

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 893702 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **893702**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12N 15/14

C12N 15/81

C12P 21/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **04.08.1989**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **04.08.1989**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **06.02.1990**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

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

05.08.1988 FR 8810615 03.07.1989 FR 8908897

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Rhône-Poulenc Sante, 20, Avenue Raymond Aron, 92160 Antony, RANSKA, (FR)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Fleer, Reinhard, France, RANSKA, (FR)

2 •Fukuhara, Hiroshi, Gif sur Yvette, RANSKA, (FR)

3 •Yeh, Patrice, France, RANSKA, (FR)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Menetelmä ihmisen seerumialbumiinin ja muiden heterologisten proteiinien mikrobiologiseksi valmistamiseksi hiivasta

Förfarande för mikrobiologisk framställning av humant serumalbumin och andra heterologa proteiner ur jäst

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

579.88 CBS

Menetelmä ihmisen seerumialbumiinin ja muiden heterologisten proteiinien mikrobiologiseksi valmistamiseksi hiivasta

Kyseinen keksintö koskee mikrobiologista menetelmää
 5 humaaniseerumialbumiinin (HSA:n) valmistamiseksi viljelemällä hiivaa, erityisesti suvun Kluyveromyces-hiivaa, jota on modifioitu DNA-rekombinaatiomenettelyitä käyttäen.

HSA on 585 aminohappojäännöksestä koostuva proteiini, jonka molekyylipaino on 66 kilodaltonia (kd:tä) ja
 10 joka on pallomaisen, ei-glykosyloidun monomeerin muodossa. Sen pallomaista rakennetta ylläpitävät 17 disulfidisiltaa, jotka muodostavat 9 kaksinkertaisen silmukan perättäisen sarjan (Brown, J.R., kirjassa "Albumin Structure, Function and Uses", Rosenoer, V.M. et.al. (toim.), Pergamon Press,
 15 Oxford, 1977, ss. 27-51). HSA:ta koodaavien geenien tiedetään olevan erittäin polymorfisia ja elektroforeettisessa analyysissä vaihtelevissa olosuhteissa on tyypitetty yli 30 ilmeisesti toisistaan poikkeavaa geneettistä varianttia (Weitkamp, L.R. et.al., Ann.Hum.Genet. 37 (1973) 219-226).
 20 Neljätoista (14) intronisekvenssiä jakaa HSA-geenin 15 eksoniin ja geeni käsittää yli 16,9 kilobaasia (kb:tä) oletetusta "Cap"-keskuksesta ensimmäiseen poly(A)-lisäyskeskukseen.

Humaanialbumiinia syntetisoituu maksassa maksasoluissa, joista se erittyy verenkiertoon. Se on veren yleisin proteiini, jonka pitoisuus on noin 40 g/litra seerumia; näinollen ihmiselimistössä on jatkuvasti noin 160 g kiertävää albumiinia. HSA:n tärkein tehtävä on ylläpitää normaalia osmolaarisuutta verenkierrossa. Sen sitoutumiskyky eri aineisiin on niinikään poikkeuksellinen, minkä
 30 lisäksi se osallistuu hydrofobisten molekyylien (esim. steroidien ja sappisuolojen) sekä erilaisten terapeuttisten aineiden endogeeniseen kuljetukseen, jolloin nämä aineet tulevat kukin kuljetetuksi vaikutuskeskukseensa.
 35 Edelleen nyttemmin on esitetty tietoja HSA:n osallistumisesta prostaglandiinien kataboliaan.

HSA:n synteessissä maksasoluissa muodostuu ensin prekursoriyhdiste, prepro-HSA, joka sisältää 18 aminohappojäännöstä käsittävän signaalisekvenssin, joka ohjaa syntyvän polypeptidin erityysreitille. Tämä signaalisekvenssi
 5 lohkeaa pois, mahdollisesti kotranslationaalisen prosessin yhteydessä, ennen proteiinin irtoamista endoplas-
 tisestä retikulumista. Tässä ensimmäisessä proteolyttisessä pilkkoutumisessa saadaan prekursoriyhdiste pro-HSA:-
 ta, joka vielä sisältää N-päätyheksapeptidin (Arg-Gly-Val-
 10 Phe-Arg-Arg), jota ei normaalisti esiinny kiertävässä, kypsässä HSA-muodossa.

Eräs mahdollisesti Golgi-rakkuloissa sijaitseva konvertaasi irrottaa propeptidin toisessa proteolyttisessä vaiheessa pilkkomalla kypsän HSA:n N-päätyasparagiini-
 15 happoon sitoutuneen heksapeptidin (Judah, J.D., ja Quinn, P.L., Nature 271 (1987) 384-385; Bathurst, I.C., et.al., Science 235 (1987) 348-350). Harvinaisissa heterotsygoot-
 tisissa yksilöissä, jotka omaavat perinnöllisen mutaation propeptidisekvenssissä, ei-prosessoitu humaanialbumiini
 20 voi kuitenkin muodostaa puolet verenkierrossa esiintyvistä kokonaisalbumiinimäärästä ja jopa albumiinimäärän kokonai-
 suudessaan eräissä äärimmäisen harvinaisissa homotsygootteissa (Takahashi, N., et.al., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 84 (1987) 7403-7407). Erästä tällaista varianttia kutsu-
 25 taan nimellä proalbumiini Christchurch, ja se alkaa sekvenssillä Arg-Gly-Val-Phe-Arg-Gln⁻¹-Asp⁺¹, jossa substituo-
 tuutio Arg⁻¹ → Gln estää tällä tavalla mutatoituneen propeptidin lohkeamisen (Brennan, S.O., ja Carrel, R.W., Nature 274 (1978) 908-909). Toisissa tunnetuissa varianteissa,
 30 kuten proalbumiini Lille (Abdo, Y., et.al., FEBS Letters 131 (1981) 286-288) ja Takefu (Nagata et.al., Rinsho Byori 30 (1982) 791-796), N-päätysekvenssi on vastaavasti Arg-
 Gly-Val-Phe-Arg-His-Asp ja Arg-Gly-Val-Phe-Arg-Pro-Asp. Kussakin näistä tapauksista todettu mutaatio koskee emäk-
 35 sistä aminohappojäännösparia Arg-Arg, joka normaalisti

edeltää kypsän humaanialbumiinin aminohapposekvenssiä, ja on seurausta yhden emäksen muutoksesta arginiinikodonissa (Takahashi, N., et.al., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 84 (1987) 7403-7407).

5 Pilkkoutuminen emäksisen aminohappojäännösparin jälkeen on oleellinen piirre muidenkin proteiinien kypsymisessä, mukaanlukien peptidihormonien, neuropeptidien ja muiden plasmaproteiinien kuin HSA:n (Douglass, O., et.al., Annu.Rev.Biochem. 53 (1984) 665). Nyttemmin on julkistettu
 10 tieto, jonka mukaan maksassa proalbumiinin albumiiniksi pilkkova konvertaasi muistuttaa ilmeisesti hyvin likeisesti hiivan yscF-proteaasia (Bathurst, I.C., et.al., Science 235 (1987) 348-350). Tätä kalsiumista riippuvaista tioli-proteaasia koodaa Saccharomyces cerevisiaen KEX2-geeni ja
 15 kyseinen proteaasi on ilmeisesti sitoutunut Golgin laite-membraaniin. Sen tiedetään osallistuvan alfa-tekijäksi kutsutun feromonin sekä tappajatoksiinin kypsymiseen, sillä S. cerevisiaen KEX2-mutantit eivät kykene pilkkomaan vastaavia proproteiineja emäksisen aminohappojäännösparin
 20 Lys-Arg kohdalta (Julius, D.J., et.al., Cell 32 (1983) 839). Lisäksi voidaan osoittaa, että KEX2-geenin koodaama hiivaentsyymi tunnistaa ja pilkkoo in vitro asianmukaisesti albumiinin normaalin prosekvenssin (Arg-Arg), mutta ei pilko proalbumiinin Christchurch mutatoitua prosekvenssiä
 25 (Arg-Gln) (Bathurst, I.C., et.al., Science 235 (1987) 348-350). Nyttemmin on kuvattu, että K. lactiksen KEX1-geeni koodaa yscF-proteaasiin nähden analogista konvertaasia (Wesolowski-Louvel, M., et.al., Yeast 4 (1988) 71-81). Tämän havainnon perusteella tutkittiin näiden hiivojen
 30 kykyä kypsyttää rekombinanttihumaanialbumiini oikealla tavalla ja erittää se sitten kasvualustaan.

Albumiinin osuus maailman plasmaproteiinimarkkinoista on 40 %. Tähän tuotteeseen kohdistuva kaupallinen mielenkiinto johtuu sen laajasta käytöstä esimerkiksi
 35 niinsanotuissa veritilavuuden laajentajissa verihukan kom-

pensoimiseksi kirurgisten toimenpiteiden, onnettomuuksien, verenvuotojen yhteydessä annoksina, jotka ovat useita grammoja päivää ja yksilöä kohden.

Tähän asti HSA:ta on yleensä valmistettu tavanomaisia menettelytekniikoita käyttäen verenluovuttajilta saatua plasmaa fraktioimalla (Cohn, E.J., et.al., J.Am.Chem.-Soc. 68 (1946) 459), jolloin vuotuinen plasman kulutus maailmassa on ollut suuruusluokkaa $9,5 \times 10^6$ litraa. Sitä voidaan myös uuttaa ihmisen istukasta J.Liautaudin et.al. [13. kansainvälinen IABS-kongressi, Budapest: "Purification of Proteins. Development of Biological Standard" (suom. "Proteiinien puhdistus. Biologisen standardin kehittäminen"), Karger (toim.) , Bale 27 (1973) 107] kuvaaman menetelmän mukaan.

Geenitekniisten menetelmien sekä uusien uutto- ja puhdistustekniikoiden kehittyminen on tuonut mukanaan mahdollisuuden saada parempia, puhtaampia ja stabiilimpia tuotteita, jotka eivät sisällä epäpuhtauksina virusainek-
sia (esim. hepatiitti-B, aids-virus), ja alhaisemmin kustannuksin. Kuitenkaan toistaiseksi ei tunneta yhtään geeniteknologian käyttöön perustuvaa menettelytapaa, joka olisi riittävän tehokas ollakseen kaupallisesti kiinnostava HSA:n tuottamista teollisessa mittakaavassa silmälläpitäen.

Tämä on seurausta pääasiassa siitä, että ollaan vailla tehokasta isäntä/vektori järjestelmää, joka mahdollistaisi albumiinin tuottamisen suurina määrinä siten, että se on asianmukaisesti kypsynyt, tulee asianmukaisesti eritetyksi, omaa oikeanlaisen tertiäärirakenteen sekä natiivin humaanialbumiinin fysikokemialliset ominaisuudet.

Vaikka nisäkässoluviljelmien käyttö vaikuttaisi ihanteelliselta valinnalta humaaniproteiinien ilmaisemiseksi, tällaisen menettelytavan kustannukset ylittäisivät näyttävästi farmaseuttisiin tarkoituksiin käytetyn albumiinin tämänhetkisen myyntihinnan (Klausner, A., Biotech-

nology 3 (1985) 119-125). Koska tätä tuotetta määrätään yleensä useita grammoja kerrallaan ja yksikköhinta on alhainen, HSA:n biotekninen tuotanto vaikuttaa toteutuskelpoiselta vain mikrobifermentointijärjestelmiä käyttäen.

5 Tähän asti valtaosassa geenitekniisiä kokeita kaupallisesti tärkeiden heterologisten proteiinien tuottamiseksi mikrobiologisin keinoin on isäntäorganismina käytetty Escherichia colia. Vaikka tällainen menettelytapa on vaikuttanut tyydyttävältä lukuisten heterologisten proteiinien kohdalla, erilaiset yritykset HSA:n tuottamiseksi
10 tätä organismia käyttäen ja taloudellisesti hyväksyttävissä olosuhteissa ovat olleet vain osittain menestyksekkäitä.

Eräs pääasiallinen E. colin käyttöön liittyvä haittatekijä on, että tämä bakteeri ei yleensä kykene erittämään muodostuneita heterologisia proteiineja kasvualustaan, jolloin ne kerääntyvät yhteen soluosastoon. Tällöin haluttu proteiini joudutaan erottamaan soluaineksesta, mikä johtaa monimutkaisiin ja hinnaltaan kalliisiin menettelyihin. Lisäksi E. coli tuottaa endotoksiineja ja pyrogeeneja, jotka saattavat kontaminoida muodostuneet proteiinit. Tämän vuoksi puhdistuksessa joudutaan kiinnittämään runsaasti huomiota endotoksiinijäämien poistamiseen lopputuotteesta, erityisesti, jos tätä aiotaan käyttää
20 lääketuotteena.

Erittyvät proteiinit menettävät useassa tapauksessa taitonsa laskostua oikealla tavalla, jos ne syntetisoituvat ja kerääntyvät sytoplasmaan. Yleensä ottaen erityys on välttämätön, jotta esimerkiksi HSA:ssa esiintyvien disulfididoksien muodostuminen olisi mahdollista. Koska E. colissa tuotettu HSA ei erity, se tulee näin muodoin saostetuksi solunsisäisesti ei-liukoiseen muotoon (Latta, M., et.al., Bio/Technology 5 (1987) 1309-1314). Täten bakteerisolusta uuttamisen jälkeen proteiini joudutaan denaturoimaan ja sitten jälleen renaturoimaan in vitro.
35

Edelleen E. colista puuttuu solumekanismi, joka mahdollistaisi eukaryoottisille organismeille, mukaanlukien hiivat ja ihminen, spesifisten transkription ja translaation jälkeisten modifikaatioiden suorittamisen.

5 HSA:n kohdalla vaikuttaa olevan vaikeata indusoida E. coli ilmaisemaan tyydyttävässä määrässä luontaista HSA-prekursoria, eli prepro-HSA:ta. Lisäksi keinotekoiset albumiinit, joissa HSA:n rakennegeeni on fuusioitu bakteeriperäisestä pac- tai ompA-geeneistä saatuihin erityssignaaleihin, tulevat yleensä epätäydellisesti prosessoiduiksi (10 ibid.). Edelleen HSA:n ilmaisu vailla prepro-sekvenssiä, eli muodossa Met-HSA, osoittaa, ettei E. colin metioniini-aminopeptidaasi (MAP) leikkaa N-päädyn metioniinijäännöstä (ibid.; EP-hakemusjulkaisu 198 745; julk. 22.10.1986). Täten E. coli -peräistä HSA:ta ei voidan saada kypsässä muodossa in vivo, jolloin sitä joudutaan modifioimaan in vitro (15 trypsiinillä pilkkomalla fagiperäisen johtosekvenssin leikkaamiseksi denaturoinnin ja renaturoinnin in vitro jälkeen (EP-hakemusjulkaisu 236 210, julk. 09.09.1987)).

20 Mitä tulee muihin bakteeri-isäntiin, viime aikoina on julkistettu HSA:n eritystä Bacillus subtiliksessa koskevia tutkimuksia (Saunders, C.W., et.al., J.Bacteriol. 169 (1987) 2917-2925). Vaikka tämä tutkimus osoittaa, että prokaryoottisella organismilla, kuten B. subtiliksella, (25 on periaatteessa kyky erittää korkean molekyylipainon omaavia humaaniproteiineja kuten HSA:ta, se osoittaa niinikään, että eritykseen kasvualustaan päästään vain käyttämällä B. subtilis -protoplasteja, eli bakteerisoluja, joiden normaali soluseinä on hajotettu entsyymikäsittelyllä. (30 lisäksi modifioidun HSA:n prosentuaalinen osuus on kääntäen verrannollinen muodostuneeseen proteiinimäärään: jos ilmaisutaso on korkea, valtaosa rekombinantti-HSA:sta on epäkypsässä muodossa (ibid.). Niinikään ei ole julkaistu mitään B. subtiliksessa tuotetun rekombinantti-HSA:n (35 fysikokemiallisia ominaisuuksia koskevia tietoja. Lisäksi

tässä mikro-organismissa saadaan hyvin alhainen HSA-eritystaso verrattuna viljelmäsupernatantissa todettaviin HSA-määriin immunologisia menetelmiä käytettäessä (EP-hakemusjulkaisu O 229 712 A2, julk. 22.07.1987).

- 5 Kiinnostava vaihtoehto bakteeri-isäntien käytölle heterologisten proteiinien valmistamiseksi on eukaryoottisten mikrobijärjestelmien kuten hiivojen tai homeiden käyttö. Itse asiassa nämä organismit omaavat kaikki niitä monimutkaisemmissa eukaryoottisissa organismeissa kuten
- 10 nisäkässoluissa esiintyvät rakenteeseen ja soluorganisatioon liittyvät ominaispiirteet. Erityisesti hiivat kykenevät suorittamaan monien proteiinien aktiivisuudelle merkitykselliset transkription ja translaation jälkeiset modifikaatiot. Lisäksi hiivat ovat hyvin yleisiä teollisen
- 15 mittakaavan tuotantoprosesseissa, niitä voidaan kasvattaa korkeiksi solutiheyksiksi, ne eivät ole patogeenejä, eivät tuota endotoksiineja ja niitä on käytetty elintarviketeollisuudessa ammoisista ajoista lähtien. Lopuksi vastoin kuin nisäkässolujen kohdalla, hiivojen geneettinen manipulointi on helppoa ja perinteisen genetiikan sekä molekyyli-
- 20 kyyli-
- genetiikan piirissä on tuotettu runsaasti tähän liittyvää informaatiota.

- Ilmaisulla "hiiva" tarkoitetaan usein Saccharomyces cerevisiaeta, eli leipomohiivaa, joka on yksi tavallisimmista ja parhaiten tunnetuista hiivalajeista. Tästä eteenpäin kyseisessä tekstissä todetaan ilmaisun "hiiva" tarkoittavan muitakin sukuja, jolloin merkitys ei rajoitu lajiin S. cerevisiae.
- 25

- Prepro-HSA:n ilmaisu kelatiinipromoottorin säätelyn alaisena on osoitettu S. cerevisiaessa, jolloin korkein saatava ilmaisutaso on noin 1 % kokonaisproteiinista (Etcheverry, T., et.al., Bio/Technology 4 (1986) 726-730). Kuitenkin tässä tutkimuksessa kuvattu HSA-vastaisten vasta-
- 30
- 35 aineiden tunnistama materiaali pysyy soluliitteisenä, eikä siten tule todella kuljetetuksi viljelmäsupernatant-

tiin. Lisäksi tälle rekombinanttiproteiininille ei ole julkistettu yksityiskohtaista karakterisointia.

HSA:n tuottamisesta leipomohiivassa fermentoinnin jälkeisellä prosessilla oluenpanon yhteydessä on niinikään
 5 raportoitu (EP-hakemusjulkaisu 0 201 239, julk. 12.11. 1986). Tässäkään yhteydessä ei ole kuvattu tuotteeseen liittyviä kvantitatiivisia tai kvalitatiivisia seikkoja. Lisäksi tämä prosessi johtaa Met-HSA:n ilmaisuun, jolloin mainittu on siis HSA-alleeli, jonka sekvenssi alkaa amino-
 10 hapolla metioniini juuri ylävirtaan kypsän albumiinin sekvenssistä. Signaalisekvenssin puuttuminen sulkee pois rekombinantti-HSA:n erityksen ja kypsymisen, ja johtaa solunsisäisen albumiinin kerääntymiseen, jonka tertiäärirakennetta ei tunneta. Lisäksi N-päätymetioniinin puuttumis-
 15 ta lopputuotteesta ei ole osoitettu.

Kyseinen keksintö kuvaa geenimanipuloitujen, modifioitujen hiivakantojen tuottamista, joita voidaan kasvat-
 20 taa massatuotantoviljelmissä ja jotka kykenevät tehokkaasti tuottamaan ja erittämään kasvualustaan HSA:ta natiivis-
 sa konformaatiossa.

Edullisessa ilmaisujärjestelmässä käytetään Kluyveromyces-suvun hiivoja isäntinä sekä luontaisesta K. marxianus var. drosophilarum -plasmidista pKD1 saatuja vektoreita.

25 Lisäksi albumiinin tuottamiseksi suoritetuissa tutkimuksissa on paljastunut tiettyjen pKD1-sekvenssien arvo ja merkitys niitä sisältävien ilmaisuplasmidien teholle ja erityisesti stabiilisuudelle.

Kyseinen keksintö koskee täten myös näiden oleellisten pKD1-ainesosien käyttöä muidenkin proteiinien kuin albumiinin ilmaisemiseksi, erityisesti kudospasminogeeni-aktivaattorin (tPA:n), metalloproteaasi-inhibiittorin (TIMP:n) ja interleukiinien, esim. interleukiini-l β :n (Il-l β :n) ilmaisemiseksi, jotka proteiinit tulee katsoa vain
 35 liittyviksi esimerkeiksi sen osoittamiseksi, että pKD1-

plasmidijohdannaisten käyttö on luonteeltaan "yleistä", eli että se tuskin, jos laisinkaan, on riippuvaista niiden proteiinien luonteesta, joiden ilmaisuun ja/tai erityykseen pyritään.

5 Kluyveromyces-suvun hiivat ja erityisesti K. marxianus (mukaanlukien var. lactis ja marxianus, joihin tästä eteenpäin viitataan nimillä K. lactis ja K. fragilis) ovat tärkeitä organismeja, joiden kaupallinen merkitys biotekniikan teollisuuden piirissä on huomattava. K. lactista ja K. fragilista käytetään esimerkiksi entsyymien laktaasi (β -galaktosidaasi) kaupallisessa tuotannossa. Nämä hiivat kykenevät kasvamaan herassa, joka on meijeriteollisuuden pääasiallinen sivutuote. Useita Kluyveromyces-kantoja käytetään "yksisoluproteiinin" (SCP:n) tuottamiseksi suuressa mittakaavassa, jolla mainitulla proteiinilla on huomattava merkitys karjarehuna. Lopuksi Kluyveromyces-suvun organismeja esiintyy niinsanotulla GRAS-listalla (Generally Recognized As Safe), mikä on tärkeä näkökohta farmaseuttista laatua edustavien tuotteiden tuotannon kannalta.

