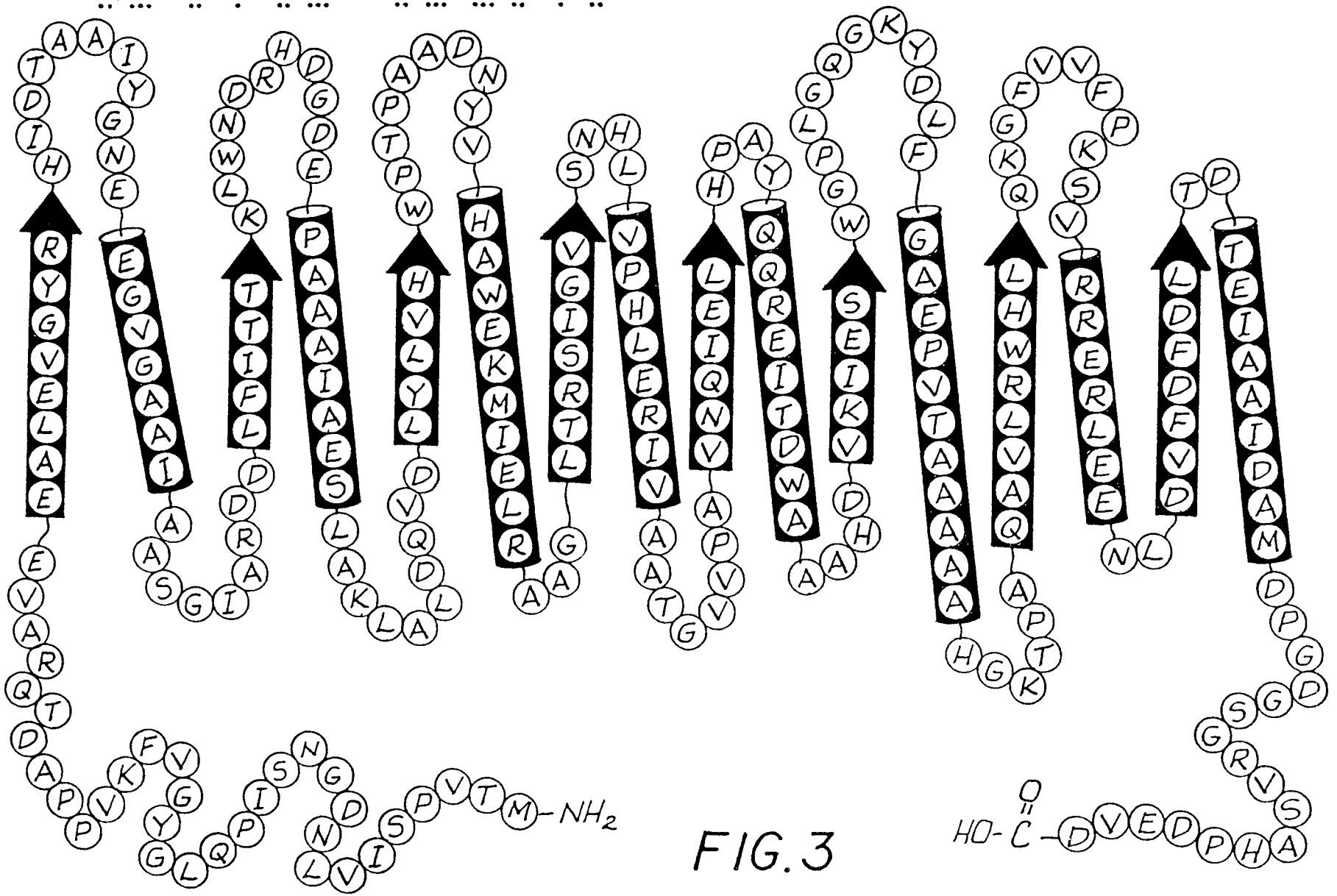

FIG. 3