Geenimanipulointitekniikoita Kluyveromyces'lle on kehitetty vasta viime aikoina. Tämän organismin kanssa käytettäviksi on kuvattu kolmen tyyppisiä kloonausvektoreita:

25 i) integroituvat vektorit, jotka sisältävät Kluyveromyces-genomin eri alueisiin nähden homologisia sekvenssejä, ja jotka soluihin vietyinä integroituvat Kluyveromyces-kromosomeihin in vivo -rekombinaation välityksellä. Integroitumiseen, joka on hyvin harvinainen, tehokkaan valikointimerkin läsnäoloa edellyttävä tapahtuma, päästään silloin, kun nämä vektorit eivät sisällä itsenäisen toisiintumisen solussa mahdollistavia sekvenssejä. Tämän järjestelmän etu on transformoitujen kantojen stabiilisuus, eli se, että niitä voidaan kasvattaa tavanomaisessa ravinnetuessa, jolloin integroituneiden sekvenssien säilyttämi-

seksi ei edellytetä valikointipaineen läsnäoloa. Huono puoli on kuitenkin se, että integroidut geenit esiintyvät vain kertaalleen tai parhaassakin tapauksessa vain alhaisena kopiomääränä solua kohden. Tämä alhainen geeniannos-
 5 taso johtaa usein heterologisen proteiinin muodostumiseen vain pieninä määrinä.

ii) toisiintuvat vektorit, jotka sisältävät Kluyveromyces sp. -kromosomi-DNA:sta peräisin olevia itsenäisesti toisiintuvia sekvenssejä (ARS:iä) (Das, S., ja Hollenberg, C.P., Current Genetics 6 (1982) 123-128; PCT-hakemusjulkaisu WO 83/04050, julk. 24.11.1983; PCT-hakemusjulkaisu WO 83/04051, julk. 24.11.1983). Näiden vektorien mielenkiintoarvo on vain kohtuullinen, koska niiden jakaantuminen mitoosissa on hyvin epähomogeeninen, mikä johtaa niiden taajaan menetykseen soluista silloinkin, kun
 15 viimeksimainittuja kasvatetaan valikointipaineen läsnäollessa.

iii) toisiintuvat vektorit, jotka on saatu luontaisesti esiintyvistä hiivaplasמידeista, joko lineaarisesta tappajaplasmidista pGK1-1:stä (kl:stä), joka on eristetty
 20 K. lactiksesta (de Louvencourt, L., et.al., J.Bacteriol. 154 (1982) 737-742; EP-hakemusjulkaisu 0 095 986; julk. 07.12.1983), tai ympyrän muotoisesta plasmidista pKD1, joka on eristetty K. marxianus var. drosophilorum -organismista (EP-hakemusjulkaisu 0 241 435 A2, julk. 14.10.-1987). Lineaarisesta tappajaplasmidista peräisin olevia toisiintuvia sekvenssejä sisältävät vektorit eivät ole käyttökelpoisia heterologisten proteiinien massatuotannossa, koska niiden ylläpitämiseksi tarvitaan erityisravinnekasvualusta ja koska ne menetetään 40-99 %:ssa tietyn solupopulaation soluja vain 15 solupolvessa, jopa valikointipaineen läsnäollessa (EP-hakemusjulkaisu 0 095 986, julk. 07.12.1983). Tehokkain tähän mennessä kuvattu vektorijärjestelmä Kluyveromyces-suvun transformoimiseksi
 35 saadaan endogeenisestä plasmidista pKD1: pKD1-sekvenssin

kokonaisuudessaan sisältäviä rakenteita voidaan siirtää hyvällä siirtotiheydellä, ne esiintyvät solua kohden 70-100 kopiona ja mikä tärkeintä, ne ovat verraten stabiileja ei-valikoivissa olosuhteissa. Kuitenkin EP-hakemusjulkaisussa 0 241 435 kuvattujen vektorienkin käyttökelpoisuus rajoittuu tutkimussovellutuksiin, koska teollisen mittakaavan fermentoinneissa plasmidin edellytetään olevan stabiili ainakin 40 solupolven ajan. Tehokkainkin EP-hakemusjulkaisussa 0 241 435 kuvattu vektori (P3) menetetään noin 70 %:ssa tietyn solupopulaation soluja vain kuudessa solupolvessa ei-valikoivassa kasvualustassa (EP-hakemusjulkaisu 0 241 435 A2, julk. 14.10.1987). Vaikka on teknisesti mahdollista ylläpitää valikointipainetta suuren mittakaavan fermentoinnissa, valikoivan kasvualustan käyttö johtaa usein huomattavasti alentuneeseen solutiheyteen ja edellyttää tarkkaan määriteltujen kantojen käyttöä, mikä tekee tästä lähestymistavasta vähemmän kiinnostavan ja kalliin. Lisäksi EP-hakemusjulkaisussa 0 241 435 ei esitetä yhtäkään esimerkkiä kaupallisesti kiinnostavan heterologisen proteiinin ilmaisemisesta. Itse asiassa ainoa "heterologinen" geeni, jonka osoitetaan tulevan ilmaistuksi pKD1:stä peräisin olevista vektoreista, on hiivan S. cerevisiae URA3-geeni. Täten on toistaiseksi toteen näyttämättä, että ei-hiivageenin, esim. nisäkäsperäisen geenin, vieminen pKD1:een ja sen yli-ilmaisu Kluyveromyces'ssä ei johda plasmidin lisääntyneeseen epästabiilisuuteen.

Kyseisen keksinnön eräs päämäärä on sellaisten uusien ilmaisuvektorien tuottaminen, jotka kykenevät transformoimaan Kluyveromyces-suvun hiivoja ja joiden stabiilisuusominaisuudet ovat merkittävästi paremmat kuin kuvattu EP-hakemusjulkaisussa 0 241 435. Tullaan osoittamaan, että kyseisessä keksinnössä kuvatut uudet rakenteet tulevat ylläpidetyiksi korkeana kopiolukuna 85-90 %:ssa soluja 50 solupolvea käsittävässä viljelyssä ei-valikoivassa kasvualustassa. Täten on mahdollista tuottaa heterologisia

proteiineja stabiileista monikopiovektoreista käsin käyttäen teollisia Kluyveromyces -suvun kantoja, joita on käytetty jo vuosien ajan niiden optimaalisten kasvuominaisuuksien vuoksi sekä korkeiden solutiheyksien vuoksi, joihin niitä käyttämällä on mahdollista päästä.

Kyseinen keksintö koskee erityisesti menetelmää spesifioidun proteiinin valmistamiseksi, jonka menetelmän mukaan kasvualustassa viljellään Kluyveromyces-suvun hiivaa, joka on transformoitu ilmaisuplasmidilla, joka käsittelee:

- geenit A, B ja C plasmidista pKD1,
 - plasmidin pKD1 käänteiset toistot (IR),
 - pKD1:n stabiilisuuskeskuksen
 - pKD1:n toisiintumisalkukohdan ja ilmaisukasetin,
- joka sisältää sanotun proteiinin rakennegeeniä koodaavan DNA:n ensinmainitun ilmaisun sanotussa hiivassa sallivien sekvenssien säätelyn alaisena,
- transformoidun hiivan valikointimerkin
 - ja valinnaisesti Escherichia coli -toisiintumisalkukohdan ja -valikointimerkin.

Kyseisessä keksinnössä kuvattujen vektorien korkeaan stabiilisuuteen on päästy hyödyntämällä täydellisesti plasmidin pKD1 ominaisuudet. pKD1-peräiset vektorit poikkeavat kaikista muista tunnetuista Kluyveromyces-vektoreista sikäli, että ne sisältävät erikoistuneen toisiintumisjärjestelmän, joka huolehtii plasmidin stabiilista ylläpidosta korkeana kopiolutuna. Toisiintumisalkukohdan ohella tämä järjestelmä käsittää kaksi käänteistä toistoa, joista kummankin pituus on 346 nukleotidia, sekä kolme avointa lukualuetta (geenit A, B ja C), jotka ovat plasmidiin kiinteästi kuuluvia osia (Chen, X.J., et.al., Nucleic Acids Research 14 (1986) 4471-4481). Näiden toisiintumis- ja stabiilisuusrakenneosien, geenien A, B ja C sekä käänteisten toistojen (IR) säilymisen seurauksena saadaan mitoosissa hyvin korkeata stabiilisuutta osoittavia vek-

toreita. Analogisesti eniten tutkittuun järjestelmään nähden, eli rakenteellisesti samankaltaiseen S. cerevisiae 2 μ plasmidi -järjestelmään, kahden näistä geeneistä (B ja C) koodaamat proteiinit osallistuvat todennäköisesti

5 plasmidin jakaantumiseen mitosisissa, ja ne saattavat osallistua paikkaspesifistä rekombinaasia koodaavan geenin A negatiiviseen säätelyyn (FLP; Futcher, A.B., Yeast 4 (1988) 27-40). FLP-välitteisen 2 μ -DNA:n käänteisten toistojen välisen rekombinaation on osoitettu muuttavan

10 plasmidin normaalin toisiintumistavan (2 μ -plasmidien yksi kahdentuminen/solujakaantuminen) vieriväksi, ympyrän kehällä etenevän tyyppiseksi toisiintumismuodoksi (kopioluvun vahvistuminen noin 50 kopiaan solua kohden; ibid.). Tämä muutos normaaliin toisiintumistapaan indusoituu välittömästi plasmidin kopioluvun laskiessa liian alhaiseksi sallimaan riittävien määrien geenien B ja C tuotteita muodostumisen, jolloin nämä tuotteet toimivat FLP-rekombinaasia koodaavan A-geenin repressoreina. Tämän mekanismin välityksellä 2 μ :n (ja hyvin todennäköisesti rakenteellisesti samankaltaisten plasmidien kuten pKD1:n) kopioluku pysyy korkeana itsesäätelyn omaisella ja valikointimerkin läsnäolosta riippumattomalla tavalla.

EP-hakemusjulkaisussa O 241 435 aiemmin julkistettut vektorit sisältävät joko vain osan pKD1:stä (A15) tai sisältävät keskeytetyn geenin A (P1 ja P3, joissa PstI-kloonauksen keskus sijaitsee A-geenin koodisekvenssialueella (EP-hakemusjulkaisu O 241 435 A2, julk. 14.10.1987), jolloin itsesäätöinen toisiintumisjärjestelmä, joka on yksi ehyenä läsnäolevan plasmidin pKD1 tunnuspiirteistä, tuhoutuu.

30 Sitä vastoin kyseisessä keksinnössä kuvatuissa pKD1-plasmidirakenteissa jätetään kajoamatta pKD1:n kaikkien tärkeiden avoimien lukualueiden funktionaaliseen yhtenäisyyteen. Tämän seurauksena alla kuvattujen plasmidien stabiilisuus on huomattavasti parempi kuin plasmidien P1 ja P3, ja näiden uusien vektoreiden kopioluvut säilyvät korkeina solupopulaatiossa kauttaaltaan.

Kyseisessä keksinnössä ilmaisua "HSA" käytetään merkitsemään mitä tahansa humaaniperäistä seerumialbumiinia tai mitä tahansa hiivasoluista eristettyä ja saman aminohapposekvenssin, saman tertiäärirakenteen ja samat
5 fysikokemialliset ominaisuudet, kuin humaaniperäinen natiivi HSA, omaavaa proteiinia. Lisäksi "HSA-varianttien" ymmärretään merkitsevän luontaisia variantteja sekä molekyylejä, jotka omaavat saman aktiivisuuden kuin HSA, mutta joissa sen ollessa tarkoituksenmukaista kyseisen aktiivisuuden kannalta epäoleellisia alueita on typistetty.
10

Kyseinen keksintö koskee sellaisten uusien vektorien muodostamista geeniteknologisin keinoin, jotka mahdollistavat HSA:n tuottamisen helposti puhdistettavassa muodossa hiivasoluja eukaryoottisena mikrobi-isäntänä
15 käyttäen. Tuotantomenetelmän eräs piirre on kypsän, natiivin HSA:n tehokas erittyminen sanottujen hiivojen kasvualustaan, mikä helpottaa huomattavasti saadun rekombinanttiproteiinin puhdistusta. HSA-tuotantoon päästään kasvatamalla hiivoja, jotka on transformoitu rekombinanttiplasmidilla, joka käsittää sanotussa isännässä tehokkaasti
20 toimivan transkription ja translaation aloitusalueen sekä HSA:ta koodaavan avoimen lukualueen, jota edeltää rekombinanttiproteiinin sanottujen hiivojen erityysreitille ohjaava erityssignaali.

Kyseisen keksinnön mukaan uudet rakenteet käsittävät HSA:n rakennegeenin tai sen jonkin variantin sisältäviä ilmaisukasetteja. Nämä rakenteet valmistetaan tavallisesti tarkoituksenmukaisia vektoreita käyttäen vaiheittain edeten, kunnes ilmaisulle, eritykselle tai plasmidin
30 ylläpidolle oleelliset rakenneosat on yhdistetty muodostamaan vektori, joka voidaan sitten viedä yhteen tai useampaan määriteltäyn isäntään halutun proteiinin ilmaisemiseksi ja erittämiseksi. Käytetyt isännät ovat eukaryoottista alkuperää, erityisesti hiivoja, etenkin suvun
35 Saccharomyces- tai Kluyveromyces-hiivoja ja edullisesti

laji Kluyveromyces marxianus mukaanlukien sen kaikki muunnokset, erityisesti K. marxianus var. lactis. Täten kyseisen keksinnön mukaan valmistettavat ja kuvatut rakenteet ovat esimerkkien piirissä mikrobiologista alkuperää olevissa eukaryoottisissa organismeissa, mutta edullisesti ne viedään Kluyveromyces-sukuun.

Nimenomaisesti käytetyt kannat ovat edullisesti teollisia kantoja, jotka ovat stabiileja, jotka kasvavat korkeiksi solutiheyksiksi sopivassa kasvualustassa ja joiden tuotantotaso on korkea.

Kannoista, jotka voidaan transformoida pKD1-pohjaisilla plasmideilla, tulkoot nimenomaisesti mainituiksi lajien K. wickerhamii, K. waltii kannat ja erityisesti K. marxianus var. bulgaricus (K. bulgaricus), K. marxianus var. drosophilarum (K. drosophilarum), K. marxianus var. marxianus (K. fragilis) ja K. marxianus var. lactis (K. lactis).

HSA:ta koodaava sekvenssi voidaan saada usealla tavalla, jolloin yksinkertaisin tapa on eristää lähetti-RNA:ta ihmisen maksasta ja syntetisoida siitä kopioita komplementti-DNA:n (cDNA:n) muodossa. Kloonattuja sekvenssejä voidaan sitten modifioida eri menetelmiä käyttäen, kuten in vitro paikkaohjautuvaa mutatoointia, primerilääjennusta, restriktioentsyymeillä pilkkomista, adaptorisekvenssin insertointia tai ligatoointia oligodeoksinukleotidiliittäjiin. Koodisekvenssi voidaan mukailla esimerkiksi hiivan ensisijaisen kodonikäytännön mukaiseksi proteiinisynteesin (translaation) tehokkuuden sanotussa isännässä optimoimiseksi.

Proteiinisekvenssin N-päätyyn voidaan liittää signaaliptidi (pre-sekvenssi) syntyvän proteiinin ohjaamiseksi isäntäsolun erityisreitille. Tämä pre-sekvenssi voi vastata proteiinin, erityisesti albumiinin, luontaista N-päätyjohtosekvenssiä, tai se voi olla peräisin muusta lähteestä, esimerkiksi se voidaan saada hiivageeneistä, kuten alfa-feromonia tai tappajatoksiinia koodaavista geeneistä.

Edelleen kypsän albumiinin erityissignaalisekvenssin ja koodisekvenssin väliin voidaan sijoittaa muuta peptidilaajennusta koodaava pro-sekvenssi. Tämä pro-sekvenssi liitetään tavallisesti koodisekvenssiin spesifisen proteaasin ainakin kaksi emäksistä aminohappojäännöstä, edullisesti Lys-Arg tai Arg-Arg, käsittävässä pilkkomis-

keskuksessa.

Ilmaisukasetti käsittää koodisekvenssin 5'-päätyyn liitettynä transkription ja translaation aloitusalueen sanotun sekvenssin transkription ja translaation ohjaamiseksi ja säätelemiseksi. Näiden promoottorialueiden valinta on riippuvainen käytetystä nimenomaisesta isännästä. Nämä sekvenssit valitaan yleensä hiivageeneistä peräisin olevista promoottoreista. Erityisen kiinnostavia ovat tiedot, Saccharomyces- tai Kluyveromyces-tyypin hiivan glykolyttisistä geeneistä saadut promoottori- ja/tai päätösalueet, kuten geeneistä, jotka koodaavat fosfoglyseraattikinaasia (PGK:ta), glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasia (GDP:tä), enolaaseja (ENO), alkoholidehydrogenaaseja (ADH), tai promoottori- ja/tai päätösalueet, jotka ovat peräisin muista voimakkaasti ilmaistuksi tulevista geeneistä, kuten laktaasin (LAC4:n), happaman fosfataasin (PHO5:n) tai vastaavien geeneistä. Näitä säätelyalueita voidaan modifioida, esimerkiksi *in vitro* mutatoointia käyttäen, lisäämällä muita säätelyosia tai synteettisiä sekvenssejä tai deletoimalla. Esimerkiksi voidaan käyttää transkriptiota sääteliviä rakenneosia, kuten niinsanottuja UAS- (Upstream Activating Sequences) säätelyosia, jotka ovat peräisin jostain muusta promoottorista, esim. S. cerevisiae GAL10 - tai K. lactis LAC4 -geenipromoottoreista, hybridipromoottorien rakentamiseksi, joita käyttämällä hiivaviljelmän kasvufaasi pystytään erottamaan heterologisen geenin ilmaisufaasista käytetyn hiililähteen mukaan. Koodisekvenssin 3'-päätyyn sijoitetaan suunnitellussa isännässä funktionaalinen transkription ja translaation päätösalue.

Näin rakennettu ilmaisukasetti fuusioidaan yhteen tai useampaan merkkiin, joiden avulla transformoitu isäntä voidaan valikoida. Edullisia hiivamerkkejä ovat dominoivat merkit, eli merkit, jotka tuottavat vastustuskyvyn jollekin antibiootille, esim. genetisiinille (G418) ilmaistaessa sanotussa hiivassa bakteeritransposonin Tn903 aph(3')-I-geeni (aph), tai jollekin muulle myrkylliselle yhdisteelle kuten kupari-ioneille, jolloin viimeksimainittuja voidaan käyttää erityisistä isäntäspesifisyydestä riippumatta. Nämä geenit sijoitetaan kyseisessä isännässä sopivien transkriptio- ja translaatiosignaalien säätelyn alaisiksi. On niinkään mahdollista käyttää auksotrofeja komplementoivia merkkejä kuten S. cerevisiaen URA3- tai LEU2-geeni.

Ilmaisukasetin ja valikointimerkin muodostamalla rakennekokonaisuudella voidaan joko transformoida isäntä suoraan tai ensinmainittu voidaan insertoida toisiintuvaan vektoriin. Jos käytetään suoraa transformointia, tähän rakennekokonaisuuteen fuusioidaan kromosomissa tai läsnäolevassa plasmidissa esiintyviin alueisiin nähden homologisia sekvenssejä. Nämä sekvenssit sijoitetaan ilmaisukasetin molemmin puolin, jolloin ne indusoivat insertoitumisen homologiseen keskukseen in vivo rekombinaatiossa. Ilmaisukasetti voidaan niinkään yhdistää sanotussa isännässä funktionaaliseen toisiintumisjärjestelmään. Kluyveromyces'lle edullinen toisiintumisjärjestelmä saadaan plasmidista pKD1, joka alunperin eristetään lajista K. drosophilum (Falcone, C., et.al., Plasmid 15 (1986) 248-252; Chen, X.J., et.al., Nucleic Acids Research 14 (1986) 4471-4481). Saccharomyces'lle edullinen toisiintumisjärjestelmä saadaan hiivan 2 μ -plasmidista. Ilmaisuplasmidi voi sisältää sanotut toisiintumisjärjestelmät kokonaisuudessaan tai osia niistä, tai ilmaisuplasmidissa on voitu yhdistää sekä pKD1:stä että 2 μ -plasmidista saatuja osia. Edullisia ovat rakenteet, jotka sisältävät plasmidin pKD1 sekvenssin kokonaisuudessaan, silloin kun kyseessä on il-

maiseminen Kluyveromyces'ssä. Erityisesti edullisia ovat ne rakenteet, joissa vierassekvenssien insertoinikeskus pKD1:ssä sijaitsee SacI-keskuksen (asema 4714 pKD1:n B-muodossa; Chen, X.J., et.al., Nucl.Acids Res. 14 (1986) 4471-4481) ja MstI-keskuksen (asema 154 pKD1:n B-muodossa; ibid.) välisellä 197 bp:n alueella tai on jompikumpi näistä kahdesta keskuksesta, tai vaihtoehtoisesti plasmidin pKD1 SphI-keskus.

Kätevämmin plasmidi voi olla sukkulavektori: sellaisena se voidaan siirtää bakteeri-isäntään kuten E. coliin, jossa sitä on eri rakennusvaiheissa helpompi käsitellä kuin hiivassa. Tässä tapauksessa tarvitaan kyseisessä bakteeri-isännässä funktionaalinen toisiintumisalkukohta ja valikointimerkki. On samoin mahdollista sijoittaa ilmaisuvektorissa yksittäin esiintyvät restriktiokeskukset siten, että ne sivuavat bakteerisekvenssejä. Näin bakteeriperäinen toisiintumisalkukohta voidaan eliminoida pilkkomalla ja uudelleenligatoida vektori ennen sen käyttöä hiivasolujen transformoinnissa, jolloin ehkä päästään korkeampaan plasmidin kopiolukuun ja sen parempaan stabiiliisuuteen. Voidaan käyttää esimerkiksi käteviä keskuksia kuten 5'-GGCCNNNNNGGCC-3' (SfiI) tai 5'-GCGGCCGC-3' (NotI), koska ne ovat hiivassa erittäin harvinaisia ja yleensä eivät esiinny ilmaisuplasmidissa. Nämä keskukset voidaan viedä vektoriin oligodeoksinukleotidi-ohjautuvalla mutaatiolla, tai lisäämällä spesifisiä oligodeoksinukleotidiliittäjiä tai -adaptoreita.

Vaikka kyseisessä kuvauksessa viitataan toistuvasti humaanialbumiiniin, plasmidista pKD1 oikeaoppisesti saatua ja vektoreita hyödyntävää menettelyä voidaan soveltaa albumiineihin, interleukiineihin, tPA:han, TIMP:hen ja muihin proteiineihin, joille on edullista tulla ilmaistuiksi/eritetyiksi sanotuissa hiivoissa.

Koodisekvensseistä, joita voidaan ilmaista, mainittakoon erityisesti:

11-1 β
 prepro-HSA
 Met-HSA
 prepro-tPA
 5 Met-tPA ja
 TIMP.

Sitten kun vektorin rakentaminen on saatettu päätökseen, se viedään haluttuun isäntään. Erilaisia suoritustjärjestelyjä transformoinnin suorittamiseksi hiivoissa
 10 on kuvattu (Sherman, F., et.al., "Methods in Yeast Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986). Transformantteja voidaan sitten kasvattaa sopivassa kasvualustassa halutun tuotteen tuottamiseksi.

Jos haluttu tuote on erittyvä, se voidaan puhdistaa eri tavoilla viljelmäsupernatantista. Se voidaan kylmäsaostaa, tai uuttaa affiniteettikromatografiaa, elektrofooresia tai muuta tavanomaista tekniikkaa käyttäen. Erittynyt proteiini voidaan ottaa talteen panosviljelmästä tai jatkuvasta viljelmästä.

20 Seuraavat esimerkit esitetään ilman rajaavaa tarkoitusta, ja ne havainnollistavat keksinnön erityisiä suoritustuotoja ja tiettyjä etuja.

Kuvioissa esitettyjä kaaviokuvia plasmideista ei ole piirretty mittakaavassa ja vain rakenteiden kannalta
 25 merkitykselliset restriktiokeskukset on esitetty.

Kuvio 1. Plasmidin pXL276 rakentaminen; plasmidi sisältää kokonaisuudessaan Met-HSA:ta koodaavan sekvenssin, joka on saatu ihmisen maksasta eristetyistä poly(A)-mRNA:sta valmistetuista kolmesta cDNA-kloonista (katso
 30 tekstiosuus).

Kuvio 2. Albumiinin prepro-sekvenssin muodostaminen neljästä synteettisestä oligodeoksinukleotidista: plasmidin pXL290 rakentaminen.

Kuvio 3. Plasmidin pXL299 rakentaminen.

35 Kuvio 4. Plasmidin pXL322 rakentaminen.

Kuvio 5. Plasmidin pXL855 rakentaminen.

Kuvio 6. Plasmidin pXL869 rakentaminen.

Kuvio 7. Nukleotidi- ja aminohapposekvenssi Hind-III-fragmentille, joka on saatu plasmidista pXL869 ja sisältää prepro-HSA-rakennegeenin. Voimakkaasti piirretyt nuolet osoittavat "pre"- ja "pro"-alueiden päättymiskohdat.

Kuvio 8. Plasmidin pUC-URA3 rakentaminen.

Kuvio 9. Plasmidin pCXJ1 rakentaminen.

10 Kuvio 10. Plasmidin pk1-PS1535-6 rakentaminen.

Kuvio 11. Plasmidin pUC-kan202 rakentaminen.

Kuvio 12. Plasmidin kl ORF1-promoottorin nukleotidisekvenssi ScaI-restriktiokeskuksesta eteenpäin, jolloin mukana on ORF1:n ja Tn903-peräisen, aminoglykosidifosfotransferaasia koodaavan bakteerigeenin 5'-alueen välinen liitoskohta.

Kuvio 13. Plasmidin pKan707 rakentaminen.

Kuvio 14. Plasmidin pKan707 stabiilisuuskäyrä kannassa MW98-8C ei-selektiivisissä kasvatusolosuhteissa.

20 Kuvio 15. Plasmidin pYG11 rakentaminen.

Kuvio 16. Plasmidin pYG18 rakentaminen.

Kuvio 17. Plasmidin pYG19 rakentaminen.

Kuvio 18. Havainnollistava kuva plasmideista pYG19 (prepro-HSA) ja pYG23 (Met-HSA). Kummankin plasmidin alapuolella näkyvä nukleotidisekvenssi on PGK-geenipromoottorin ja HSA:n eri muotoja koodaavien rakennegeenien välinen liitoskohta.

Kuvio 19. Plasmidien pYG208, pYG210 (sivusta A) ja pYG221B (sivusta B) rakentaminen.

30 Kuvio 20. Plasmidien pYG14, pYG26 ja pYG29 rakentaminen.

Kuvio 21. A. S. cerevisiae PGK-promoottorin mutatointi UAS-aluetta sivuavien NotI-keskuksien liittämiseksi. Paikkaohjautuvalla mutatoinnilla vaihdetut neljä emäsparia on merkitty tähdillä NotI-keskuksien alapuolelle.

B. Ei-translatoitu PGK-johtosekvenssi rakenteissa pYG19 ja pYG44. Villityypin PGK-promoottorin -25-alueelle paikkaohjautuvan mutaation avulla viety HindIII-keskus on merkitty laatikolla.

5 Kuvio 22. UAS_{PGK}:n korvaaminen synteettisellä DNA-fragmentilla, joka sisältää K. lactis LAC4-promoottorin UAS:n, ja PGK-villityypin ATG-yhteyden jälleenrakentaminen ligatoimalla synteettinen adaptorisekvenssi mutatoituun PGK-promoottoriin.

10 Kuvio 23. SalI-SacI-ilmaisukasetteja, jotka sisältävät pKan707-peräisissä plasmideissa esiintyviä eri promoottoreita ja signaalisekvenssejä, jotka ohjaavat HSA:n eritystä kasvualustaan.

15 Kuvio 24. S. cerevisiae PH05-promoottorin paikkaohjautuva mutatointi HindIII-keskuksen viemiseksi asemaan -20.

Kuvio 25. Nukleotidisekvenssi promoottorialueelle, joka rakenteessa pYG51 sijaitsee lähellä ATG-aloituskodonia.

20 Kuvio 26. Synteettisen HindIII-DraI-DNA-fragmentin jälleenrakentaminen, joka fragmentti sisältää PGK-promoottorin 5'-ei-translatoidun johtosekvenssin, K. lactis tappajatoksiinin signaalisekvenssin (pre-alue) ja muutaman ensimmäisen kodonin pro-HSA-geenistä. Plasmidin pYG56 rakentaminen.

25 Kuvio 27. Kaaviollinen esitys plasmideista p31/-RAG2:URA3, pYG60-5 ja pYG60-21.

Kuvio 28. HSA:n ilmaisevien plasmidien pYG19 ja pYG23 mitoitettinen stabiilisuus ei-selektiivisissä kasvatolosuhteissa: umpinaiset neliöt, plasmidilla pYG19 transformoitu kanta MW98-8C; avoimet neliöt, plasmidilla pYG23 transformoitu kanta MW98-8C; avoimet kolmiot, plasmidilla pYG19 transformoitu kanta CBS683.

35 Kuvio 29. Coomassie-sinisellä värjätty 8,5-%:inen SDS-polyakryyliamidigeeli, joka havainnollistaa HSA:n il-

maisua ja eritystä kannassa MW98-8C. Vyöhykkeet 1-4: ihmisen istukasta uutettu mallialbumiini (Sigma), jolloin täplät on saatu kasvavista pitoisuuksista: 0,2 µg, 0,6 µg, 2 µg ja 6 µg vyöhykettä kohden. pYG19 (prepro-HSA), pYG23 (Met-HSA) ja pYG25 (vailla ilmaisukasettia oleva verrok-
 5 kivektori): kukin vyöhyke vastaa 100 µl alkuperäistä viljelmää vastaavaa proteiinimäärää. a) liukoiset fraktiot; b) ei-liukoiset fraktiot; c) viljelmäsupernatantit.

Kuvio 30. Blot -immuunimääritysmenettely nitrosel-
 10 loloosakalvolle siirretylle 7,5-%:iselle polyakryyliami-
 digeelille tekstiosuudessa kuvatun mukaisesti. Vyöhykkeet 1-5: ihmisen istukasta uutettu mallialbumiini (Sigma), joka on liuotettu YPD-kasvualustaan vaihteleviksi pitoi-
 suuksiksi ja saostettu TCA:lla (5 % loppupitoisuus) kuten
 15 kuvattu. HSA-standardinäytteitä on siten käsitelty samal-
 la tavalla kuin viljelmäsupernatantteja. Molemmissa ta-
 pauksissa geelitäplät vastaavat ekvivalenttisia tilavuuk-
 sia. 1) saostamiskokeita HSA-pitoisuuden ollessa 100 mg/-
 litra; 2) 50 mg/litra; 3) 25 mg/litra; 4) 12,5 mg/litra;
 20 5) 6 mg/litra. pYG19 (prepro-HSA) ja pYG23 (Met-HSA): ku-
 kin vyöhyke vastaa 20 µl alkuperäistä viljelmää vastaavaa
 proteiinien määrää; a) viljelmäsupernatantit; b) ei-liu-
 koiset fraktiot; c) liukoiset fraktiot.

Kuvio 31. Coomassie-sinisellä värjätty 8,5-%:inen
 25 polyakryyliamidigeeli, joka havainnollistaa HSA:n eritty-
 misen kinetiikkaa kannassa MW98-8C.

A. Vyöhykkeet a-e: malli-HSA (Sigma), joka on liuo-
 tettu YPD-kasvualustaan vaihteleviksi pitoisuuksiksi ja
 saostettu TCA:lla (5 % loppupitoisuus) kuten kuvattu (kat-
 30 so kuvion 21 viiteteksti). 1) HSA:n (Sigma) pitoisuus 6
 mg/litra; 2) 12,5 mg/litra; 3) 25 mg/litra; 4) 50 mg/lit-
 ra; 5) 100 mg/litra. pYG19: HSA:n pYG19-välitteinen eritys
 viljelmän iän, 16 - 61 tuntia, funktiona merkintöjen mu-
 kaan. Kukin näyte vastaa 160 µl viljelmäsupernatanttia
 35 vastaavaa määrää.

B. Vyöhykkeet a-e: malli-HSA (Sigma), jonka täplän muodostuksessa on käytetty kasvavia pitoisuuksia: 0,4 µg, 0,6 µg, 0,8 µg, 1,0 µg ja 1,2 µg vyöhykettä kohden. pYG19: HSA:n pYG19-välitteinen erityis viljelmän iän, 72 - 240
 5 tuntia, funktiona merkintöjen mukaan. Kukin näyte vastaa 25 µl viljelmäsupernatanttia vastaavaa määrää.

Kuvio 32. A. Graafinen esitys HSA:n erityksen kine-
 tiikalle kannassa MW98-8C, joka on transformoitu plasmidilla pYG19 ja jota on kasvatettu erlenmeyerkolvissa kuten
 10 testiosuudessa kuvattu. Kasvualustassa todetun albumiinin pitoisuus (mg/litra) on esitetty viljelmän iän (tunneissa) funktiona. Esitetään neljän riippumattoman kokeen tulokset.

B. Kasvukäyrä plasmidilla pYG19 transformoidulle
 15 kannalle MW98-8C.

Kuvio 33. Hiililähteen vaikutus PGK:n tai PGK/LAC4-
 hybridipromoottorin säätelyn alaisena olevan albumiini-
 erityksen tehokkuuteen: Coomassie-sinisellä värjätty SDS-
 PAGE-analyysi plasmidilla pYG19 tai pYG44 transformoidun
 20 K. lactis kannan MW98-8C viljelmäsupernatantille.

A. Supernatantit (12,5 µl vyöhykettä kohden) ravis-
 telukasvatuspulloista, joissa viljelmää on kasvatettu 211
 tunnin ajan joko YPD:ssä (jossa on 2 % glukoosia) (vyöhyk-
 keet 1-3) tai YPD-kasvualustassa, johon on lisätty 2 %
 25 laktoosia 43 tunnin kuluttua kasvatuksen aloittamisesta (vyöhykkeet 4-6). Vyöhykkeet a ja b: HSA (Sigma) 0,5 ja vastaavasti 1,0 µg; vyöhykkeet 1 ja 4: plasmidi pYG44-5; vyöhykkeet 2 ja 5: plasmidi pYG44-7; vyöhykkeet 3 ja 6: plasmidi pYG19.

B. Supernatantit (25 µl vyöhykettä kohden) ravis-
 telukasvatuspulloista, joissa viljelmää on kasvatettu 113
 tunnin ajan joko YPD:ssä (jossa on 2 % glukoosia) (vyöhyk-
 keet 1, 4 ja 7); YPL:ssä (jossa on 2 % laktoosia) (vyöhyk-
 keet 3, 6 ja 9) tai YPD-kasvualustassa, johon on lisätty
 35 2 % laktoosia 43 tunnin kuluttua kasvatuksen aloittamisesta.

ta (vyöhykkeet 2, 5 ja 8). Vyöhykkeet a, b ja c: HSA (Sigma) 0,25, 0,5 ja vastaavasti 1,0 µg; vyöhykkeet 1-3: plasmidi pYG44-5; vyöhykkeet 4-6; plasmidi pYG19; vyöhykkeet 7-9; plasmidi pKan707, joka ei sisällä ilmaisukasettia.

5 Kuvio 34. Promoottori- ja signaalisekvenssisubstitutioiden vaikutus albumiinierityksen tehokkuuteen: Coomassie-sinisellä värjätty SDS-PAGE-analyysi plasmidilla pYG51, pYG19 tai pYG58 transformoidun K. lactis kannan MW98-8C viljelmäsupernatantille.

10 A. Supernatantit (25 µl vyöhykettä kohden) ravistelukasvatuspulloista, joissa viljelmää on kasvatettu 115 tunnin ajan YPD-kasvualustassa, johon on lisätty 2 % laktoosia 43 tunnin kuluttua kasvuksen aloittamisesta. Vyöhykkeet a, b ja c: HSA (Sigma) 0,2, 0,5 ja vastaavasti 1,0
15 µg; vyöhyke 1: plasmidi pYG51 (PH05-promoottori); vyöhyke 2: plasmidi pYG19 (PGK-promoottori).

 B. Supernatantit (25 µl vyöhykettä kohden) ravistelukasvatuspulloista, joissa viljelmää on kasvatettu 66 tunnin (vyöhykkeet 1-3) tai 138 tunnin (vyöhykkeet 4-6)
20 ajan YPD-kasvualustassa. Vyöhykkeet a, b ja c: HSA (Sigma) 0,25, 0,5 ja vastaavasti 1,0 µg; vyöhykkeet 1, 2, 4 ja 5: plasmidi pYG58 (tappajatoksiinin erityssignaali, kaksi riippumatonta transformanttia); vyöhykkeet 3 ja 6: plasmidi pYG19 (albumiinin erityssignaali).

25 Kuvio 35. Hiililähteen vaikutus LAC4- tai PGK-promoottorin säätelyn alaisena olevan albumiinierityksen tehokkuuteen: Coomassie-sinisellä värjätty SDS-PAGE-analyysi plasmidilla pYG404 tai pYG19 transformoidun K. lactis kannan CBS2359 viljelmäsupernatantille.

30 Supernatantit (25 µl vyöhykettä kohden) ravistelukasvatuspulloista, joissa viljelmää on kasvatettu 166 tunnin ajan joko YPD:ssä (jossa on 2 % glukoosia) (vyöhykkeet 1 ja 4), YPL:ssä (jossa on 2 % laktoosia) (vyöhykkeet 3 ja 6) tai YPD-kasvualustassa, johon on lisätty 2 % laktoosia
35 48 tunnin kuluttua kasvuksen aloittamisesta (vyöhyk-

keet 2 ja 5). Vyöhykkeet a, b ja c: HSA (Sigma) 0,25, 0,5 ja vastaavasti 1,0 µg; vyöhykkeet 1-3: plasmidi pYG404; vyöhykkeet 4-6; plasmidi pYG19.

5 Kuvio 36. Integroidun tai plasmidipohjaisen PGK- ilmaisukasetin säätelyn alaisena olevan albumiinierityksen tehokkuus: SDS-PAGE-analyysi ja blot -immuunimääritys K. lactis integroitujen kantojen MW98-8C::60-5 ja MW98-8C::60-21 viljelmäsupernatanteille ja plasmidilla pYG19 transformoidun kannan MW98-8C viljelmäsupernatantille. Supernatantit (25 µl vyöhykettä kohden) otettiin ravistelukasvatuspulloista, joissa viljelmää oli kasvatettu 137 tunnin ajan YPD:ssä.

15 A. SDS-PAGE: vyöhykkeet a, b, c ja d: HSA (Sigma) 0,1, 0,25, 0,5 ja vastaavasti 1,0 µg; vyöhyke 1: plasmidilla pYG19 transformoitu kanta MW98-8C; vyöhykkeet 2-7: kuusi riippumatonta integroitua kantaa (MW98-8C::60-5#6, MW98-8C::60-21#9, MW98-8C::60-21#7, MW98-8C::60-5#4, MW98-8C::60-5#8 ja vastaavasti MW98-8C::60-21#11, katso luku E.3.7).

20 B. Western blot -määritys: samat näytteet kuin kohdassa A (25 µl supernatanttia vyöhykettä kohden).

25 Kuvio 37. Albumiinierityksen tehokkuus plasmidilla pYG19 tai pYG221B transformoiduissa eri Kluyveromyces-kannoissa: Coomassie-sinisellä värjätty SDS-PAGE-analyysi konsentroiduista viljelmäsupernatanteista. Soluja on kasvatettu 89 tunnin ajan G418:lla (200 µg/ml) täydennetyssä YPD-kasvualustassa. Supernatantteja konsentroititiin 10-kertaisesti mikrosuodattamalla Centricon 30 -mikrosuodatusyksiköitä (Amicon) käyttäen. Vyöhykettä kohden käytetyn konsentroidun supernatantin tilavuus standardoitiin biomassatuotannon funktiona ja oli 9 - 25 µl.

35 Vyöhykkeet a ja b: HSA (Sigma) 0,5 ja vastaavasti 1,0 µg; vyöhykkeet c ja d: mikrosuodatettu HSA (Sigma). HSA-liuos YPD-kasvualustassa (10 mg/ml) konsentroititiin 10-kertaisesti mikrosuodattamalla. 25 ja 2,5 µl konsentroitua

standardia sijoitettiin vastaavasti vyöhykkeiksi c ja d. Vyöhyke 1: plasmidilla pYG221B transformoitu kanta ATCC16045 (K. marxianus var. bulgaricus); vyöhyke 2: plasmidilla pYG221B transformoitu kanta ATCC24178 (K. wickerhamii); vyöhyke 3: plasmidilla pYG19 transformoitu kanta ATCC12424 (K. marxianus var. marxianus); vyöhyke 4: plasmidilla pYG19 transformoitu kanta ATCC56500 (K. waltii); vyöhyke 5: plasmidilla pYG221B transformoitu kanta ATCC36906 (K. marxianus var. drosophilum); vyöhyke 6: plasmidilla pYG19 transformoitu kanta CBS4574 (K. marxianus var. lactis); vyöhyke 7: plasmidilla pYG19 transformoitu kanta CBS683 (K. marxianus var. lactis); vyöhyke 8: plasmidilla pYG19 transformoitu kanta MW98-8C (K. marxianus var. lactis); vyöhyke 9: plasmidilla pKan707 (vain vektori) transformoitu kanta MW98-8C (K. marxianus var. lactis); vyöhyke 10: plasmidilla pYG221B transformoitu kanta MW98-8C (K. marxianus var. lactis).

Kuvio 38. Elektroforeesitekniikkamalleja (S = standardi; L = hiiva-albumiini)

20 A. SDS-PAGE (Phast-geeli, Pharmacia, gradientti 8 % → 25 %), hopeasuolavärjäys, S = 1 µg; L = 0,05 - 0,25 µg.

B. Isoelektrinen fokusointi (Phast-geeli, pH 4,5-6,0), värjäys Coomassie-sinisellä, täplät = 1 µg.

25 C. SDS-PAGE (7,5 %), värjäys Coomassie-sinisellä, S = 0,2 - 1,0 µg; L = 0,25 - 2,5 µg.

Kuvio 39. Ioninvaihtokromatografia - Mono Q (Pharmacia). Alempi: hiiva-HSA, 40 µg; ylempi: standardi-HSA, 50 µg.

30 Kuvio 40. Kääteisfaasikromatografia, Nucleosil C4. a) standardi-HSA; b) hiiva-HSA.

Kuvio 41. Tryptofaani-fluoresenssiemissiospektrometria. Kiinteä viiva: standardi-HSA; katkoviiva: hiiva-HSA.

35 Kuvio 42. Lämpöstabiilisuus 75°C:ssa. Kiinteä viiva: standardi-HSA; katkoviiva: hiiva-HSA.

Kuvio 43. Antigeenikarakterisoinnissa käytettyjen eri monoklonaalisten vasta-aineiden tunnistamia albumiini-alueita.

5 Kuvio 44. A,B,C: Inhibitiokäyrät (katso tekstio-
suus) käytetyille yhdeksälle monoklonaaliselle vasta-ai-
neelle, joiden spesifisyydet esitettiin kuviossa 43: pro-
sentuaalinen inhibitio albumiinipitoisuuden ($\mu\text{g/ml}$) funk-
tiona; avoimet neliöt: standarsi-HSA; umpinaiset neliöt:
hiiva-HSA.

10 Kuvio 45. Plasmidin pSPGK1 rakentaminen sekä eri-
tyssignaalina käytetyn synteettisen EcoRI-fragmentin nuk-
leotidisekvenssi. Lisäksi esitetään plasmidin pEPGK41 Eco-
RI-kloonauskeskusta ympäröivä nukleotidisekvenssi.

15 Kuvio 46. Plasmidin pSPGK-IL17 rakentaminen sekä
signaalisekvenssin ja Met-IL-1 β :n välistä liitoskohtaa
vastaava nukleotidisekvenssi.

Kuvio 47. Plasmidin pSPGK-IL21 rakentaminen.

Kuvio 48. Plasmidin pSPGK-IL31 rakentaminen.

Kuvio 49. Plasmidin pSPHO4 rakentaminen.

20 Kuvio 50. Plasmidin pSPHO-IL14 rakentaminen.

Kuvio 51. Plasmidin pSPHO-IL23 rakentaminen.

Kuvio 52. Plasmidin pSPHO-IL35 rakentaminen.

Kuvio 53. Stabiilisuuskäyrät plasmideille pCXJ1,
pSPGK-IL31 ja pSPHO-IL35 kannassa MW98-8C ei-selektiivi-
25 sissä olosuhteissa: umpinaiset neliöt, pCXJ1; umpinaiset
kolmiot, pSPHO-IL35 (promoottori ei indusoidu); avoimet
kolmiot, pSPHO-IL35 (promoottori indusoituu); avoimet ne-
liöt, pSPGK-IL31.

Kuvio 54. IL-1 β :n erityys kannassa MW98-8C; viljely-
30 supernatanttien Coomassie Blue'lla värjätty SPS-PAGE-ana-
lyysi. Kukin näytetäplä vastaa 0,2 ml K. lactis kannan
MW98-8C viljelmäsupernatanttia, kun kanta on transformoitu
plasmidilla pKan707 (verrokkivektori, vyöhyke 1), pSPGK-
IL31 (vyöhyke 2) tai pSPHO-IL35 (vyöhyke 3); vyöhyke 4
35 vastaa 1 μg E. colissa tuotettua Met-IL-1 β :aa (Rhone-Pou-

lenc Sante). Näitä transformoituja soluja kasvatettiin kolmen päivän ajan YPD-kasvualustassa, jota oli täydennetty 200 µg/ml G418:aa. Supernatantteja konsentroitiin saostamalla kuten kuvattu tekstiosuudessa.

5 Kuvio 55. Plasmidien pXL348 (Met-tPA) ja pXL459 (prepro-tPA) restriktiokartat.

Kuvio 56. Erittyneen tPA:n aktiivisuustesti. 5 µl K. lactis kannan MW98-8C viljelmäsupernatanttia, kun kanta on transformoitu plasmidilla pYG225B (prepro-tPA, vyöhyke 1), pYG224B (Met-tPA, vyöhyke 2) tai pKan707 (verrokkivek-
10 tori, vyöhyke 3), on sijoitettu täpliksi tPA-aktiivisuuden 5 päivän kasvatuksen selektiivisessä YPD-kasvualustassa (200 µg/ml G418:aa) osoittavalle maljapinnalle.

Kuvio 57. TIMP:n ilmaiseminen ja eritys plasmidilla
15 pYG226B tai pKan707 transformoidussa kannassa MW98-8C. 0,25 µg humaanit-TIMP:tä (Rhone-Poulenc Sante, vyöhyke 1); hiiva-rekombinantti-TIMP:n solunsisäisen ilmaiseminen (plasmidi pYG226B), ei-deglykosyloituna (vyöhyke 2) tai käsittelyn endoglykosidaasi-H:lla jälkeen (vyöhyke 3); E.
20 coli rekombinantti-TIMP-näyte (Rhone Poulenc Sante, vyöhyke 4); verrokkivektorilla pKan707 transformoidun kannan MW98-8C solunsisäisiä fraktioita: ei-deglykosyloituna (vyöhyke 5) tai käsittelyn endoglykosidaasi-H:lla jälkeen (vyöhyke 6); ei-deglykosyloidun tuotteen käsittävät konsentroidut viljelmäsupernatantit: kanta MW98-8C, joka on transformoitu plasmidilla pKan707 (vyöhyke 7) tai pYG226B (vyöhyke 8); konsentroidut viljelmäsupernatantit, joita on konsentroinnin jälkeen käsitelty endoglykosidaasi-H:lla: kanta MW98-8C, joka on transformoitu plasmidilla
25 pKan707 (vyöhyke 9) tai pYG226B (vyöhyke 10); 0,25 µg humaanit-TIMP:tä (Rhone-Poulenc Sante, vyöhyke 11).
30

Esimerkkejä

Yleiset kloonausmenettelyt

 Molekyylibiologian tavanomaisia menetelmiä kuten
35 plasmidi-DNA:n seesiumkloridi-etidiumbromidigradien-

sentrifugointi, restriktioentsyymeillä pilkkominen, geeli-elektroforeesi, DNA-fragmenttien elektroeluutio agaroseegeeleeistä, E. colin transformointi ja muita liittyviä menettelyitä kuvataan kirjallisuudessa (Maniatis et.al.,
 5 "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel, F.M., et.al. (toim.), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987).

Restriktioentsyymit saatiin laitoksesta New England
 10 Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL), tai valmistajalta Amersham.

Ligatointia silmälläpitäen DNA-fragmentit erotetaan koon perusteella 0,7-%:isissa agarose- tai 8-%:isissa akryyliamidigeeleissä, puhdistetaan elektroeluutiolla,
 15 uutetaan fenoliliuoksella, saostetaan etanolilla ja inkuboidaan sitten puskurissa, joka käsittää pitoisuudet 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM ditiotreitoli, 2 mM ATP, pH 7,4, fagi-T4-DNA-ligaasin (Biolabs) läsnäollessa.

Tarvittaessa 3'-typistetyt päädyt omaavat DNA-frag-
 20 mentit defosforyloidaan käsittelemällä alkalisella vaskansuolifosfataasilla (CIP, Pharmacia) 37°C:ssa 30 minuutin ajan seuraavassa puskurissa: 100 mM glysiini, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, pH 10,5. 5'-typistettyjen tai tylppäpäätyisten 5'-päätyjen defosforyloimiseksi käytetään samaa
 25 menettelyä, mutta käsittely suoritetaan 37°C:ssa 15 minuuttia ja sitten 56°C:ssa 15 minuuttia kestäväenä. Entsyymi inaktivoidaan kuumentamalla reaktioseos 68°C:seen 15 minuutiksi 1 %:n SDS:ää ja 100 mM NaCl läsnäollessa, minkä jälkeen uutetaan fenoli/kloroformilla ja saostetaan
 30 etanolilla.

3'-typistetyt päädyt täytetään käyttämällä E. coli DNA-polymeraasi-I:n Klenow-fragmenttia (Biolabs). Reaktio suoritetaan huoneen lämpötilassa 30 minuuttia kestäväenä puskurissa, joka käsittää pitoisuudet 50 mM Tris-HCl, 0,4
 35 mM dNTP, 10 mM MgSO₄, 0,1 mM ditiotreitoli, 50 µg/ml BSA (nautaseerumialbumiini), pH 7,2. 5'-typistetyistä päädyis-

tä tehdään tylppäpäätyisiä fagi-T4-DNA-polymeraasia (Bio-labs) käyttäen valmistajan suosituksia noudattaen. Typistetyt päädyt pilkotaan käsittelemällä rajoitetusti S1-nukleaasilla (BRL) valmistajan suosituksia noudattaen.

- 5 In vitro oligodeoksinukleotidi-ohjautuva mutatointi suoritetaan Taylorin et.al. (Taylor, J.W., et.al., Nucleic Acids Research, 13 (1985) 8749-8764) kehittämän menetelmän mukaan käyttäen valmistajan Amersham markkinoimaa valmistepakkausta. Nukleotidisekvensointi suoritetaan ketjupää-
- 10 tymenettelyn mukaan (Sanger, F., et.al., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 74 (1977) 5463-5467). Spesifisten DNA-fragmenttien entsymaattinen vahvistaminen suoritetaan polyme-
- raasiketjureaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) mukaan (Mullis, K.B., ja Faloona, F.A., Meth.Enzym. 155 (1987)
- 15 335-350; Saiki, R.K., et.al., Science 230 (1985) 1350-1354) "DNA-lämpökierrätintä" (Perkin Elmer Cetus) valmistajan ohjeiden mukaan käyttäen.

- Ligatoidulla DNA:lla transformoidaan transformoitumiskelpoisia, seuraavista kannoista saatuja soluja: E. coli MC1060 ([lacIPOZYA], X74, galU, galK, strA^r) tai TG1 ([lac pro A,B], supE, thi, hsdD5/F'traD36, proA⁺B⁺, lacI^q, lacZ M15). Plasmidi-DNA puhdistetaan ampisilliini- tai tetrasykliiniresistenteistä transformanteista kulloisten-
- 20 kin tarpeiden mukaan. Plasmidi-DNA uutetaan Maniatiksen et.al. (Maniatis, T., et.al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982) kuvaaman menettelyn mukaan, joka on kehitetty Birnboimin ja Doly'n (Birnboim, H.C., ja Doly, J., Nucleic Acids Research 7 (1979) 1513-1523) kuvaaman
- 25 menetelmän pohjalta. Plasmidien analysoimiseksi nopeasti valmistetaan bakteerilysaatteja Holmesin ja Quigleyn (Holmes, D.S., ja Quigley, M., Anal.Biochem. 114 (1981) 193-197) menetelmän mukaan, ja analysoidaan ne ilman edeltävää puhdistusta agarosigeelielektroforeesilla. Endonukleaaseilla suoritettun restriktioentsymaattisen analyysin
- 30
- 35

jälkeen halutun rakenteen omaavia rekombinanttiplasmideja valmistetaan suuressa mittakaavassa alkalisen lyysimenetelyn mukaan (Maniatis, T., et.al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982) käyttäen 0,5 - 1 litran viljelmiä, minkä jälkeen ne puhdistetaan seesiumkloriditiheys-sentrifugointia käyttäen.

K. lactiksen transformointia vieras-DNA:lla ja plasmidi-DNA:n puhdistamista K. lactiksesta kuvataan tekstissä.

Esimerkki 1: Prepro-HSA-rakennegeenin sisältävän kasetin kloonaminen

E.1.1. HSA:ta koodaavan komplementti-DNA:n (cDNA:n) eristäminen

HSA:n ilmaisen E. colissa mahdollistavien rekombinanttiplasmidien rakentamista on kuvattu yksityiskohtaisesti varhemmassa EP-hakemusjulkaisussa 0 198 745 (EP 198 745, julk. 22.10.1986). Yhteenvetona, cDNA saatiin ihmisen maksasta eristetyistä poly(A)-mRNA:sta guanidiinitiosyanaattimenettelyn mukaan (Chirgwin, J.M., et.al., Biochemistry 18 (1979) 5294). DNA-sekvenssianalyysin avulla saatiin eristetyksi kolme kloonia (pTIB11, pAA38 ja p6D8, kuvio 1), jotka sisältävät limittyviä fragmentteja albumiinin rakennegeenistä ja omaavat näissä limittyvissä osuuksissa yhteisiä restriktioentsyymikeskuksia. Näiden keskuksien avulla rakennettiin HSA:n cDNA-klooni (kuvio 1), joka on prepro-sekvenssiä lukuunottamatta täydellinen.

E.1.2. HSA:n prepro-sekvenssin synteesi

Plasmidissa pXL276, jonka rakentamista on kuvattu yksityiskohtaisesti EP-hakemusjulkaisussa 0 198 745, kypsän HSA:n koodisekvenssi on fuusioitu lukualueella bakteriofagilambdan cII-geenin ribosomisitoutumiskeskuksen (RBS:n) ATG-kodoniin (kuvio 2). Fuusiossa muodostuu NdeI-keskus välittömästi ylävirtaan HSA-geenin translaation aloituskodonista. pXL276:ta käyttäen jälleenrakennetaan

HSA:n prepro-alue, jonka todetaan olevan typistyneenä cDNA:ssa välittömästi ylävirtaan TaqI-keskuksesta aminohappoaseman "-1" kohdalla. Keskus saadaan jälleenrakennetuksi insertoimalla HSA-prepro-sekvenssiä vastaava DNA-fragmentti neljän, 33-36 emäksen pituisen oligodeoksinukleotidin muodossa (Sq32, Sq34, Sq35 ja Sq38; kuvio 2) sekä *E. coli* -geenien ilmaisu signaalit käsittävä, pXL276:sta saatu 120 bp:n EcoRI-NdeI-fragmentti plasmidin pUC8 EcoRI- ja AccI-keskuksien väliin. TaqI-keskus saadaan täten jälleenrakennettua tämän pXL290:ksi nimetyn plasmidin käsittämän insertin toiseen päähän (kuvio 2). RBS:n ja prepro-sekvenssin TaqI-keskuksesta ylävirtaan käsittävä pieni HindIII-TaqI-fragmentti ligatoidaan HSA-cDNA-kloonin TaqI-PstI-fragmentin (plasmidi pLB11, joka sisältää HSA:n 5'-päädyn), ohella pUC8:n HindIII- ja PstI-keskuksien väliin, jolloin saadaan plasmidi pXL299 (kuvio 3). Plasmidi pXL322 rakennetaan ligatoimalla pXL299:n HindIII-PvuII-fragmentti, joka sisältää RBS:n ja prepro-HSA-sekvenssin PvuII-keskukseen asti, pXL276:sta peräisin olevaan suurikokoiseen PvuII-EcoRI-fragmenttiin, joka käsittää replikonin ja HSA-koodisekvenssin 3'-päädyn, ja pXL276:sta peräisin olevaan, promoottorin käsittävään EcoRI-HindIII-fragmenttiin (kuvio 4).

25 E.1.3. HindIII-keskuksen muodostaminen ylävirtaan HSA:n translaation aloituskodonista

Prepro-HSA-kasetin saamiseksi, jonka kykenee vaikeuksitta integroitumaan ilmaisuvektoreihin, edellä kuvatun plasmidin pXL322 NdeI-keskus vaihdetaan HindIII-keskukseksi oligodeoksinukleotidi-ohjautuvan mutatoinnin avulla. Tässä tarkoituksessa prepro-HSA-geenin 5'-päädyn sisältävä pXL322:n HindIII-BglII-fragmentti alakloonataan M13mp18:aan, minkä jälkeen mutatointi suoritetaan hybridoidimalla synteettinen oligodeoksinukleotidi 5'-ATCTAAGGA-AATACAAGCTTATGAAGTGGGT-3' yksisäikeiseen templaattiin (alleviivattu ja vastaavasti lihavoitu sekvenssiosuus edustaa

HindIII-keskusta ja vastaavasti translaation aloituskoh-
 taa). Näin saatiin plasmidi pXL855 (kuvio 5), jonka muta-
 toidun alueen nukleotidisekvenssi varmistettiin ketjupää-
 tymenetelmän avulla. Täydellistä prepro-HSA:ta koodaava
 5 sekvenssi jälleenrakennetaan insertoimalla mutatoidusta
 fagista saatu HindIII-PvuII-fragmentti sekä pXL322:sta
 peräisin oleva PvuII-HindIII-fragmentti, joka sisältää
 HSA:n rakennegeenin 3'-päädyn, pUC8:n HindIII-keskukseen,
 jolloin saadaan plasmidi pXL869 (kuvio 6). Tämä plasmidi
 10 siis sisältää täydellisen prepro-HSA-rakennegeenin sisäl-
 tävän 1,87 kb:n HindIII-fragmentin sekä ei-translatoitu-
 neen 61 bp:n alueen 3'-päädyssään. HindIII-fragmentin täy-
 dellinen sekvenssi sekä rekombinantti-HSA:n aminohapposek-
 venssi esitetään kuviossa 7. Vailla erityssignaalia olevan
 15 Met-HSA-rakennegeenin sisältävä HindIII-kasetti rakenne-
 taan noudattamalla samaa menettelyä lukuunottamatta, että
 mutatoidaan pXL276-plasmidin M13-johdannainen käyttäen
 synteettistä oligodeoksinukleotidiä 5'-ATCTAAGGAAATACAAG-
CTTATGGATGCACAC AAG-3'. Jälleenrakentamalla täydellinen
 20 Met-HSA-koodisekvenssi pUC8:aan saadaan plasmidi pXL868
 samaan tapaan kuin plasmidi pXL869.

Esimerkki 2: Hiivakloonausvektorien rakentaminen

E.2.1. Plasmidin pKD1 eristäminen ja puhdistaminen

Plasmidi pKD1 voidaan puhdistaa K. drosophilorum
 25 kanta UCD 51-130 (U.C.D. Collection, University of Cali-
 fornia, Davies, CA 95616) -viljelmän myöhäisestä logarit-
 misesta kasvuvaiheesta seuraavan menettelyn mukaan, joka
 on kehitetty Fleerin et.al. (Mol.Cell.Biol. 7 (1987) 1180-
 1192) kuvaamasta menettelystä. Yksi litra YPD-kasvualus-
 30 taan [1% hiivauutetta, 2 % Bacto-Peptone-tuotetta (Difco),
 2 % glukoosia] kasvatettua viljelmää sentrifugoidaan, saa-
 dut solut pestään ja uudelleenlietetään 1,2 M sorbitoli-
 liuokseen, minkä jälkeen soluista poistetaan soluseinä,
 eli muutetaan ne sferoplasteiksi, tsymolyaasin (300
 35 µg/ml), 25 mM EDTA:n, 50 mM fosfaatin ja β-merkaptotano-

lin (1 µg/ml) läsnäollessa. Kun sferoplastit on pesty 1,2 M sorbitoliliuoksessa, ne (saatu määrä vastaa 250 ml alkuperäistä viljelmää putkea kohden) uudelleenlietetään 2,5 ml:aan 1,2 M sorbitoliliuosta, ja lisätään sama tilavuus
 5 puskuria, joka käsittää pitoisuudet 25 mM Tris-HCl, 50 mM glukoosi ja 10 mM EDTA, pH 8,0. Seuraavat vaiheet vastaavat aiemmin kuvattua alkalista lyysimenettelyä (Maniatis, T., et.al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982)
 10 lukuunottamatta, että DNA saostetaan 23°C:ssa 15 minuutissa lisäämällä 14 ml isopropanolia. Saatua materiaalia käsitellään RN-aasilla (50 µg/ml) 37°C:ssa 20 minuuttia ja sitten proteinaasi-K:lla (150 µg/ml) liuoksessa, joka käsittää pitoisuudet 0,5 M NaCl, 0,5 % sarkosyyliä ja 25 mM
 15 EDTA, tunnin ajan 60°C:ssa. Sitten sentrifugoidaan Eppendorf-mikrosentrifugissa, minkä jälkeen supernatantit saostetaan etanolilla 10 minuutissa -70°C:ssa, saadut pelletit uudelleenliuotetaan ja DNA puhdistetaan seesiumkloridi- (CsCl-) tiheysgradienttisentrifugoinnilla etidiumbromidin läsnä ollessa.
 20

E.2.2. Plasmidin pCXJ1 rakentaminen

Rakennusvälituote pUC-URA3 (kuvio 8) koostuu S. cerevisiae URA3-geenin sisältävästä 1,1 kb:n HindIII-fragmentista, joka on insertoitu plasmidin pUC19 yksittäiseen
 25 NarI-keskukseen (Yanisch-Perron, C., et.al., Gene 33 (1985) 103-119). HindIII-fragmentti saadaan plasmidista pG63 (Gerbaud, C., et.al., Curr.Genet. 3 (1981) 173-180), jota on pilkottu HindIII:lla ja käsitelty sitten E. coli DNA-polymeraasi-I:n Klenow-fragmentilla tylppien päätyjen
 30 muodostamiseksi. URA3-geenin sisältävä 1,1 kb:n fragmentti puhdistetaan ja insertoidaan sitten plasmidiin pUC19, jota puolestaan on pilkottu NarI:llä ja käsitelty sitten E. coli DNA-polymeraasi-I:n Klenow-fragmentilla. Plasmidi pUC-URA3 sisältää täten: toisiintumisalkukohdan plasmidin
 35 ylläpitämiseksi E. colissa, ampisilliiniresistenssimerkin

E. coli transformointeja silmälläpitäen, polyliittäjän sisältävän lacZ-geenin (EcoRI, SacI, KpnI, BamHI, XbaI, SalI, SphI, HindIII yksittäisinä keskuksina) sekä S. cerevisiae URA3-geenin, joka toimii valikointimerkkinä

5 K. lactiksen uraA-mutanteissa.

Plasmidi pCXJ1 (kuvio 9) sisältää plasmidin pKD1 täydellisen sekvenssin, joka on insertoitu pUC-URA3:n yksittäiseen AatII-keskukseen. Tämä rakenne on saatu linea-risoimalla pKD1 EcoRI-keskuksessa ja sitten käsittelemällä

10 kyseistä plasmidia E. coli DNA-polymeraasi-I:n Klenow-fragmentilla. Tämä DNA-fragmentti ligatoidaan pUC-URA3:-een, jota on edeltäpäin pilkottu AatII:lla ja käsitelty T4-DNA-polymeraasilla. Ligatoimalla nämä kaksi fragmenttia saadaan jälleenrakennettua EcoRI-restriktiokeskukset. pUC-

15 URA3-DNA:n insertointi plasmidin pKD1 EcoRI-keskukseen ei inaktivoi mitään plasmidin stabiilisuuden ja kopioluvun ylläpidon kannalta välttämätöntä geeniä (koska EcoRI-keskus sijaitsee 205 nukleotidia (nt:tä) ylävirtaan geenin B ATG-kodonista; Chen, X.J., et.al., Nucleic Acids Research

20 14 (1986) 4471-4481). Tästä johtuen plasmidi pCXJ1, joka transformoi K. lactis uraA cir^o -soluja korkealla taajuudella, vahvistuu noin 70-100 kopioksi solua kohden ja tulee stabiilisti ylläpidetyksi myös valikointipaineen puuttuessa. pUC-URA3:sta peräisin olevan toisiintumisalkukohdan ansiosta plasmidi pCXJ1 kykenee toisiintumaan myös E. coli

25 colissa, mikä helpottaa plasmidin rakentamis- ja puhdistusvaiheita. Plasmidin pCXJ1 käsittämät yksittäiset keskukset, joihin voidaan insertoida vieras-DNA:ta, ovat pUC19-polyliittäjästä peräisin olevat HindIII- ja SalI-

30 keskus.

E.2.3. K. lactis P_{k1}-promoottorin ja Tn903:n 3'-aminoglykosidifosfotransferaasigeenin välisen fuusion aikaansaaminen

pCXJ1:n käyttö vektorina K. lactiksen ja muiden

35 Kluyveromyces-lajien transformoinneissa rajoittuu kantoi-

hin, jotka käsittävät kromosomi-uraA-mutaation auksotrofimerkkinä. Teollisten Kluyveromyces-villityyppikantojen transformoimiseksi valitsimme bakteeritransposonin Tn903 3'-aminoglykosidifosfotransferaasi- (aph-) geenin dominoivaksi antibioottiresistenssimerkiksi, ja insertoimme sen pCXJ1:een. Aph-geeni tuo resistenssin kanamysiinille E. colissa ja villityypin hiivakannoissa ilmaistuna resistenssin antibiootille G418 (genetisiini), joka on tehokkaasti solukasvua inhiboiva aine (Jimenez, A., ja Davies, J., Nature 287 (1980) 869-871). Aph-geenin riittävän voimakkaan ilmaisun K. lactiksessa saamiseksi aph-geenin bakteeriperäiset transkriptiosignaalit korvataan K. lactis tappajaplasmidista kl eristetyllä ORF1-promoottorilla (P_{kl}).

P_{kl} -aph-fuusio aikaansaadaan useassa vaiheessa (kuviot 10 - 12). Ensimmäisessä vaiheessa plasmidista kl saatu 1,5 kb:n ScaI-PstI-fragmentti alakloonataan pBR322:n yksittäisten ScaI- ja PstI-keskuksien väliin; ampisilliinille herkkä, tetrasykliiniresistentti rekombinanttiplasmidi nimetään plasmidiksi pk1-PS1535-6 (kuvio 10). 1,5 kb:n alakloonattu ScaI-PstI-fragmentti saadaan lineaarisen tappajaplasmidin toisesta päädystä: se sisältää 5'-puolikasosan plasmidin kl sisältämästä ORF1:stä ja noin 220 emäsparia ylävirtaan (Sor, F. ja Fukuhara, H., Curr.Genet. 9 (1985) 147-155). Koska ScaI-keskus sijaitsee vain 22 emäsparin päässä kl:n vasemmanpuoleisesta päädyestä (kuvio 10), 1,5 kb:n ScaI-PstI-fragmentti todennäköisesti sisältää promoottorialueen ORF1 (P_{kl}) kokonaisuudessaan. Pilkkomalla pk1-PS1535-6:ta DdeI:lla saadaan 266 bp:n fragmentti, joka sisältää 17 pBR322:sta peräisin olevaa emäsparia (bp:tä) toisessa päädyssään (lähellä ScaI:tä) ja ensimmäiset 11 kodonia ORF1:stä vastakkaisessa päädyssään. Käsittelyn E. coli DNA-polymeraasi-I:n Klenow-fragmentilla jälkeen puhdistettu fragmentti insertoidaan plasmidin pUC-kanal yksittäiseen XhoI-keskukseen (kuvio 11). Viimeksi

mainittu plasmidi saatiin insertoimalla 1,25 kb:n EcoRI-fragmentti, joka sisältää Tn903:sta peräisin olevan aph-geenin (Kanamycin Resistance Gene BlockTM, Pharmacia), pUC19:n yksittäiseen EcoRI-keskukseen. Plasmidi pUC-kan202
 5 saadaan pilkkomalla pUC-kan1 täydellisesti XhoI:llä, ja pilkkomalla sitä sitten lyhyesti S1-nukleaasilla, jolloin päädyistä tulee tylppiä, minkä jälkeen tulos ligatoidaan pk1-PS1535-6:sta peräisin olevaan DdeI-fragmenttiin, josta on tehty tylppäpäätyinen E. coli DNA-polymeraasi-I:n Klenow-fragmenttia käyttäen (kuvio 11). Tätä rakennetta käyttämällä voidaan saada lukualueella oleva fuusio lineaarisen plasmidin k1 ORF1-geenin 11 ensimmäisen aminohapon ja Tn903:n aph-geenin 5'-typistetyn päädyn välillä. Itse asiassa ORF1:n ja aph:n välinen liitos palauttaa aph:n 12.
 10 kodonin (AGG), jolloin aph:n 11 ensimmäistä aminohappoa ovat tulleet korvatuiksi ORF1:n 11 ensimmäisellä aminohapolla. P_{k1}-'aph-fuusiossa käytetyn ORF1-promoottorin täydellinen sekvenssi sekä aph:ta koodaavan rakennegeenin alku on esitetty kuviossa 12.

20 E.2.4. Plasmidin pKan707 rakentaminen

Plasmidi pKan707 (kuvio 13) on edellä kuvatun plasmidin pCXJ1 johdannainen. Se rakennetaan leikkaamalla plasmidia pCXJ1 HindIII:lla ja käsittelemällä sitä sitten E. coli DNA-polymeraasi-I:n Klenow-fragmentilla. Saatu lineaarisoitu tylppäpäätyinen plasmidi ligatoidaan sitten 1,2
 25 kb:n ScaI-HincII-fragmenttiin, joka on peräisin plasmidista pUC-Kan202 ja sisältää P_{k1}-'aph-fuusion (kuvio 13). Pilkkomalla pUC-Kan202:ta ScaI:llä ja HincII:lla saadaan tylppäpäätyinen kanamysiiniresistentti kasetti, joka ei
 30 enää sisällä alkuperäistä bakteeripromoottoria. Saatu plasmidi, pKan707, tuo resistenssin hyvin korkeille G418-pitoisuustasojille (> 2,5 g/litra) K. lactis -kannoissa. Kuten pCXJ1, plasmidi pKan707 voidaan viedä K. lactis cir^O-kantoihin korkealla taajuudella, jolloin se vahvistuu 70-100 kopioksi solua kohden ja tulee stabiilisti yl-
 35

läpidetyksi myös valikointipaineen puuttuessa (kuvio 14). Koska useimmat Kluyveromyces-kannat ovat hyvin herkkiä G418:lle ja koska läsnä on tehokas, teollisten kantojen transformoinnin mahdollistava dominoiva merkki, pKan707
 5 on erittäin hyödyllinen kloonausvektori Kluyveromyces-suvun hiivoille.

Esimerkki 3: Ilmaisuvektorien rakentaminen, jotka sisältävät ilmaisu- ja/tai erityiskasetit albumiinille hii-
 vassa

10 E.3.1. Ilmaisukasettien rakentaminen Met-HSA:lle ja prepro-HSA:lle S. cerevisiae PGK-promoottorin säätelyn alaisina

Plasmidi pYG12 (kuvio 15) sisältää 1,8 kb:n SalI-BamHI-restriktiofragmentin, joka koostuu S. cerevisiae
 15 PGK-geenin promoottori- ja päättäjä-alueista. Tämä fragmentti saadaan 3,0 kb:n HindIII-genomifragmentista, josta 1,2 kb:n rakennegeeniä vastaava fragmentti on deletoitu, ja joka käsittää translaation aloittavan ATG:n ja sen BglII-keskuksen, joka sijaitsee 30 kodonia ylävirtaan
 20 translaation päätöksen määräävästä TAA-kodonista, välisen alueen (Mellor, J., et.al., Gene 24 (1983) 1-14). Näin mukaan tulevat 1,8 kb:n fragmenttia sivuavat HindIII-keskukset tuhoetaan sitten ja korvataan SalI- ja BamHI-keskuk-
 sella, jotka tulevat sijaitsemaan ylävirtaan promoottori-
 25 alueesta ja vastaavasti alavirtaan PGK-transkriptiopäät-
 täjästä. Sitten sijoitetaan HindIII-keskus promoottori- ja päätösalueiden väliseen liitoskohtaan; koska tämä keskus on yksittäinen, se sallii heterologisten geenien vai-
 keuksitta tapahtuvan insertoinnin. Tämän alueen nukleoti-
 30 disekvenssi on esitetty kuviossa 15. Sitten plasmidin pYG12 HindIII-keskukseen insertoidaan plasmidista pXL868 (katso E.1.3.) saatu ja Met-HSA:ta koodaava 1,8 kb:n HindIII-fragmentti, jolloin saadaan rekombinanttiplasmidi pYG10. Plasmidi pYG11 muodostetaan vastaavalla tavalla
 35 insertoimalla plasmidiin pYG12 HindIII-fragmentti, joka

on saatu plasmidista pXL869 (katso E.1.3.) ja joka koodaa prepro-HSA:ta (kuvio 15). Näiden toimenpiteiden seurauksena saadaan siten rakennetuiksi kaksi SalI-BamHI-ilmaisukasettia, jotka ovat kooltaan noin 3,6 kb:tä ja käsittävät

5 S. cerevisiae PGK-geenipromoottorin (P_{PGK}), jota seuraa joko Met-HSA:ta tai prepro-HSA:ta koodaava geeni ja lopuksi PGK-geenin transkriptiopäättäjää (T_{PGK}) vastaava alue, johon alueeseen sisältyy mRNA:n polyadenylaatiokeskus.

E.3.2. Ilmaisuplasmidien pYG19, pYG23 ja pYG221
10 rakentaminen

Edellä kuvattujen ilmaisukasettien viemiseksi vektoriin pKan707 plasmidista pYG10 ja vastaavasti pYG11 saadut 3,7 kb:n SalI-BamHI-fragmentit alakloonataan ensimmäisenä vaiheena plasmidin pIC-20R (Marsh, L., et.al., Gene

15 32 (1984) 481-485) vastaaviin keskuksiin, jolloin saadaan plasmidirakenteet pYG18 (prepro-HSA) (kuvio 16) ja pYG22 (Met-HSA). Näistä rakennusvälituotteista saadaan P_{PGK} /Met-HSA/ T_{PGK} - ja P_{PGK} /prepro-HSA/ T_{PGK} -ilmaisukasetteja SalI-SacI-restriktiofragmenttien muodossa, jotka voidaan inser-

20 toida suoraan pKan707:n vastaaviin keskuksiin (kuvio 17). Pilkkomalla viimemainittua entsyymeillä SalI ja SacI saadaan deletoitua URA3-merkki sekä pKD1:n B-geenistä ylävirtaan sijaitseva 35 bp:n fragmentti. Näin saadut rakenteet, jotka nimetään pYG19:ksi (prepro-HSA) (kuvio 18) ja

25 pYG23:ksi (Met-HSA), käsittävät P_{PGK} /HSA/ T_{PGK} -ilmaisukasettit, K. drosophilae plasmidin pKD1 lähes täydellisen sekvenssin, itsenäisen toisiintumisen E. colissa mahdollistavat sekvenssit sekä β -laktamaasia ja 3'-aminoglykosidifosfotransferaasia (P_{k1} -promoottorin säätelyn alaisena)

30 koodaavat geenit, jolloin E. colissa valikointi voidaan suorittaa ampisilliinin ja K. lactiksessa vastaavasti G418:n läsnäollessa.

HSA-eritysvektoreita, joissa on tallella plasmidin pKan707 URA3-geeni, rakennettiin niinikään. Kuten ilmenee

35 kuviosta 19A, plasmidi pYG208 saadaan plasmidista pYG12

insertoimalla BamHI/SalI-adaptorisekvenssi (5'-GATCCGTCG-ACG-3') PGK-päättäjistä alavirtaan. Prepro-HSA:ta koodaava HindIII-fragmentti puhdistetaan elektroeluution avulla plasmidista pXL869 (prepro-HSA) ja kloonataan oikealla tavalla suuntautuneena vektorin pYG208 HindIII-keskukseen plasmidin pYG210 saamiseksi; näin saatua SalI-ilmaisukasettia (PGK-promoottori/prepro-HSA/PGK-päättäjä) puhdistetaan elektroeluutiolla, minkä jälkeen se kloonataan plasmidin pKan707 SalI-keskukseen ilmaisuplasmidien pYG221A ja pYG221B saamiseksi (kuvio 19B), jotka eroavat toisistaan vain SalI-ilmaisukasetin suuntautumisessa vektoriin pKan707 nähden. Plasmidissa pYG221B SalI-ilmaisukasetti on G418:lle vastustuskyvyn koodaavaan Km^r-geeniin nähden suuntautunut samalla tavalla kuin plasmidin pYG19 käsittämä SalI-SacI-ilmaisukasetti.

E.3.3. Optimoidun ATG-yhteyden omaavan PGK/LAC-hybridipromoottorin rakentaminen

Indusoitavan johdannaisen ilmaisuplasmidissa pYG19 esiintyvistä PGK-promoottorista saamiseksi PGK-promoottorin UAS korvattiin K. lactis LAC4-promoottorista saadulla UAS:llä (Breunig, K.D., et.al., Nucl.Acids Res. 12 (1984) 2327-2341). Tässä tarkoituksessa PGK-promoottorin sisältävä pYG12:n SalI-HindIII-fragmentti kloonattiin bakteriofagi M13mpl8:aan, jolloin saatiin rakenne pYG14 (kuvio 20). Edellä kuvattua menettelytapaa käyttäen PGK-promoottorialueelle vietiin kaksi NotI-keskusta paikkaohjautuvaa mutatointia käyttäen, jolloin saatiin rakenne pYG26 (kuvio 20). Tässä käytettiin seuraavia synteettisiä oligonukleotidejä:

5'-CAAAACCTGTGA GCGGCCGC TAGGACCTTG-3' (Sq417) ja
5'-GGTAATTTCTTTCTCGATAA GCGGCCGC GTGCTTT ATG-3' (Sq416)

Tällöin saatiin kaikkiaan neljä emäsparimuutosta (alleiviivattu) asemiin -397, -399, -536 ja -541 (jolloin ATG-aloituskodoni on määritelty asemaksi +1; kuvio 21). Tällä tavalla saadut kaksi NotI-keskusta (lihavointi) si-

vuavat PGK-promoottorialuetta, jonka on aiemmin kuvattu sisältävän UAS_{PGK}:n kaksi funktionaalisesti erillistä aluetta (A ja M kuviossa 21A) (Stanway, C., et.al., Nucl.-Acids Res. 15 (1987) 6855-6873). Pilkkomalla tätä PGK-johdannaista entsyymillä NotI saadaan UAS_{PGK} deletoitua ja sitten korvattua synteettisellä fragmentilla, joka sisältää NotI-keskuksien sivuamana UAS_{LAC}:n (kuvio 22), kloonattuna PGK-promoottoriin nähden jommallakummalla tavalla suuntautuneesti. UAS_{LAC}-fragmentti saatiin hybridoidimalla ja sitten ligatoimalla seuraavat neljä oligodeoksinukleotidia:

Sq526, ylempi säie, fragmentti 1:

(-448) 5'-GGC CGC TGT GAA AAG TGT AGC GGA AAT ATG TGG TCC GAG CAA CAG CGT CTT TTT CTA GTA GTG CGG-3' (-389)

15 Sq527, ylempi säie, fragmentti 2:

(-388) 5'-TCG GTT ACT TGG TTG ACA TTG GTA TTT GGA CTT TGT TGC TAC ACC ATT CAC TAC TTG AAG TCG AGT GTG AGC-3' (-319)

Sq528, alempi säie, fragmentti 1:

20 (-319) 5'-GGC CGC TCA CAC TCG ACT TCA AGT AGT GAA TGG TGT AGC AAC AAA GTC CAA ATA CCA ATG TCA ACC AAG T-3' (-382)

Sq525, alempi säie, fragmentti 2:

(-383) 5'-AAC CGA CCG CAC TAC TAG AAA AAG ACG CTG TTG CTC GGA CCA CAT ATT TCC GCT ACA CTT TTC ACA GC-3' (-448)

Sulkeisiin merkityt numerot osoittavat kunkin oligodeoksinukleotidin sijainnin ATG-kodoniin (+1) nähden villityypin LAC4-promoottorissa (Breunig, K.D., et.al., Nucl.Acids Res. 12 (1984) 2327-2341). Asemat -328 - -435 kattavan alueen on osoitettu sisältävän ensimmäisen kolmesta LAC4-promoottorissa tavattavasta UAS-osuudesta (Breunig, K.D., et.al., 5th Internat.Sympos.Genet.Industr.Microorgan., Alacevic, M. et.al. (toim.), 1986, 551-560; Leonardo, J.M., et.al., Mol.Cell.Biol. 7 (1987) 4369-4376). Lihavoidut kirjaimet merkitsevät nukleotidejä, jotka kuuluvat K. lactis LAC4-geenin UAS:ää sivuaviin kahteen NotI-keskukseen; Sq525:tä komplementoiva Sq527:n liitos-

35 sekvenssi on alleviivattu.

Koska lähellä voimakkaasti ilmaistuiksi tulevien eukaryoottisten geenien ATG-käynnistäjää sijaitsevan nukleotidisekvenssin arvellaan vaikuttavan translaation käynnistymisen tehokkuuteen (Kozak, M., Microbiol.Rev. 47 (1983) 1-45; Hamilton, R., et.al., Nucl.Acids.Res. 15 (1987) 3581-3593), PGK-promoottorin ATG-yhteyttä modifioitiin seuraavasti: pYG26:n käsittämän PGK-promoottorin asemaan -25 tuotettiin paikkaohjautuvan mutatoinnin avulla ylimääräinen HindIII-restriktiokeskus (lihavointi), jolloin saatiin plasmidi pYG29 (kuvio 20). Tässä kokeessa käytettiin seuraavaa synteettistä oligodeoksinukleotidiä: 5'-TATATTTGTTGTAAAGCTTAGATAATTACTTCC-3' (Sq449). Sitten edellä kuvattu UAS_{LAC}-fragmentti kloonattiin pYG29:n NotI-keskuksiin, jolloin saatiin plasmidit pYG63-1 ja pYG63-2 (kuvio 22). Viimemainittujen plasmidien PGK/LAC4-hybridipromoottorialueet puhdistettiin SalI-HindIII-fragmentteina, minkä jälkeen ne ligatoitiin synteettiseen HindIII/BstEII-adaptorisekvenssiin, joka koostui seuraavista kahdesta toisiaan komplementoivasta oligodeoksinukleotidistä: (i) 5'-AGC TTT ACA ACA AAT ATA AAA ACA ATG AAG TGG-3' (Sq451) ja (ii) 5'-GT TAC CCA CTT CAT TGT TTT TAT ATT TGT TGT AA-3' (Sq452) (prepro-HSA-aloituskodoni on osoitettu lihavoimalla). Tämä adaptorisekvenssi jälleenrakentaa vililyypin PGK-promoottorista välittömästi ylävirtaan sijaitsevat 22 bp:tä (kuvio 21B) ja käsittää prepro-HSA-rakennegeenin ensimmäiset neljä kodonia luontaisesti esiintyvään BstEII-keskukseen asti. Näin saaduilla SalI-BstEII-fragmenteilla (jotka käsittävät optimoidun ATG-yhteyden omaavan PGK/LAC4-hybridipromoottorin) korvattiin vastaava restriktiofragmentti (joka sisältää ei-mutatoidun PGK-promoottorin) rakenteessa pYG18 (vrt. kuvio 16). Tätä menetelytekniikkaa noudattaen saatiin kaksi rakennevälituotetta, jotka poikkeavat toisistaan vain UAS_{LAC}:n suuntautumisessa PGK-promoottoriin nähden. Näiden uusien rakenteiden avulla rakennettiin SalI-SacI-ilmaisukasetteja, jotka

kloonattiin pKan707:n vastaaviin restriktiokeskuksiin (vrt. kuvio 13), jolloin saatiin plasmidit pYG44-5 ja pYG44-7 (kuvio 23). Nämä plasmidit ovat isogeenisiä lukuunottamatta, että UAS_{LAC}:n sisältävä synteettinen NotI-fragmentti on pYG44-5:ssä villityypin mukaisesti suuntautunut ja plasmidissa pYG44-7 vastakkaisesti suuntautunut.

E.3.4. Vektorin rakentaminen silmälläpitäen prepro-HSA:n eritystä S. cerevisiae PHO5-promoottorin säätelyn alaisena

10 Vektori pEPHO (kuvio 24) sisältää 0,94 kb:n BamHI-PstI-restriktiofragmentin, joka käsittää S. cerevisiae happaman fosfataasin geenin (PHO5:n) promoottori- ja päätösalueen. Tämä fragmentti saadaan 2,03 kb:n BamHI-PstI-genomifragmentista (Bajwa, W., et.al., Nucl.Acids Res. 12
15 (1984) 7721-7739) deletoimalla PHO5-rakennegeeni. Tämä deletio käsittää asemat -3 (ATG-aloituskodoniin asemassa +1 nähden) ja +1109 (TAG-päätöskodonista ylävirtaan sijaitseva Sau3A-keskus). Promoottorin ja päättäjän väliseen liitoskohtaan insertoititiin polyliittäjä EcoRI/SmaI/BamHI,
20 jota voidaan käyttää kloonauskeskuksena jonkin heterologisen geenin insertoimiseksi. PHO5-promoottorin ja tämän polyliittäjän välinen liitoskohta on esitetty alla (polyliittäjää vastaava nukleotidisekvenssiosuus on alleviivattu):

25 5'-AAATTCGAGATTAG GAATTCCGGGGATCC-3'

Rakenteen saamiseksi, jossa HSA-geeni tulee ilmaistuksi PHO5-promoottorin sekä PGK-geenin ei-translatoituvan johtoalueen säätelyn alaisena, plasmidista pEPHO saadun PHO5-promoottorifragmentin asemaan -20 sijoitettiin
30 HindIII-keskus. Tässä tarkoituksessa pEPHO:n 0,83 kb:n SalI-EcoRI-fragmentti alakloonattiin bakteriofagi M13mp9:n polyliittäjään, minkä jälkeen saatua yksisäikeistä templaattia (pYGRF3) mutatoitiin oligodeoksinukleotidia 5'-
CCTAATCTCGAATAAGCTTGCTCTATTG-3' (Sq487; siirretty Hind-
35 III-keskus on merkitty lihavoimalla) mutatoitiprimerinä käyttäen, jolloin saatiin plasmidi pYGRF4 (kuvio 24).

Erilaisten, toisistaan poikkeavia promoottoreita ja/tai päättäjiä sisältävien ilmaisukasettien rakentamisen helpottamiseksi plasmidista pIC-20R (vrt. kuvio 16) muodostettiin johdannainen, josta polyliittäjän HindIII-keskus tuhottiin käsittelemällä koheesiopäätyjä E. coli polymeraasi-I:n suurella fragmentilla (Klenow). Tämän uuden kloonausvektorin (pIC-20R-delta-H3) avulla mukaan liitettiin sitten plasmidista pYG12 (vrt. kuvio 15) saatu PGK-geenin promoottori- ja päätösalueet sisältävä SalI-BamHI-fragmentti, ja saatiin plasmidi pYG61. Käyttämällä promoottoriosuuksia SalI-HindIII-fragmentteina ja päättäjä-osuuksia HindIII-BamHI-fragmentteina voidaan muodostaa ilmaisukasetteja käyttäen mitä tahansa yhdistelmää transkription aloitus- ja päätössignaaleja, joihin ilmaistava rakennegeeni on kloonattu HindIII-restriktiofragmenttina. Pilkkomalla näitä rakennevälituotteita entsyymeillä SalI ja SacI saadut uudet ilmaisukasetit voidaan sitten siirtää hiivakloonausvektorin pKan707 vastaaviin keskuksiin (vrt. kuviot 17 ja 18).

Tätä perustekniikkaa noudattaen plasmidissa pYG61 SalI-HindIII-PGK-promoottorifragmentti korvattiin PH05-promoottorin käsittävällä, pYGRF4:stä peräisin olevalla SalI-HindIII-fragmentilla. Insertoimalla plasmidista pYG44-5 HindIII-fragmenttina (vrt. kuvio 23) eristetty prepro-HSA:n rakennegeeni ja siirtämällä saatu ilmaisukasetti SalI-SacI-fragmenttina plasmidiin pKan707 saatiin erityisvektori pYG51 (kuvio 23). Tämä plasmidi sisältää siis S. cerevisiae PH05-promoottorin asemaan -17 asti [mukaanlukien kaikki transkription aloituskohdat (Rudolph, H., ja Hinnen, A., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 84 (1987) 1340-1344) kuvio 25], ja sen jälkeen 21 bp:tä ei-translatoituvaa PGK-johtosekvenssiä, prepro-HSA:n rakennegeenin ja lopuksi PGK-päättäjän.

E.3.5. Vektorin rakentaminen silmälläpitäen HSA:n erityistä K. lactis LAC4-promoottorin säätelyn alaisena

Polymeraasiketjureaktio- (PCR-) tekniikkaa (Mullis, K.B. ja Faloona, F.A., Meth.Enzym. 155 (1987) 335-350; Saiki, R.K., et.al., Science 230 (1985) 1350-1354) käyttäen K. lactis LAC4-promoottoria vahvistettiin hiivan genomi-DNA:sta SalI-HindIII-restriktiofragmenttina. Temp-
 5 laattina käytettiin kannasta CBS2359 eristettyä kokonais-
 genomi-DNA:ta ja Tag-polymeraasireaktion primereinä käytettiin seuraavia synteettisiä oligodeoksinukleotidejä (K. lactis LAC4-promoottorista ylävirtaan ja vastaavasti ala-
 10 virtaan lisätyt SalI-keskus ja HindIII-keskus on merkitty lihavoimalla):

1) 5'-CCC GTCGAC ATGTAGAGTAGACAACAGACAGGGAGGGC-3'

2) 5'-A AAGCTT ATCTTTCAGTTCTCGATGAGTATGTGTGTT-3'

Näiden primerien rakenne suunniteltiin Leonardon,
 15 J.M., et.al. (Mol.Cell.Biol. 7 (1987) 4369-4376) aiemmin julkistaman LAC4-sekvenssin nojalla. Tällä tavalla saatu SalI-HindIII-restriktiofragmentti sisältää asemat -1198-
 -1 kattavan LAC4-promoottorialueen (kun ATG-aloituskodoni määritellään asemaksi +1). Vahvistettua materiaalia pil-
 20 kottiin entsyymeillä SalI ja HindIII, se kloonattiin plasmidiin pYG61 (vrt. kohta E.3.4.) ja sen nukleotidisekvenssistä varmistuttiin dideoksiketjupäätymenetelmän avulla (Sanger, F., et.al., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 74 (1977) 5463-5467).

25 Noudattaen edeltävässä kohdassa kuvattua yleisstrategiaa saatiin pKan707-johdannainen, joka nimettiin pYG4-04:ksi (kuvio 23), ja jossa prepro-HSA-geeni tulee ilmaistuksi K. lactiksen laktoosi/galaktoosi-indusoitavan LAC4-promoottorin säätelyn alaisena. Tässä nimenomaisessa rakenteessa välittömästi HSA-aloituskodonista ylävirtaan sijaitseva sekvenssi saadaan plasmidista pYG44-5 (fragmentti HindIII), minkä vuoksi se sisältää osan ei-transla-
 30 toitua PGK-geeni johtosekvenssiä (vrt. kohta E.3.3.).

E.3.6. Vektorin rakentaminen silmälläpitäen HSA:n
 35 eristystä S. cerevisiae PGK-promoottorin ja K. lactis tap-
 pajatoksiinierityssignaalin säätelyn alaisena

Kahta paria toisiaan komplementoivia synteettisiä oligodeoksinukleotidejä käyttäen uudelleenrakensimme HindIII-DraI-fragmentin, joka sisältää seuraavat osat: (i) ATG:n viereiset 21 bp:tä PGK-promoottorista, (ii) tappajatoksiinigeenin erityssignaalisekvenssin ("pre"-alueen) K. lactis plasmidista kl (Stark, M.J.R., ja Boyd, A., EMBO J. 5 (1986) 1995-2002) ja (iii) ensimmäiset 17 aminohappoa pro-HSA-geenistä N-päädyn DraI-keskukseen asti, fuusioituna lukualueella tappajatoksiinin pre-alueeseen. Tässä rakenteessa käytetyt neljä oligodeoksinukleotidia olivat seuraavat:

Sq1000, ylempi säie, fragmentti 1:

5'-AGCTTAGCTTTACAACAAATATAAAAACAATGAATATATTTTACATATTTTGTGTTTTTGCTGTC-3'

15 Sq998, ylempi säie, fragmentti 2:

5'-ATTCGTTCAAGGTAGGGGTGTGTTTCGTCGAGATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTT-3'

Sq996, alempi säie, fragmentti 1:

20 5'-AAAAACAAAATATGTAAATATATTCATTGTTTTATATTTGTTGTAAAGCTA-3'

Sq997, alempi säie, fragmentti 2:

5'-AAACCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATCTCGACGAAACACACCCCTACCTTGAACGAATGACAGC-3'

25 Lihavoidut kirjaimet merkitsevät nukleotidejä, jotka kuuluvat tässä kokeessa käytettyihin HindIII-keskukseen ja DraI-keskukseen; Sq996:ta komplementoiva Sq998-liitossekvenssi on alleviivattu.

Oligodeoksinukleotidit Sq996 ja Sq998 fosforyloitiin, minkä jälkeen muodostettiin kaksisäikeinen HindIII-DraI-fragmentti kuviossa 26 esitetyn kaavion mukaan. Tämä 130 bp:n fragmentti puhdistettiin geelielektroforeettisesti ja ligatoitiin 1,04 kb:n DraI-XbaI-fragmenttiin, joka sisältää osan HSA:n rakennegeenistä eristettynä plasmidista pXL869 (vrt. kuvio 6). Näin saatu HindIII-XbaI-fragmentti kloonattiin sitten bakteriofagi M13mpl0:een, jol-

loin saatiin rakenne pYG56 (kuvio 26). Tämän välituotteen oikeasta, halutun mukaisesta nukleotidisekvenssistä varmistuttiin dideoksisekvensoinnilla.

Täydellinen prepro-HSA-rakennegeeni saadaan sitten kootuksi ligatoimalla seuraavat kolme osaa: (i) juuri kuvatus pYG56-rakenteesta saatu 1,17 kb:n HindIII-XbaI-fragmentti, (ii) pYG18:sta saatu XbaI-BamHI-fragmentti (vrt. kuvio 16), joka sisältää HSA-geenin karboksyylipeädympuolikasosan sekä PGK-päättösalueen, ja (iii) BamHI-HindIII-fragmentti plasmidista pYG62. Tämä viimeksi mainittu plasmidi on rakenteen pYG61 johdannainen (vrt. kohta E.3.-4.), jossa PGK-promoottorin käsittävä SalI-HindIII-fragmentti on korvattu vastaavalla, plasmidista pYG29 saadulla restriktiofragmentilla (vrt. kuvio 20). Tässä rakenteessa käytetty plasmidin pYG62 BamHI-HindIII-fragmentti sisälsi siis E. coli toisiintumisalkukohdan, ampicilliniresistenssigeenin sekä asemaan -25 sijoitettuna HindIII-keskuk- sen käsittävän PGK-promoottorin (vrt. kohta E.3.4.). Saatu pIC-johdannainen nimettiin pYG57:ksi. Tätä viimeksi mainittua plasmidia käytettiin lähteenä SalI-SacI-fragmentille, joka kloonattiin hiivakloonauksvektorin pKan707 vastaaviin kes- kuksiin, jolloin saatiin ilmaisuvektori pYG58 (kuvio 23).

E.3.7. Integroidun vektorin rakentaminen PGK/prepro-HSA-erityskasetin ohjaamiseksi K. lactiksen RAG2-kes- kukseen

Plasmidi p31/RAG2:URA3 (kuvio 27), jonka meille ystävällisesti luovutti Dr. M. Wesolowski-Louvel (Institut Curie, Orsay, Ranska), sisältää 2,3 kb:n genomi-NheI-frag- mentin, joka käsittää K. lactiksen RAG2-rakennegeenin pro- moottori- ja N-päätyalueen, jolloin kyseinen geeni toden- näköisesti koodaa fosfogluukoosi-isomeraasia (Wesolowski- Louvel, M., et.al., Nucl.Acids Res. 16 (1988) 8714). Plas- midi p31/RAG2:URA3 rakennettiin insertoimalla plasmidista pCXJ1 (kuvio 9) saatu 1,6 kb:n EcoRI-fragmentti, joka si- sältää S. cerevisiae URA3-geenin, RAG2-promoottorin EcoRI-

keskukseen. Näin saatu 3,9 kb:n NheI-fragmentti kloonattiin sitten plasmidin pBR322 yksittäiseen NheI-keskukseen.

Leikkaamalla plasmidia pYG18 (kuvio 16) restriktioentsyymeillä EcoRV ja SmaI saimme 3,7 kb:n fragmentin, joka sisältää saman PGK/prepro-HSA-ilmaisukasetin kuin hiiva-eritysvektorissa pYG19 (kuvio 18) käytetty. Inser-toimalla tämä kasetti plasmidin p31/RAG2:URA3 yksittäiseen SmaI-keskukseen (joka sijaitsee 3'-suuntaan URA3-merkki-geenistä) saatiin rakenteet pYG60-21 ja pYG60-5 (kuvio 27), jotka poikkeavat toisistaan vain prepro-HSA-ilmaisukasetin suuntautumisen osalta.

Leikkaamalla plasmideja pYG60-21 ja pYG60-5 entsyymillä NheI saimme 7,7 kb:n fragmentin, joka sisältää HSA-ilmaisukasetin ja URA3-merkkigeenin RAG2-peräisten sekvenssien sivuamana. Nämä viimeainitut sekvenssit kykenivät kohdistamaan koko fragmentin integroitumaan K. lactis-kannan MW98-8C RAG2-keskukseen homologisen rekombinaation välityksellä (Rothstein, R.J., Methods in Enzymol. 101 (1983) 202-211). Integroituminen RAG2-keskukseen varmistettiin suorittamalla kolmen kuudesta testatusta integrantista (MW98-8C::60-5-integranttikloonit #6 ja MW98-8C::60-21-integranttikloonit #7 ja #9) Southern-analyysi. Kolmen jäljelle jääneen integrantin todettiin sisältävän yhden (MW98-8C::60-5-integranttikloonit #8 ja MW98-8C::60-21-integranttikloonit #11) tai kaksi (MW98-8C::60-5-integranttikloonit #4) HSA-ilmaisukasettia integroituina muuhun kohtaan kuin RAG2-keskukseen. Kaikkien kuuden varman integrantin HSA-erityksen tehokkuutta tutkittiin.

Esimerkki 4: Kluyveromyces-lajien transformointi
HSA:n ilmaisevilla plasmideilla

E.4.1. Transformointimenettelyt

K. lactis -kannan MW98-8C (alfa uraA arg lys K^+ pKD1⁰) transformantteja saatiin joko käyttämällä soluseinä-
nää vailla olevien solujen muodostus- eli sferoplastien
muodostustekniikkaa, jota alunperin kuvasivat Hinnen et.

- al. (Hinnen, A., et.al., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 75 (1978) 1929-1933), sopivasti modifioituna, tai käsittelemällä kokonaisia soluja litiumasetaatilla (Ito, H., et.al., J.Bacteriol. 153 (1983) 163-168), joka käsittely edesauttaa DNA:n liittymistä polyetyleeniglykolin (PEG 4000, Sigma) läsnäollessa. Mainittua kantaa lukuunottamatta kaikista alla kuvatuista Kluyveromyces-kannoista transformantit valmistettiin yksinomaan litiumasetaatilla käsittelemällä.
- 10 Näyte kannasta MW98-8C on talletettu talletuslaitokseen Centraalbureau voor Schimmelkulturen (CBS), Baarn, Hollanti, Budapestin sopimuksen sopimusehtojen mukaisesti, jolloin kanta rekisteröitiin 16.09.1988 ja se sai hakunumeron CBS 579.88.
- 15 Sferoplastien muodostukseen liittyviä modifikaatioita on jo aiemmin kuvattu (Bianchi, M., et.al., Curr.-Genet. 12 (1987) 185-192). Litiumasetaatimenetelmää käytettäessä soluja kasvatetaan 28°C:ssa 50 ml:ssa YPD-kasvualustaa ravistelua käyttäen, kunnes optinen tiheys 600 nm:n aallonpituudella (OD_{600}) on 0,6 - 0,8. Solut otetaan talteen sentrifugoimalla alhaisella kierroksnopeudella, minkä jälkeen ne pestään steriilissä TE-liuoksessa (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA), uudelleenlietetään 3 - 4 ml:aan litiumasetaattiliuosta (0,1 M TE:ssä) solutiheydeksi noin 2×10^8 solua/ml ja inkuboidaan sitten 30°C:ssa 25 tunnin ajan samalla kohtuullisella teholla sekoittaen.
- Saadusta transformoitumiskelpoisia soluja käsittävistä lietteestä otetaan 0,1 ml:n näytteitä, joita inkuboidaan 30°C:ssa tunnin ajan DNA:n ja PEG 4000 -valmisteen loppupitoisuutena 35 % läsnäollessa. Soluille tuotetaan 30 lämpöshokki 42°C:ssa, 5 minuuttia, minkä jälkeen ne pestään kahdesti steriilillä vedellä, uudelleenlietetään 0,2 ml:aan steriiliä vettä ja siirretään 10 ml:n koeputkiin. Sitten lisätään 0,7 % agar-agarua sisältävä ja 46°C:ssa 35 sulana pidetty YPD-kasvualusta (5 ml), ja seos kaadetaan

välittömästi YPD-maljoihin. Kasvualustan kiinteydyttyä lisätään vielä 5 ml:sta pinta-agaria koostuva päällyskeros. Inkuboidaan 18 - 24 tuntia 28°C:ssa, minkä jälkeen maljapinnoille levitetään 0,16 ml G418-liuosta (Geneticin 5 50 mg/ml, Gibco, Grand Island, N.Y.) ja lasketaan transformantit 4-5 päivän jatkoinkuboinnin 28°C:ssa jälkeen.

Maljoittamalla solut suoraan YPD + G418 -maljoihin (eli käyttämättä pinta-agaria) saadaan transformoituneiden K. lactis -solujen suurikokoisempia klooneja. Pesäkkeiden 10 toteamiseksi joudutaan kuitenkin käyttämään alhaisempaa G418-pitoisuutta (loppupitoisuus 50 µg/ml), mikä johtaa osittaista vastustuskykyä G418:lle omaavien mutanttien valikoitumiseen, jotka ovat peräisin ei-transformoituneista soluista. Lisäksi transformointitehokkuus on ainakin 15 10 kertaa alhaisempi kuin teho, joka todetaan resistenssi-geenin 18 - 24 tuntia kestäneen fenotyyppi-ilmaisun jälkeen.

E.4.2. HSA:n ilmaisevien, pKD1-peräisten plasmidien mitoottinen stabiilisuus ei-selektiivisissä kasvatusolo- 20 suhteissa

Plasmidien pYG19 ja pYG23 mitoottinen stabiilisuus mitataan vaihtelevan pituisten aikajaksojen kuluttua ei-selektiivisessä kasvualustassa suoritetun kasvatuksen jälkeen; se määritetään 200 µg/ml G418:aa sisältävissä YPD- 25 maljoissa kasvavien solujen prosentuaalisten loppu- ja alkupitoisuuksien välisenä suhteena. Kuten ilmenee kuvios- ta 28, molemmat plasmidit ovat poikkeuksellisen stabiileja huolimatta heterologisen geenin korkeasta ilmaisutasosta. Kasvatettaessa kannan MW98-8C transformantteja ei-selek- 30 tiivisessä kasvualustassa 40 solupolven ajan nämä plasmidit säilyvät 40-45 %:ssa soluista. Plasmidi pYG19 osoittaa jopa korkeampaa mitoottista stabiilisuutta K. lactis- kannassa CBS683: yli 80 %:ssa soluista plasmidi säilyy 40 solupolven kasvatuksessa ei-selektiivisessä kasvualustas- 35 sa.

E.4.3. K. lactis -kannan pYG19- ja pYG23-transformantit: HSA:n ilmaisu ja erityys

Plasmidin pYG19 (prepro-HSA) tai pYG23 (Met-HSA) sisältävien K. lactis -kannan MW98-8C solujen ilmaisu- ja erityystasot määritetään vaihtelevan pituisen kasvatusajan jälkeen, kun kasvatus on suoritettu 28°C:ssa ei-selektiivisessä YPD-kasvualustassa jatkuvaa ravistelua käyttäen. Viljelmäsupernatantit saadaan käyttämällä kahta toisiaan seuraavaa sentrifugointia (Kontron Hermle Z-365 K -sentrifugi, 5 min, 4000 kierr./min, ja sitten 10 min, 12 000 kierr./min), jotka suoritetaan kaiken mahdollisen solukontaminaation eliminoimiseksi. Jälkimmäisestä supernatantista otettu näyte (0,5 ml) kuumennetaan 95°C:seen 15 minuutiksi saman tilavuuden puskuria läsnä ollessa, joka puskuuri sisältää 0,125 M Tris-HCl, 20 % glyserolia, 10 % 2-merkapttoetanolia (β -ME), 4,6 % natriumdodesyyilisulfaattia (SDS) ja 0,4 % bromifenolisiniä. Haluttaessa määrittää supernatantin sisältämien proteiinien pitoisuus 8 ml:aan supernatanttia lisätään 0,4 ml 100 % w/v trikloorietikkahappoliuosta (TCA-liuosta) ja saostetaan proteiineja jäisessä tunnin ajan. Saostunut materiaali otetaan talteen sentrifugoimalla 20 minuuttia 15 000 kierr./min kierrosnopeudella, minkä jälkeen se uudelleenliuotetaan kuumentamalla 95°C:seen 15 minuutiksi 0,5 ml:ssa näytepuskuria, joka sisältää 63 mM Tris-HCl, 10 % glyserolia, 5 % β -ME:tä, 2,3 % SDS:ää ja 0,2 % bromifenolisiniä.

Albumiinin solunsisäinen ilmaisu todetaan käyttäen seuraavalla tavalla valmistettuja solu-uutteita: 0,25 ml:n solupellettiä vastaava määrä (joka on pesty kertaalleen suolaliuospuskurissa) uudelleenlietetään samaan tilavuuteen lyysipuskuria, jota pidetään jäisessä ja joka sisältää 67 mM fosfaattia, pH 7, 5 mM β -ME:tä, 1 mM fenyyylimetyylisulfonyylifluoridia (PMSF), 2 μ M leupeptiiniä ja 2 μ M pepstaatiini-A:ta (Sigma). 0,5 ml fosfaattipuskurissa (67 mM, pH 7) 4°C:ssa säilytettyjä sirkonium-helmiä (halkaisija 0,5

mm) lisätään, minkä jälkeen solut rikotaan käyttäen seitsemää (7) toisiaan seuraavaa 30 sekunnin jaksoa solurikojassa (Biospec Mini Bead-Beater, Biospec Products), jolloin jaksoja erottavat toisistaan 2 minuutin jäähtymistau'ot jäissä. Näissä olosuhteissa soluhajoamisen tehokkuus on yli 90 % solulaskennan faasikontrastimikroskoopilla mukaan. Sirkonium-helmistä vapaa nestefraktio siirretään Eppendorf-putkeen, minkä jälkeen helmet pestään 3 kertaan 0,2 ml:lla lyysipuskuria ja kerätään sitten samaan Eppendorf-putkeen. Sentrifugoimalla putken sisältöä 15 minuutin ajan 4°C:ssa 12 000 x g:ssä saadaan liukoinen proteiinifraktio (supernatantti) ja ei-liukoinen proteiinifraktio (pelletti). Nämä kaksi fraktiota erotetaan ja lietetään sitten samaksi lopputilavuudeksi näytepuskuriliuoksella laimentamalla. Näitä näytteitä kuumennetaan 15 minuutin ajan 95°C:ssa, minkä jälkeen ne sijoitetaan kerrokseksi 8,5-%:iselle SDS-polyakryyliamidigeelipinnalle, jolloin niitä edeltää 5-%:inen pakkausgeeli (Laemli, U.K., Nature 227 (1970) 680-685), ja ajetaan elektroforeesiajo 20 25 mA:n virtaa käyttäen, kunnes bromifenolisininen on kulkenut geelin päähän asti.

Kuviossa 29 on esitetty tyypillisestä kokeesta saatu tulos, josta voidaan arvioida albumiinin ilmaisu ja erityys, joihin on päästy plasmidilla pYG19 (prepro-HSA), pYG23 (Met-HSA) tai pYG25 (vailla ilmaisukasettia oleva vektori) transformoidulla K. lactis -kannalla MW98-8C, kun soluja on kasvatettu 50 ml:ssa vailla G418:aa olevaa YPD-kasvualustaa 28°C:ssa 68 tunnin ajan. Kukin näyte vastaa 100 µl alkuperäistä viljelmää, jolloin liukoisia fraktioita, ei-liukoisia fraktioita ja viljelmäsupernatantteja voidaan verrata niiden migroitumisen 8,5-%:isessä polyakryyliamidigeelissä ja Coomassie-sinivärjäyksen jälkeen. Plasmidilla pYG19 tai pYG23 transformoiduista soluista peräisin olevissa näytteissä voidaan todeta kaupallisesti 35 saatavana olevan, molekyylipainomallina käytetyn humaani-

albumiinin (Sigma) kanssa ko-migroituva proteiininauha, jolloin tätä nauhaa ei ole todettavissa soluista, jotka sisältävät vailla HSA-geeniä olevan vektorin pYG25. Huomattakoon, että pYG19:ää (prepro-HSA) käyttämällä ilmaistu albumiini kulkeutuu käytännöllisesti katsoen kokonaisuudessaan viljelmäsupernatanttiin, kun sitä vastoin plasmidia pYG23 (Met-HSA) käyttämällä muodostunut albumiini on kokonaisuudessaan ei-liukoisessa sytoplasmaproteiinifraktiossa. Lisäksi kuviossa 29 esitetyistä tuloksista ilmenee, että plasmidin pYG19 sisältämien solujen erittämä albumiini on ainoa merkitsevässä määrin läsnäoleva solunulkoisen proteiini. Plasmidilla pYG19 transformoidun ja sitten sopivissa olosuhteissa (vrt. kohta E.4.6.) ravitelukulviviljelmänä kasvatetun kannan MW98-8C viljelmäsupernatantissa albumiinin pitoisuus voi olla jopa 150 mg HSA:ta/litra.

E.4.4. K. lactiksen tuottaman albumiinin toteaminen immunologisin keinoin

Albumiinistandardin kanssa ko-migroituvien hiiva-proteiinien identiteettiä voidaan tutkia immunologisin keinoin. Tässä tarkoituksessa polyakryyliamidigeeli siirretään siirtokopiona nitroselluloosasuodattimelle (Schleicher & Schuell, 0,45 μ m) käyttäen puolikuiva blot-siirtolaitteistoa (Biometra) ja siirtopuskuria, joka sisältää 25 mM Tris-emästä, 150 mM glysiiniä ja 10 % metanolia. Blot-siirtoaika on 30 minuuttia ja käytetty virta noin 0,85 mA/cm² geelipintaa. Blot-siirron jälkeen suodatinta inkuboidaan kolmeen kertaan 5 minuutin ajan 50 ml:ssa puskuria A (5 % rasvatonta maitojauhetta, 0,2 % Tween 20-valmistetta PBS-puskurissa [137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄]), minkä jälkeen inkuboidaan 30 minuuttia 40 ml:ssa puskuria A, joka sisältää HSA:n vastaisia kaniinin polyklonaalisia vasta-aineita laimennettuina 1:1000. Suodatin huuhdotaan kolmeen kertaan puskurilla A, minkä jälkeen lisätään toinen, biotinyloitu, kaniinivasta-aineet

tunnistava vasta-aine (Vectastain ABC Immuno Peroxidase Kit, Vector Laboratories) määränä yksi pisara/50 ml puskuria. Suodatinta inkuboidaan 30 minuuttia, minkä jälkeen se huuhdotaan kolmeen kertaan puskurilla B (0,2 % Tween 20 -valmistetta PBS:ssä) ja inkuboidaan sitten avidiini DH/biotinyloitu peroksidaasi H -kompleksin läsnäollessa. Avidiini/biotinyloitu peroksidaasi -kompleksi valmistetaan juuri ennen käyttöä laimentamalla 1 pisara kumpaakin pakauksen käsittämää reagenssia A ja B 5 ml:aan puskuria B 30 minuutin pituisen inkuboinnin 23°C:ssa jälkeen. Suodatinta inkuboidaan kompleksin 1:10 laimennoksessa puskurissa B (50 ml kaikkiaan) 30 minuutin ajan. Suodatin huuhdotaan toistamiseen puskurilla B kolmeen kertaan 5 minuuttia kulloinkin, minkä jälkeen sitä kehitetään 2-3 minuutin ajan liuoksella, joka käsittää 10 ml liuosta, jossa on 0,02 % vetyperoksidia, ja 10 ml liuosta, jossa on 1 mg/ml diaminobentsidiiniä ja 0,4 mg/NiCl₂ 0,1 M Tris-HCl-puskurissa, pH 7,4. Kuvioista 30 ilmenee, että *K. lactis* MW98-8C ilmaisee (pYG23) ja erittää (pYG19) HSA-vastaisten polyklonaalisten vasta-aineiden tunnistamaa proteiinia. Tämän antigeenimateriaalin esiintyminen liittyy spesifisesti albumiinin ilmaisevan kasetin läsnäoloon, koska sitä ei todeta solu-uutteista tai viljelmäsupernatanteista, jotka ovat peräisin vailla ilmaisukasettia olevalla vektorilla transformoiduista hiivoista.

E.4.5. HSA-erityksen kinetiikka

Kuten esitetään kuviossa 31A, erlenmeyerkolvissa albumiinin erityys tapahtuu verraten hitaan kinetiikan mukaan. Erityksen maksimitasot ilmeisesti saavutetaan 70-100 tunnin inkuboinnin jälkeen, kun kyseessä on viljelmä, johon alunperin on siirrostettu 10⁵ solua/ml (kuvio 31B). Merkittävää lisäystä tai alennusta ei ole todettavissa viljelmän kasvatusaikana 100 - 240 tuntia, mikä viittaa siihen, että HSA:n stabiilisuus on hyvä näissä kasvatus- ja lämpötilaolosuhteissa. Koska tänä aikana ei keräänn

proteolyyttisesti hajonnutta materiaalia, voidaan päätellä, että läsnä ei ole solunulkoista proteaasia, joka mahdollisesti pilkkoisi erittynyttä albumiinia.

Kuviossa 32 esitetään erityyskinetiikka graafisesti (A) sekä plasmidilla pYG19 transformoidun kannan MW98-8C kasvukäyrä (B); nämä tulokset osoittavat, että albumiinin erityys jatkuu sen jälkeen, kun solut ovat saavuttaneet kasvun stationäärivaiheen. Tämä havainto on sopusoinnussa aiemmin muiden hiivailmaisujärjestelmien yhteydessä suoritettuihin havaintoihin nähden (Tschopp, J.F., et.al., Bio/Technology 5 (1987) 1305-1308).

E.4.6. HSA-erityksen tehokkuus plasmidien pYG44, pYG51, pYG404 ja pYG58 yhteydessä

HSA:n eritystehokkuutta tutkittiin S. cerevisiae PGK-promoottorin (plasmidi pYG19; kuviot 29 - 32), optimoidun ATG-yhteyden omaavan PGK/LAC4-hybridipromoottorin (plasmidit pYG44-5 ja pYG44-7; kuvio 33), S. cerevisiae PHO5-promoottorin (plasmidi pYG51; kuvio 34 A) ja K. lactis LAC4-promoottorin (plasmidi pYG404; kuvio 35) säätelyn alaisena. Lisäksi K. lactis tappajatoksiinin erityssignaalisekvenssi (pre-alue) fuusioitiin lukualueella pro-HSA-rakennegeeniin (plasmidi pYG58; kuvio 34 B) ja verrattiin fuusioproteiinin eritystehokkuutta luontaisen prepro-HSA:n eritystehokkuuteen (plasmidirakenteiden yksityiskohdat, katso osa 3). Näille rakenteille saadut tulokset voidaan esittää yhteenvetona seuraavasti:

Plasmidissa pYG44 läsnäolevasta PGK/LAC4-hybridipromoottorista ilmaistun ja kasvualustaan erittyneen HSA:n pitoisuustaso kohoaa 2 - 3 -kertaisesti, jos soluja viljellään glukoosipitoisessa kasvualustassa, johon lisätään laktoosia logaritmisien kasvuvaiheen puolivälin ja varhaisen stationäärikasvuvaiheen välillä (kuvio 33). Tätä ilmiötä ei todeta, jos laktoosin asemesta lisätään vastaava määrä glukoosia (tuloksia ei esitetty). Jos soluja viljellään kasvualustassa, joka sisältää laktoosia ainoana hii-

lilähteenä, erittyneet HSA-tasot eivät ole korkeampia kuin tasot, joihin päästään glukoosia sisältävässä kasvualustassa (kuvio 33 B). HSA-erityksen laktoosivälitteinen lisäys, joka todetaan "indusoidaessa" soluja glukoosipitoisessa kasvualustassa tapahtuneen alkukasvatuksen jälkeen, ei kuitenkaan ole riippuvainen K. lactis LAC4-promoottorin UAS-osan läsnäolosta. Tämä laktoosivälitteinen lisäys todetaan vastaavasti, jos HSA-eritystä ohjaa PGK-promoottori (kuvio 33 A, B kannan MW98-8C -transformanteille; kuvio 35 CBS2359-transformanteille) tai S. cerevisiae PHO5-promoottori (tuloksia ei esitetty).

HSA-erityksen tapahtuessa K. lactis LAC4-promoottorin säätelyn alaisena päästään alhaisempiin HSA-tasoihin kuin S. cerevisiae PGK-promoottorilla (kuvio 35). Toisaalta HSA:n LAC4-ohjattu ilmaisu on tiukasti säädeltyä: erittynyttä HSA:ta ei kyetty toteamaan CBS2359-transformanttien viljelmäsupernatanteista, jos glukoosi oli ainoa käytettävissä oleva hiililähde (kuvio 35).

Yllättävästi kasvatettaessa soluja täydellisessä kasvualustassa (YPD) PHO5-ohjatun HSA-erityksen tehokkuus on vain vähän alle tason, joka todetaan glykolyyttisen PGK-promoottorin sisältävillä rakenteilla (kuvio 34 A).

HSA-erityssignaalin korvaaminen K. lactis tappajatoksiinin pre-alueella ei vaikuta HSA-erityksen sen paremmin kinetiikkaan kuin tehokkuuteenkaan (kuvio 34).

E.4.7. HSA:n eritystehokkuus integroitujen ilmaiskasettien yhteydessä

Plasmidissa pYG19 esiintyvä PGK-prepro-HSA-ilmaiskasetti integroitiin K. lactiksen kromosomi-DNA:han käyttäen yhden vaiheen geenirikkomismenetelmää, jota ovat kuvanneet Rothstein, R.J. (Methods in Enzymol. 101 (1983) 202-211; kokeellisten yksityiskohtien osalta katso kohta E.3.7.). Kuten esitetty kuviossa 36, integranttikantojen (vyöhykkeet 2 - 7) kasvualustaan erittämät HSA-tasot ovat ainakin 20 kertaa alhaisemmat kuin tasot, joihin päästään

käyttämällä pKD1-johdannaista pYG19 (vyöhyke 1). HSA-eritys oli pääpiirteissään sama riippumatta siitä, tapahtuiko ilmaisukasetin integroituminen K. lactis -genomin RAG2-keskukseen vai K. lactis -genomissa toisaalle (kuvio 36).

5 Lisäksi ilmaisukasetin suuntautumisella URA3-valikointimerkkiin nähden ei ollut merkittävää vaikutusta HSA:n eritystasoihin (kuvio 36, vyöhykkeet 2 ja 3). Erittyneen HSA:n määrän todettiin kuitenkin kasvaneen kaksinkertaiseksi sellaisilla transformanteilla, joissa genomiin oli integroitunut kaksi ilmaisukasettia (kuvio 36, vyöhyke 5).

10 Yhteenvetona, HSA:n eritystehokkuus vaikuttaa olevan suorassa yhteydessä transformoidun hiivasolun käsittämään rakennegeenikopiolukuun.

E.4.8. HSA:n erityys Kluyveromyces-suvun eri lajeissa ja kannoissa

15

Plasmideilla pYG19, pYG221B ja pKan707 transformoitiin seuraavia Kluyveromyces-kantoja: ATCC16045 (K. marxianus var. bulgaricus), ATCC24178 (K. wickerhamii), ATCC12424 (K. marxianus var. marxianus), ATCC56500 (K. waltii), ATCC36906 (K. marxianus var. drosophilarum), CBS4574 (K. marxianus var. lactis), CBS683 (K. marxianus var. lactis) ja MW98-8C (K. marxianus var. lactis). Kaikilla tutkituilla transformanteilla saatiin todettavia HSA-eritystasoja, vaikkakin eri kantojen välillä todettiin huomattavaa vaihtelua. Korkeimmat tasot todettiin käytettäessä kannan MW98-8C transformantteja (CBS579.88) ja kannan CBS683 transformantteja, jolloin alhaisin taso todettiin käytettäessä kantaa ATCC16045, jolla ei-hajonnutta HSA:ta kyettiin toteamaan vain immunologisia menetelmiä käyttäen (tuloksia ei esitetty).

20

Plasmidit pYG19 ja pYG221B välittivät verrattavia erittyneen HSA:n tasoja kaikissa tutkituissa kannoissa.

25

30

Esimerkki 5: Kasvualustaan erittyneen HSA:n puhdistaminen

35 Tyypillisessä puhdistuskokeessa plasmidilla pYG19 transformoitua kantaa MW98-8C kasvatetaan YPD-kasvualus-

tassa 72 tunnin ajan jo edellä kuvatuissa vakio-olosuhteissa. Viljelmäsupernatantti-erästä (0,5 litraa) poistetaan kaikki kontaminoiva soluaines sentrifugoimalla, minkä jälkeen sitä inkuboidaan 4°C:ssa 15 minuutin ajan 60 %:n etanolia läsnäollessa (v/v). Sakka otetaan talteen sentrifugoimalla ja uudelleenliuotetaan 10 ml:aan liuosta, joka käsittää pitoisuuden 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, minkä jälkeen liuos panostetaan Trisacryl blue -kolonniin (I.B.F., Ranska). Humaanialbumiini eluoidaan tästä kolonnista käyttämällä 3 M natriumkloridiliuosta. HSA:ta sisältäviä fraktioita dialysoidaan 50 mM Tris-HCl-liuosta vastaan, minkä jälkeen näitä fraktioita puhdistetaan Mono Q -kolonnissa (Pharmacia), josta ne eluoidaan natriumkloridipitoisuudessa 0,25 M. Suorittamalla viimeisenä vaiheena kromatografia-ajo Superose 12 -kolonnissa (Pharmacia) saadaan HSA yli 99 %:n puhtausasteen omaavana SDS-polyakryyliamidigeeli-hopeävärjäyksestä päätellen.

Esimerkki 6: Erittynneen ja puhdistetun albumiinin karakterisointi

Ei ole käytettävissä koetta, jolla albumiinin biologisia ominaisuuksia voitaisiin mitata in vitro, joten ei ole helppoa keinoa rekombinantti-albumiinin laadun arvioimiseksi. Tämän vuoksi puhdistuksen jälkeen K. lactiksen erittämää albumiinia karakterisoidaan useiden fysiko-kemiallisten ja immunologisten kokeiden avulla. Nämä kokeet osoittavat, että K. lactiksen erittämä rekombinantti-albumiini on kypsässä muodossa ja natiivissa konfiguraatiossaan: se ei ole erotettavissa plasmasta uutetusta humaniseruumialbumiinista minkään käytetyn kriteerin nojalla.

E.6.1. SDS-PAGE: Coomassie-sini- ja hopeävärjäys

Elektroforeesi suoritetaan SDS-polyakryyliamidigeelissä (7,5 %) (kuvio 38 C) kuten edellä kuvattu, tai käyttäen "Phast gel" -järjestelmää (Pharmacia, kuvio 38 A). Vaihtelevia määriä rekombinantti-albumiinia verrattiin kaupallisesti saatavana olevaan standardialbumiinivalmis-

teeseen (Sigma), joka on uutettu humaaniplasmasta. Geelin värjääminen Coomassie-sinisellä (kuvio 38 C) tai hopeasuoloilla (kuvio 38 A) osoittaa hiivaperäisten albumiininäytteiden olevan täysin homogeenisia.

5 E.6.2. Isoelektrinen fokusointi

Isoelektrinen fokusointi suoritettiin pH-arvoissa 4,5 - 6,0 (Phast gel, Pharmacia, kuvio 38 B) ja pH-arvoissa 4,0 - 7,0 (Immobiline, LKB). Rekombinantti-HSA:n isoelektrinen piste on sama kuin mallihumaani-HSA:n (pI = 10 4,8).

E.6.3. Natiivi-PAGE ja blot -immuunimääritys

Suoritettaessa rekombinantti-HSA:n elektroforeesi ei-denaturoivassa polyakryyliamidigeelissä (10 %), ja sen jälkeen blot-siirtämällä tulos nitroselluloosasuodattimelle ja toteamalla tuotteet immunologisesti kohdassa E.4.4. kuvatus mukaisissa olosuhteissa sen todetaan ko-migroituvan humaaniplasmasta uutetun standardialbumiinin kanssa. Tämä viittaa hyvin voimakkaasti siihen, että K. lactis eritysprosessissa tapahtuu rekombinantti-prepro-HSA:n oikeaoppinen kypsyminen. Todettavissa ei ole kontaminoitumista ei-kypsällä HSA:lla, mikä viittaa siihen, että HSA:n signaali- ja pro-sekvenssit lohkeavat tehokkaasti tässä hiivassa.

E.6.4. Molekyylliseulakromatografia

25 Molekyylliseulakromatografia-ajo suoritetaan käyttäen Superose 12 -valmistetta (Pharmacia). Eluointipuskurin (50 mM Tris-HCl, pH 8,0) virtausnopeus pidetään luke-
massa 1 ml/min. Rekombinantti-albumiinin ja mallialbumiinin pitoisuudet ovat vastaavasti 0,4 ja 1 mg/ml. Albumiinin eluoituminen todetaan mittaamalla absorbanssi 280 nm:n
30 aallonpituudella. Kummassakin tapauksessa eluutiotilavuus on sama (11,5 ml).

E.6.5. Anioninvaihtokromatografia

35 Rekombinantti-albumiini, kuten myös humaaniplasmasta peräisin oleva mallialbumiini, eluoidaan Mono Q HR 5/5-kolonnista (Pharmacia) pitoisuudessa 0,31 M natriumklori-

dia. Kuviossa 39 esitetään kromatogrammit, jotka saatiin injisoitaessa 100 µl rekombinantti-HSA:ta (0,4 mg/ml) ja malli-HSA:ta (0,5 mg/ml); tällöin käytettiin liuoksella 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, tasapainoitettua kolonnia ja vakio-
5 virtausnopeutta 1 ml/min.

E.6.6. Käänteisfaasikromatografia

Hiiva-albumiinin käyttäytymistä käänteisfaasissa analysoidaan Nucleosil (C4) -kolonnissa käyttäen puskureita A (vesi, joka sisältää 0,1 % trifluorietikkahappoa, TFA:ta) ja B (asetonitriili, joka sisältää 0,1 % TFA:ta).
10 Hiiva-albumiinin eluutio gradienttia 20 % → 80 % B/A käyttäen on esitetty kuviossa 40, jolloin hiiva-albumiinin retentioaika on sama kuin mallialbumiinin.

E.6.7. Aminohappokoostumus

Rekombinantti-HSA:n aminohappokoostumus määritetään käänteisfaasikromatografisesti happohydrolyysin (6 N HCl) ja fenyyli-isotiosyanyylijohtannaisen muodostuksen jälkeen. Tällä menetelmällä saadut tulokset osoittavat selvästi, että rekombinantti-HSA:n koostumus on sama kuin
20 humaaniplasmasta saadun mallialbumiinin.

E.6.8. N-päätysekvenssi

Käyttämällä Edman hajoamisen mittaamiseksi automaattista laitteistoa (Applied Biosystems) todettiin, että K. lactiksen erittämän HSA:n N-päätysekvenssi on Asp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly. Tämän
25 sekvenssin määrittäminen varmentaa natiivipolyakryyliamidigeelielektroforeesikokeissa saadut tulokset, ja osoittaa, että K. lactis -hiivan erittämä albumiini on oikealla tavalla ja täydellisesti kypsytetty.

E.6.9. Tryptofaanin fluoresenssi

295 nm:n aallonpituudella herätetyn yksittäisenä läsnäolevan tryptofaanin emittoima fluoresenssi omaa saman profiilin rekombinantti- tai plasma-albumiinin kyseessä ollen (maksimi 337 nm:n kohdalla), mikä osoittaa tämän
35 aminohapon hydrofobisten ympäristöjen vastaavan toisiaan näissä tapauksissa (kuvio 41).

E.6.10.

Mallialbumiinin (Sigma) ja hiivan erittämän albumiinin stabiilisuuskinetiikka 75°C:ssa on samanlainen (kuvio 42), mikä viittaa siihen, että proteiininirakennetta
 5 stabiloivat sidokset (hybrofobiset vuorovaikutukset ja disulfidisillat) ovat näissä tapauksissa identtiset.

E.6.11. Reaktiivisuus monoklonaalisten vasta-aineiden suhteen

Rekombinantti-albumiinin antigeenisyyttä tutkittiin
 10 käyttäen erilaisia, humaanialbumiinivastaisia monoklonaalisia vasta-aineita. Kuvioista 43 ilmenevät niiden spesifisyydet: vasta-aineet HA10, HA11 ja HA13 vastaavat epitooppeja, joiden säilyminen edellyttää koko molekyylin koossa pysymistä. Vasta-aineet HA21, HA6, HA4, HA3, HA8 ja HA1
 15 vastaavat epitooppeja, jotka sijaitsevat peptidiketjun varrella N-päädystä C-päättyyn (Doyen, N., et.al., Mol.Immun. 22 (1985) 1-10; Lapresle, C., Anal.Biochem. 174 (1988) 308-312).

Kokeena käytettiin ELISA-inhibitiokoetta. Eri vasta-aineita imeytettiin polystyreenimaljapintoihin ja kullekin vasta-aineelle muodostettiin alkalisella fosfataasilla leimatun albumiinin sitoutumiskäyrä. Kunkin vasta-aineen kyllästyskäyrä on ulkonäöltään sigmoidinen ja leimatun albumiinin määrä, joka vastaa 50 %:n sitoutumista,
 20 valittiin kunkin vasta-aineen inhiboitumisen tutkimiseksi.

Rekombinantti-albumiininäytteellä suoritettua inhibitiokokeen tulosta verrattiin plasma-albumiininäytteellä (Sigma) saatuun tulokseen. Kuvioista 44 ilmenee, että rekombinantti-albumiini inhiboi kutakin tutkittua yhdeksää
 30 vasta-ainetta yhtä suurella määrällä kuin natiivialbumiini. Ottaen huomioon tämän kokeen erittäin suuri herkkyys havaituilla eroavaisuuksilla ei todennäköisesti ole merkitystä.

Esimerkki 7: Hiivailmaisuvektorit, jotka sisältävät kasetin interleukiini-1 β :n erittämiseksi

E.7.1. IL-1 β -rakennegeenin synteesi

IL-1 β :tä vastaavan rakennegeenin kemiallista synteesiä on jo kuvattu (Jung, G., et.al., Ann.Inst.Pasteur/-Microbiol. 139 (1988) 129-146): lyhyesti, rakennegeeni koottiin 14 synteettisestä oligodeoksinukleotidista NdeI-HindIII-restriktiofragmenttina. Auronin et.al. (Proc.-Natl.Acad.Sci. 81 (1984) 7907-7911) julkistamaan sekvenssiin verrattuna nyt kyseessä olevassa esimerkissä käytetty synteettinen geeni sisältää seuraavat modifikaatiot: i) AGC-kodoni (Ser) asemassa 483 on vaihdettu TCC-kodoniksi HindIII-keskuksen eliminoimiseksi; ii) T asemassa 506 on korvattu C:llä NdeI-keskuksen eliminoimiseksi; iii) on muodostettu EcoRI-keskus, jota seuraa NdeI-keskus asemassa 435 (GAATTCATATG), mukaanlukien translaation aloittava metioniini; iv) sekvenssi AAGCTT on lisätty asemaan 896 HindIII-keskuksen sijoittamiseksi välittömästi alavirtaan translaation päätöskodonista.

Rekombinantti-IL-1 β :tä koodaava rakennegeeni on täten käytettävissä EcoRI-HindIII-restriktiofragmenttina, joka sisältyy pCI131:ksi nimettyyn plasmidi pUC19 -johdannaiseen.

E.7.2. Eritysvektorin rakentaminen, joka sisältää IL-1 β :n S. cerevisiae PGK-promoottorin ja K. lactis tappajatoksiinin erityssignaalin säätelyn alaisena

K. lactis tappajaplasmidin K1 toksiinigeenin (Stark, M.J.R., ja Boyd, A., EMBO J. 5 (1986) 1955-2002) erityssignaalia ("pre"-alue) vastaava DNA-fragmentti koottiin seuraavista kahdesta synteettisestä oligodeoksinukleotidista:

SqA : 5'-AATTATGAATATATTTTACATATTTTGTGTTTCTGCTGCAT-TCGTTCAAGGTAAAAG-3'

SqB : 5'-AATTCTTTTACCTTGAACGAATGACAGCAAAAACAAAAT-ATGTAAAATATATTCAT-3

Nämä kaksi oligodeoksinukleotidia hybridoidiin, jolloin jälleenmuodostui tappajatoksiinin signaalsekvenssi, jota seuraa mahdollista sellaista pilkkoutumiskeskusta edustava dipeptidi LysArg, jonka K. lactis KEX1-geenin

5 tuottama endopeptidaasi tunnistaa (Tanguy-Rougeau, C., et.al., FEBS Letters 234 (1988) 464-470). Tätä sekvenssiä sivuavat kooheesiopäädyt, jotka sopivat EcoRI-keskuksen vastaaviin pätyihin. Tässä rakenteessa vain signaalsekvenssistä alavirtaan sijaitseva päty voi uudelleenmuodostaa funktionaalisen EcoRI-keskuksen. Tämä DNA-fragmentti

10 kloonattiin halutun mukaisesti suuntautuneena plasmidin pEPGK41 yksittäiseen EcoRI-keskukseen, jolloin saatiin plasmidi pSPGK1 (kuvio 45). pEPGK41 sisältää S. cerevisiae PGK-geenin promoottorin ja päättäjän sisältävän SalI-BamHI-kasetin, joka on identtinen plasmidin pYG12 (kuvattiin

15 aiemmin esimerkissä 3) sisältämään nähden lukuunottamatta HindIII-kloonauskeskusta, joka on korvattu EcoRI-keskuksellä (katso kuviossa 45 esitetty sekvenssi). Käytetyn strategian seurauksena plasmidi pSPGK1 käsittää yksittäisen EcoRI-keskuksen, joka mahdollistaa rakennegeenien

20 kloonaamisen synteettisestä signaalsekvenssistä alavirtaan.

IL-1 β :tä koodaavan rakennegeenin saamiseksi EcoRI-restriktiofragmenttina plasmidi pCI131 (katso kohta E.7.-

25 1.) linearisoitiin entsyymiä HindIII käyttäen, minkä jälkeen sitä käsiteltiin E. coli DNA-polymeraasi-I:n Klenow-fragmentilla tylppien pätyjen saamiseksi ja ligatoitiin sitten synteettiseen EcoRI-liittäjään (5'-GGAATTCC-3'). Pilkkomisen entsyymillä EcoRI jälkeen Met-IL-1 β :tä vastaava fragmentti puhdistettiin elektroeluutiota käyttämällä

30 ja kloonattiin plasmidin pSPGK1 EcoRI-keskukseen, jolloin saatiin plasmidi pSPGK-IL7 (kuvio 46). Tässä rakenteessa IL-1 β :tä koodaava sekvenssi sijaitsee translaatioalueella tappajatoksiininista peräisin olevan erityssignaalin kanssa.

35 Kypsän IL-1 β -geenin alkua (AlaProVal...) erottaa signaali-

peptidaasin tunnistamasta pilkkoutumiskeskuksesta (GlnGly) pentapeptidi LysArgIleHisMet.

Plasmidia pSPGK-IL17 käytetään lähteenä SalI-Hin-
dIII-restriktiofragmentille, joka vastaa ilmaisukasettia
 5 (PGK-promoottori/erityssignaali-IL-1 β /PGK-päättäjä); tämä
 fragmentti puhdistettiin elektroeluutiota käyttämällä ja
 kloonattiin sitten plasmidiin pCXJ1 (vrt. kuvio 9), jota
 oli pilkottu samoilla entsyymeillä, plasmidin pSPGK-IL21
 saamiseksi (kuvio 47). Plasmidia pUC4K (Pharmacia) käyte-
 10 tään lähteenä genetisiini- (G418-) resistenssigeenille,
 joka puhdistettiin elektroeluutiota käyttämällä SalI-res-
 triktiofragmenttina. Tämä fragmentti kloonattiin sitten
 plasmidin pSPGK-IL21 SalI-keskukseen, jolloin saatiin il-
 maisuplasmidi pSPGK-IL31 (kuvio 48).

15 E.7.3. Eritysvektorin rakentaminen, joka sisältää
 IL-1 β :n S. cerevisiae PH05-promoottorin säätelyn alaisena
 PH05-promoottorin merkitys perustuu siihen, että
 se on ilmaisujärjestelmä, joka voidaan indusoida K. lac-
tiksessa: kuten S. cerevisiae'ssä tämä promoottori tulee
 20 repressoiduksi ympäristössä, jossa epäorgaanisen fosfaatin
 pitoisuus on korkea, mutta indusoituu ympäristössä, joka
 ei sisällä fosfaattia (Chen, X.J., ja Fukuhara, H., Gene
369 (1988) 181-192).

Isäntäplasmidi pEPHO sisältää BamHI-PstI-restrik-
 25 tiofragmentin, jonka koko on 0,94 kbp:tä ja joka koostuu
S. cerevisiae PH05-geenin promoottori- ja päätösalueista.
 Tämä fragmentti saadaan 2,03 kbp:n BamHI-PstI-genomifrag-
 mentista (Bajwa, W., et.al., Nucl.Acids Res. 12 (1984)
 7721-7739), josta hapanta fosfataasia koodaava rakennegee-
 30 ni on deletoitu aseman -4 (translaation aloituskodoniin
 ATG nähden) ja translaation päätöskodonista TAG ylävirtaan
 sijaitsevan yksittäisen Sau3A-keskuksen välistä. Promoot-
 torin ja sen päättäjän väliseen liitoskohtaan on insertoi-
 tu EcoRI/SmaI/BamHI-polyliittäjä, mikä mahdollistaa raken-
 35 negeenin insertoinnin translaation aloituskodoneineen.

K. lactis tappajaplasmidin K1 toksiinigeenin (katso kohta E.7.2.) eristyssignaalia vastaava EcoRI-fragmentti kloonattiin halutun mukaisesti suuntautuneena plasmidin pEPHO EcoRI-keskukseen, jolloin saatiin plasmidi pSPHO4 (kuvio 49). Met-IL-1 β :tä vastaava EcoRI-restriktiofragmentti puhdistettiin plasmidista pSPGK-IL17 (kuvio 46) ja kloonattiin plasmidin pSPHO4 EcoRI-keskukseen, jolloin saatiin plasmidi pSPHO-IL14 (kuvio 50). Tätä plasmidia käytetään lähteenä SalI-HindIII-restriktiofragmentille, joka vastaa ilmaisukasettia (PHO5-promoottori/erityssignaali-IL-1 β /PHO5-päättäjä); tämä fragmentti puhdistettiin elektroeluutiota käyttämällä ja kloonattiin samoilla entsyymeillä leikattuun plasmidiin pCXJ1, jolloin saatiin plasmidi pSPHO-IL23 (kuvio 51). Genetisiini- (G418-) resistenssigeenin sisältävä SalI-restriktiofragmentti puhdistettiin elektroeluutiota käyttämällä plasmidista pUC4K ja kloonattiin sitten plasmidin pSPHO-IL23 SalI-keskukseen, jolloin saatiin ilmaisuplasmidi pSPHO-IL35 (kuvio 52).

E.7.4. IL-1 β :n ilmaisevien pKD1-peräisten plasmidien mitoottinen stabiilisuus ei-selektiivisissä kasvatusolosuhteissa

Plasmidien pSPGK-IL31 ja pSPHO-IL35 mitoottista stabiilisuutta seurattiin vaihtelevan pituisten aikajaksojen kuluttua, ja se määriteltiin niiden solujen prosentuaaliseksi osuudeksi, jotka ovat säilyttäneet kyvyn kasvaa selektiivisessä minimivaatimuskasvualustassa (jota ei ole täydennetty urasiililla) määrätyn lukumäärän solupolvia käsittävän kasvatuksen ei-selektiivisessä kasvualustassa jälkeen. Kuten esitetty kuviossa 53, nämä kaksi plasmidia ovat huomattavan stabiileja, vaikkakin stabiilisuus ei PGK-promoottoria käyttävillä rakenteilla ole sama kuin PHO5-promoottorin sisältävillä rakenteilla: 40 solupolven jälkeen ei-selektiivisessä kasvualustassa 75 % (promoottori indusoituu) - 93 % (promoottori ei indusoidu)

soluista on säilyttänyt plasmidin pSPHO-IL35, kun taas plasmidi pSPGK-IL31 on tallella vain 44 %:ssa soluista. Nämä tulokset osoittavat indusoitavan ilmaisujärjestelmän tärkeän merkityksen plasmidista pKD1 saatujen ilmaisuvektorien teollisen hyödyntämisen kannalta sen erottaessa toisistaan hiivaviljelmän kasvufaasin ja faasin, jossa muodostuu mahdollisesti myrkyllistä heterologista proteiinia.

E.7.5. IL-1 β :n erityys

10 Rakenteet pSPGK-IL31 ja pSPHO-IL35 siirrettiin K. lactis -kantaan MW98-8C aiemmin kuvattujen menettelytekniikoiden mukaan. Transformantit valikoitiin urasiilia vailla olevassa minimivaatimuskasvualustassa, minkä jälkeen muutama kloonit siirrostettiin 200 μ g/ml G418:aa sisältävään YPD-kasvualustaan, ja tutkittiin niiden kykyä erittää IL-1 β :tä.

20 Viljelmäsupernatantista otettuja näytteitä käsiteltiin etanolilla (60 minuuttia -20°C:ssa, loppupitoisuus 60 %) erittyneen IL-1 β :n saostamiseksi. Saostunut materiaali otettiin talteen sentrifugoimalla (20 minuuttia, 15 000 x g) ja uudelleenliuotettiin näytekupskuriin (Laemli, U.K., Nature 227 (1970) 680-685) kuumentamalla 95°C:-sen 15 minuutiksi 1/10:ssa alkuperäisestä tilavuudesta, minkä jälkeen näytteet asetettiin 12,5-%:iselle polyakryyliamidigeelille. Näytteiden elektroforeesiäjon jälkeen IL-1 β -eritys todettiin joko denaturoivista geeleistä Coomassie-sinisellä värjäämällä (kuvio 54) tai immunologisesti blot-siirtämällä geeli nitroselluloosakalvoille ja sitten humaani-IL-1 β :n vastaisia polyklonaalisia vasta-aineita (Genzyme) käyttäen, jolloin näytteitä käsiteltiin valinnaisesti edeltäpäin endoglykosidaasi-H:lla valmistajan (Boehringer Mannheim) ohjeiden mukaan.

35 IL-1 β :tä vastaavilla rakenteilla transformoitujen hiivojen viljelmäsupernatanteista saatu immunologinen signaali on herkkä endoglykosidaasi-H-käsittelylle (näennäi-

nen molekyylipaino laskee 24 kD:stä 19 kD:hen), mikä osoittaa hiivan rekombinantti-IL-1 β :n olevan glykosyloitu. Tämä tulos on sopusoinnussa mahdollisen N-glykosylaatio-

keskuksen läsnäoloon IL-1 β :n N-päätyosuudessa (Asn asemassa 7) nähden.

K. lactis -kanta MW98-8C transformoitiin plasmidilla

pSPHO-IL35 ja transformantteja kasvatettiin erlenmeyer-kolvissa, vailla epäorgaanista fosfaattia olevassa kasvu-

alustassa (Chen, X.J., ja Fukuhara, H., Gene 369 (1988) 181-192), minkä jälkeen 2 ml:n näyte-eriä saadusta viljelmäsupernatantista panostettiin sellaisenaan käänteisfaasikolonneihin erittyneen IL-1 β :n puhdistamiseksi: 35 %:n asetonitriilipitoisuutta vastaava eluutiopiikki otettiin tal-

teen, ja se vastaa haluttua rekombinantti-interleukiinia. Tällä tekniikalla puhdistetun materiaalin määrä määritettiin spektrofotometrisesti, ja tämän perusteella voidaan arvioida K. lactisin erittävän IL-1 β :tä pitoisuustasona 35 mg/litra viljelmäsupernatanttia.

Puhdistetun IL-1 β :n N-päätyosuus sekvensoitiin (automaattinen Edman-pilkkominen, Applied Biosystems), ja saatu tulos osoittaa, että tappajatoksiinin "pre"-alue kokonaisuudessaan puuttuu ja siten että K. lactis -kanta MW98-8C on tehokkaasti kypsynyt GlnGly-pilkkoutumiskeskus-

essa, jonka hiivan signaalipeptidaasi tunnistaisi (Stark, M.J.R., ja Boyd, A., EMBO J. 5 (1986) 1955-2002). Seurauksena strategiasta, jota käytettiin plasmidin pSPHO-IL35 sisältämän IL-1 β -ilmaisukasetin rakentamisessa, rekombinantti-IL-1 β :n N-puoleinen pääty ei voi olla identtinen

kypsän humaani-IL-1 β :n N-päätyyn nähden: mikrosekvensoimalla määritetty 11 ensimmäisen jäännöksen järjestys (Lys-ArgIleHisMetAlaProValArgSerLeu) varmistaa, että läsnä on useita ylimääräisiä aminohappoja (LysArgIleHisMet) kypsää humaani-IL-1 β :aa vastaavasta sekvenssistä ylävirtaan, ja

osoittaa erityisesti, että tässä sekvenssiyhteydessä K.

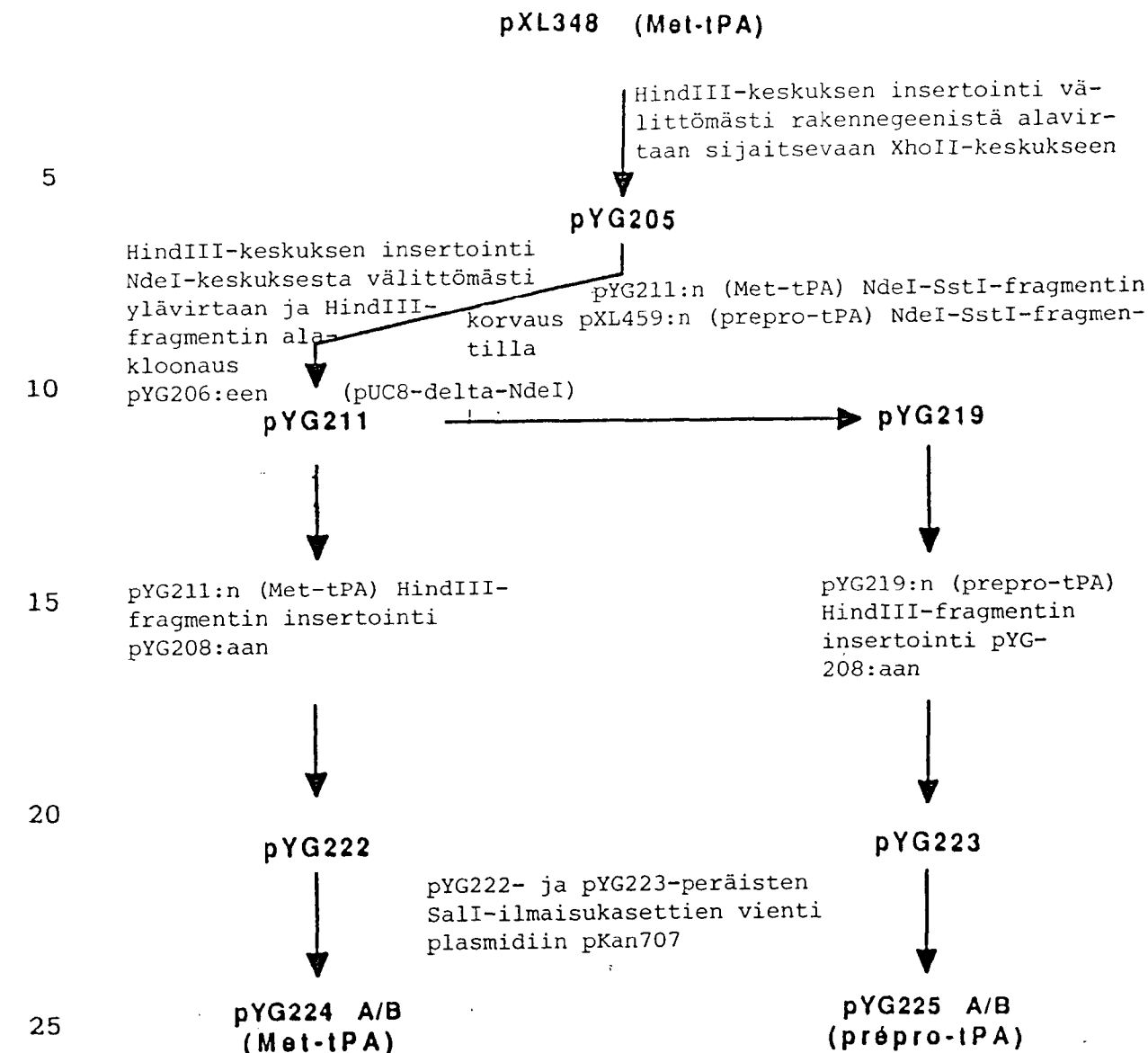
lactis KEX1-entsyymin mahdollinen pilkkomiskeskus (LysArg) ei tule tunnistetuksi. Luomalla paikkaohjautuvan mutatoitin avulla oikeanlainen liitoskohta tappajatoksiinin erityssignaalin ja kypsän IL-1 β :n rakennegeenin välille (Gln-Gly'AlaProVal) on siten ilmeisesti mahdollista saada oikealla tavalla kypsnyttä, erittyvää IL-1 β :aa.

Esimerkki 8: Hiivailmaisuvektoreita, jotka sisältävät kasetin tPA:n ilmaisemiseksi ja erittämiseksi

E.8.1. Vektoreiden rakentaminen Met-tPA:n ilmaisemiseksi ja prepro-tPA:n erittämiseksi S. cerevisiae PGK-promoottorin säätelyn alaisena

tPA:ta koodaava rakennegeeni eristettiin plasmidista pXL348 (Met-tPA) ja pXL459 (prepro-tPA) (Sarmientos, P., et.al., Bio/Technology 7 (1989) 495-501); vastaavat restriktiokartat on esitetty kuviossa 55.

Lähtien plasmidista pXL348 (Met-tPA) saadaan plasmidit pYG224 A/B (Met-tPA) ja pYG225 A/B (prepro-tPA) seuraavan kaavion mukaan:



Plasmidia pXL348 pilkotaan entsyymillä XhoII, ja saatu restriktioseos ligatoidaan fosforyloituun XhoII-HindIII-adaptorisekvenssiin (synteettinen oligodeoksinukleotidi 5'-GATCAAGCTT-3'); sitten seosta pilkotaan entsyymillä HindIII ja Met-tPA:ta koodaava restriktiofragmentti kloonataan vektorin pUC8 HindIII-keskukseen, jolloin saadaan välituoteplasmidi pYG205. Tätä plasmidia leikataan entsyymillä NdeI ja tulos ligatoidaan NdeI-HindIII-NdeI-

30

35

adaptorisekvenssin muodostavien fosforyloitujen, synteettisten oligodeoksinukleotidien 5'-TAAGCTTCA-3' ja 5'-TATGAAGCT-3' ekvimolaariseen seokseen; *in vitro* ligatoinnin jälkeen seosta pilkotaan HindIII:lla ja Met-tPA:ta koodaava restriktiofragmentti puhdistetaan elektroeluutiota käyttäen sekä kloonataan sitten vektorin pYG206 HindIII-keskukseen, jolloin saadaan plasmidi pYG211. Vektori pYG206 vastaa plasmidia pUC8, josta sen yksittäinen NdeI-keskus on tuhottu pilkkomalla entsyymillä NdeI, minkä jälkeen koheesipäädyt on täytetty E. coli polymeraasi-I:n Klenow-fragmentilla ennen vektorin sisäistä ligatointia; plasmidi pYG211 sisältää siten Met-tPA:ta koodaavan HindIII-fragmentin, jossa on yksi yksittäinen NdeI-restriktiokeskus, joka sijaitsee Met-tPA:n ATG-aloituskodonissa.

Plasmidin pYG211 nukleotidisekvenssi translaation aloituskodonista ylävirtaan on seuraava: 5'-AAGCTTCATATG...-3'.

Plasmidia pYG211 käytetään plasmidin pYG219 lähteenä, joka viimeainittu plasmidi sisältää prepro-tPA:ta koodaavan HindIII-fragmentin. Tämä plasmidi rakennettiin korvaamalla pYG211:n NdeI-SstI-fragmentti plasmidin pXL459 NdeI-SstI-fragmentilla, joka sisältää prepro-tPA:n N-päätyosuuden (kuvio 55); plasmidit pYG211 (Met-tPA) ja pYG219 (prepro-tPA) ovat täten tarkalleen isogeenisiä lukuunottamatta sitä eroavuutta, että plasmidissa pYG211 tPA:n kypsän muodon koodisekvenssiä välittömästi edeltää aloituskodoni, kun taas plasmidissa pYG219 kypsän tPA:n sekvenssiä edeltää sen luontainen prepro-kuljetussekvenssi.

Met-tPA:ta ja prepro-tPA:ta koodaavat HindIII-fragmentit puhdistettiin elektroeluution avulla plasmideista pYG211 ja pYG219, minkä jälkeen ne kloonattiin oikealla tavalla suuntautuneina samalla restriktioentsyymillä pilkottuun vektoriin pYG208 (vrt. kuvio 19A), jolloin saatiin välituoteplasmidit pYG222 ja pYG223. Nämä plasmidit sisältävät SalI-restriktiofragmenttina käytettävissä olevan

ilmaisukasetin, joka vektoriin pKan707 kloonamalla saatiin plasmidit pYG224 A/B (Met-tPA) ja pYG225 A/B (prepro-tPA). SallI-kasettien A- ja B-suuntautuminen vektoriin nähdessä määriteltiin kuten edellä plasmidien pYG221 A/B (prepro-HSA) yhteydessä.

E.8.2. tPA:n eritys

Rakenteet pYG224 A/B (Met-tPA) ja pYG225 A/B (prepro-tPA) vietiin erityisesti K. lactis -kantaan MW98-8C kohdassa E.4.1. kuvattuja menettelyitä käyttäen. Solut valikoitiin G418:n läsnä ollessa, minkä jälkeen muutama kloon siirrostettiin selektiiviseen YPD-kasvualustaan, jossa tutkittiin niiden kykyä ilmaista ja erittää tPA:ta seuraavien menettelytekniikoiden mukaan: (i) SDS-polyakryyliamidigeelien värjääminen Coomassie-sinisellä; (ii) immunologinen toteaminen blot-siirtämällä geeli nitroselluloosakalvolle ja käyttämällä sitten humaani-tPA:n vastaisia primäärisiä vasta-aineita (Biopool), mitä valinnaisesti edeltää solufraktioiden käsittely deglykosyloivilla entsyymeillä, endoglykosidaasi-H:lla tai glykopeptidaasi-F:llä, joita käytettiin valmistajan (Boehringer Mannheim) ohjeiden mukaan; (iii) fibriini-maljamääritys seuraavan koostumuksen omaavissa indikaattorimaljoissa: 1 % agarosia, 0,1 % fibrinogeenia (KabiVitrum), 0,2 yksikköä/ml trombiinia (Sigma) liuotettuina PBS-puskuriin.

Näiden kokeiden tulokset osoittavat, että ei-käsitellyistä viljelmäsupernatanteista (rakenne pYG225B) tai solu-uutteista ei ole todettavissa spesifistä immunologista signaalia. Toteamismenetelmää ei voida asettaa kyseenalaiseksi, sillä rakenteet pYG224 A/B (Met-tPA) antavat laajan spesifisen signaalin (1 - 10 mg/litra viljelmää) solu-uutteista ja erityisesti ei-liukoisia proteiineja vastaavasta fraktiosta.

Deglykosyloivien entsyymien käyttö vaikuttaa edellytykseltä K. lactiksen S. cerevisiae PGK-promoottorin säätelyn alaisena ilmaiseman ja erittämän prepro-tPA:n

immunologiselle toteamiselle. Tämä havainto voidaan selittää tämän proteiinin heterogeenisellä hyperglykosylaatiolla ilmaistaessa mainittu kanta mainitun promoottorin säätelyn alaisena. Erityisesti tämä hyperglykosylaatio saattaisi olla syypää PGK-promoottorista ilmaistun hiivarekombinantti-tpA:n heikkoon antigeenisyyteen.

Kuviosta 56 ilmenee, että plasmidilla pYG225B (pre-pro-tpA) transformoidun K. lactis MW98-8C -kannan viljelmäsupernatanteissa esiintyy entsyymiaktiivisuus, joka kuitenkin puuttuu plasmidilla pKan707 (verrokkivektori) tai pYG224B (Met-tpA) transformoidun kannan MW98-8C viljelmäsupernatanteista. Erittynen tPA-aktiivisuuden toteaminen osoittaa täten, että tPA:n prepro-sekvenssi on funktionaalinen K. lactis MW98-8C -hiivassa. tPA-aktiivisuuskoe indikaattorimaljoissa osoittaa niinikään aktiivisuuden esiintymisen rakenteella Met-tpA transformoidun kannan MW98-8C solunsisäisissä fraktioissa (tuloksia ei esitetty).

E.8.3. Isäntäkannan vaikutus tPA-eritykseen

Plasmidi pKan707 -johdannaisia toisintamaan kykenevien hiivojen tPA-eritystasojen kannalta isäntäsolun valinta on keskeinen perustekijä. Suvun Kluyveromyces hiivojen kykyä erittää vektoriin pKan707 kloonattua tPA:ta tutkittiin kuten edellä selvitetty fibrinogeeni-agar-agar-indikaattorimaljoissa. K. lactis -kantojen ATCC 34609 ja ATCC 34610, ATCC 36906 (K. drosophilarum) ja K. fragilis ATCC 36534 ja ATCC 36907 tPA-erityspotentiaali on samaa suuruusluokkaa kuin K. lactis -kannan MW98-8C, kun sitä vastoin kokeissa, jotka suoritettiin samoissa olosuhteissa kannoilla ATCC 12424 (K. fragilis), ATCC 24178 (K. wickerhamii) ja ATCC 56500 (K. waltii), ei kyetty toteamaan tPA-aktiivisuutta viljelmäsupernatanteista.

Esimerkki 9: Hiivailmaisuvektoreita, jotka sisältävät kasetin TIMP:n ilmaisemiseksi ja erittämiseksi

E.9.1. Vektorien rakentaminen TIMP:n ilmaisemiseksi ja erittämiseksi *S. cerevisiae* PGK-promoottorin säätelyn alaisena

Täydellinen TIMP:tä koodaava rakennegeeni eristettiin plasmidista pPV2-TIMP. Tämä vektori koostuu HindIII-restriktiofragmenttina käytettävissä olevasta TIMP-cDNA:sta (Kaczorek, M., et.al., Bio/Technol. 5 (1987) 595-598).
 10 Tämä restriktiofragmentti puhdistettiin elektroeluutiolla ja kloonattiin oikealla tavalla suuntautuneesti rakentamisvälituotteen pYG208 HindIII-keskukseen (vrt. kuvio 19A), jolloin saatiin plasmidi pYG220. Tästä plasmidista saadaan ilmaisukasettia vastaava SalI-fragmentti (PGK-promoottori/TIMP/PGK-päättäjä), joka kloonattiin vektorin
 15 pKan707 SalI-keskukseen (vrt. kuvio 13), jolloin saatiin ilmaisuplasmidit pYG226 A/B, jotka poikkeavat toisistaan vain SalI-fragmentin suuntautumisessa vektoriin nähden. Plasmidien pYG226 A/B A- ja B-suunnat määriteltiin kuten
 20 edellä plasmideille pYG221 A/B (prepro-HSA), pYG224 A/B (Met-tpa) ja pYG225 A/B (prepro-tpa).

E.9.2. TIMP:n erityys

Rakenteet pYG226 A/B (TIMP) siirrettiin K. lactis-kantaan MW98-8C edellä aiemmin kuvattujen menettelytekniikoiden mukaan. Solut valikoitiin G418:n läsnäollessa, min-
 25 kä jälkeen muutama kloonit siirrostettiin selektiiviseen YPD-kasvualustaan ja tutkittiin niiden kykyä ilmaista ja erittää TIMP:tä joko käyttäen Coomassie-sinisellä värjät-
 täviä SDS-polyakryyliamidigeelejä, tai immunologisesti
 30 toteamalla blot-siirtämällä geeli nitroselluloosakalvoille ja käyttämällä sitten humaani-TIMP:n vastaisia primäärisiä vasta-aineita (Rhone-Poulenc Sante), mitä valinnaisesti edeltää solufraktioiden käsittely endoglykosidaasi-H:lla.

TIMP:tä vastaava immunologinen signaali on todet-
 35 tavissa ei-glykosyloiduista solunsisäisistä uutteista (ei-

liukoiset proteiinifraktiot), mutta ei ei-glykosyloiduista viljelmäsupernatanteista (kuvio 57). Tämä immunologinen signaali on herkkä käsittelylle deglykosyloivilla entsyymeillä, mikä osoittaa, että hiivarekombinantti-TIMP on N-glykosyloitu. Rekombinantti-TIMP:n erityys voidaan osoittaa plasmidilla pYG226B transformoidun kannan MW98-8C viljelmäsupernatantista in vitro deglykosylaation jälkeen (kuvio 57), mikä osoittaa, että TIMP:n luontainen kuljetussekvenssi on funktionaalinen K. lactis -kannassa MW98-8C.

10 Huomautus

Näyte kannasta MW98-8C on talletettu talletuslaitokseen Centraalbureau voor Schimmelkulturen (CBS), Baarn, Hollanti, Budapestin sopimuksen sopimusehtojen mukaisesti; se rekisteröitiin 16.09.1988 ja sai hakunumeron CBS 579.-

15 88.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä proteiinin valmistamiseksi, t u n -
n e t t u siitä, että viljellään kasvualustassa suvun
5 Kluyveromyces-hiivaa, joka on transformoitu ilmaisuplasmi-
dilla, joka käsittää:

- plasmidin pKD1 geenit A, B ja C
- plasmidin pKD1 käänteiset toistot
- plasmidin pKD1 stabiilisuuskeskuksen
- 10 - pKD1:n replikaatio alkukohdan ja ilmaisukasetin,
joka sisältää mainitun proteiinin rakennegeenin koodaavan
DNA:n sen ilmaisun mainituissa hiivassa mahdollistavien
sekvenssien säätelyn alaisena,
- transformoidun hiivan valikointimerkin,
- 15 - ja valinnaisesti replikaatioalkukohdan ja vali-
kointimerkin Escherichia colille.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että ilmaisukasetti ja valikointi-
merkki insertoidaan pKD1:n EcoRI-kohtaan.

20 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että ilmaisukasetti ja valikoin-
timerkki insertoidaan pKD1:n SacI- ja MstII-kohtien mää-
rittelemälle 197 nukleotidin alueelle, tai pKD1:n SphI-
kohtaan.

25 4. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen mene-
telmä, t u n n e t t u siitä, että rakennegeenin ilmai-
sun mahdollistavat sekvenssit valitaan suvun Saccharomyces
tai Kluyveromyces hiivojen geeneistä peräisin olevista
promoottoreista.

30 5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että nämä promoottorit saadaan
suvun Saccharomyces tai Kluyveromyces hiivojen glykolyyt-
tisistä geeneistä.

35 6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että rakennegeenin ilmaisun mah-

dollistavat sekvenssit valitaan geeneistä, jotka koodaavat fosfoglyseraattikinaasia (PGK:ta), glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasia (GPD:tä), enolaaseja (ENO), alkoholidehydrogenaaseja (ADH), laktaasia (LAC4:ää) tai hapanta fosfataasia (PHO5:tä).

7. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rakennegeenin ilmaisun mahdollistavat sekvenssit valitaan geeneistä, jotka koodaavat fosfoglyseraattikinaasia (PGK:tä) tai hapanta fosfataasia (PHO5:tä).

8. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiinia koodaavia sekvenssejä edeltää proteiinin kuljetussekvenssi, joka valitaan proteiinin luontaisesta N-päätyjohtosekvenssistä.

9. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiinia koodaavaa sekvenssiä edeltää luontaisesta sekvenssistä poikkeava kuljetussekvenssi.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiinin kuljetuksen koodaava sekvenssi on alfa-feromonin tai tappajatoksiinia koodaavista hiivageeneistä saatu sekvenssi.

11. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiini valitaan seuraavista:

- interleukiinit,
- albumiinit,
- tPA
- TIMP

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiinia koodaava sekvenssi valitaan sekvensseistä, jotka koodaavat seuraavia:

- IL-1 β
- prepro-HSA
- Met-HSA

- prepro-tPA
- Met-tPA ja
- TIMP.

5 13. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiini on HSA ja HSA:n erityksen mahdollistava sekvenssi on albumiinin luontainen prepropäätyjohtosekvenssi.

10 14. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että transformoitujen hiivojen valikointimerkit valitaan vastustuskyvyn antibiooteille tai kupari-ioneille tuottavista geeneistä.

15 15. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valikointisekvenssi on vastustuskyvyn G418:lle tuottava geeni.

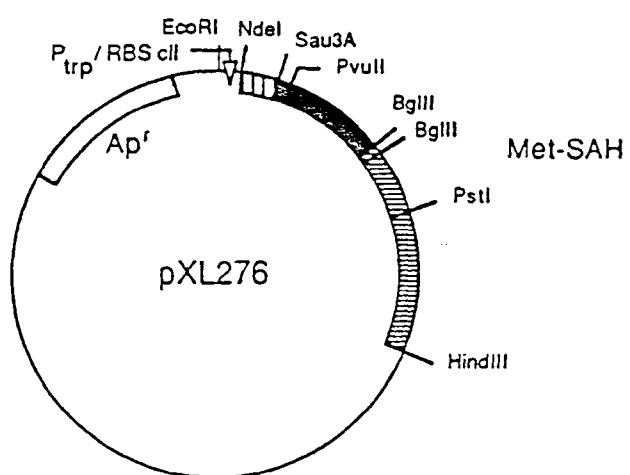
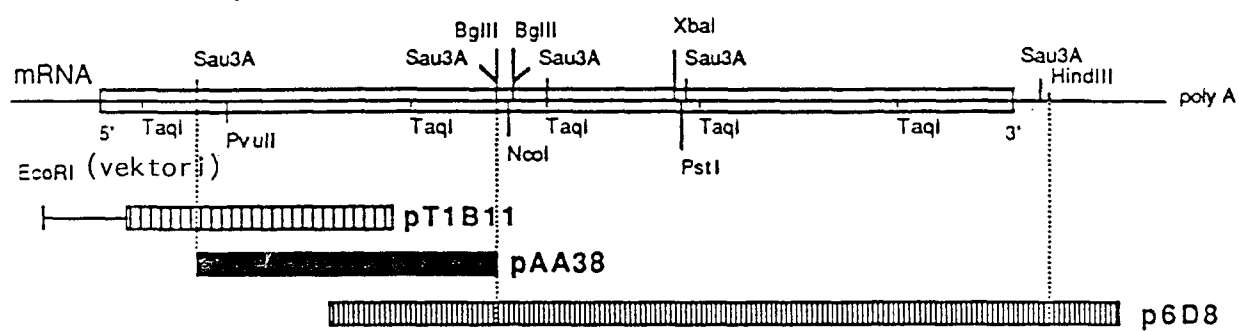
16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valikointisekvenssi on K. lactiksen lineaarisen plasmidin kl ORF1-promoottorin ja transposonin Tn903 aminoglykosidifosfotransferaasin geenin välinen fuusio.

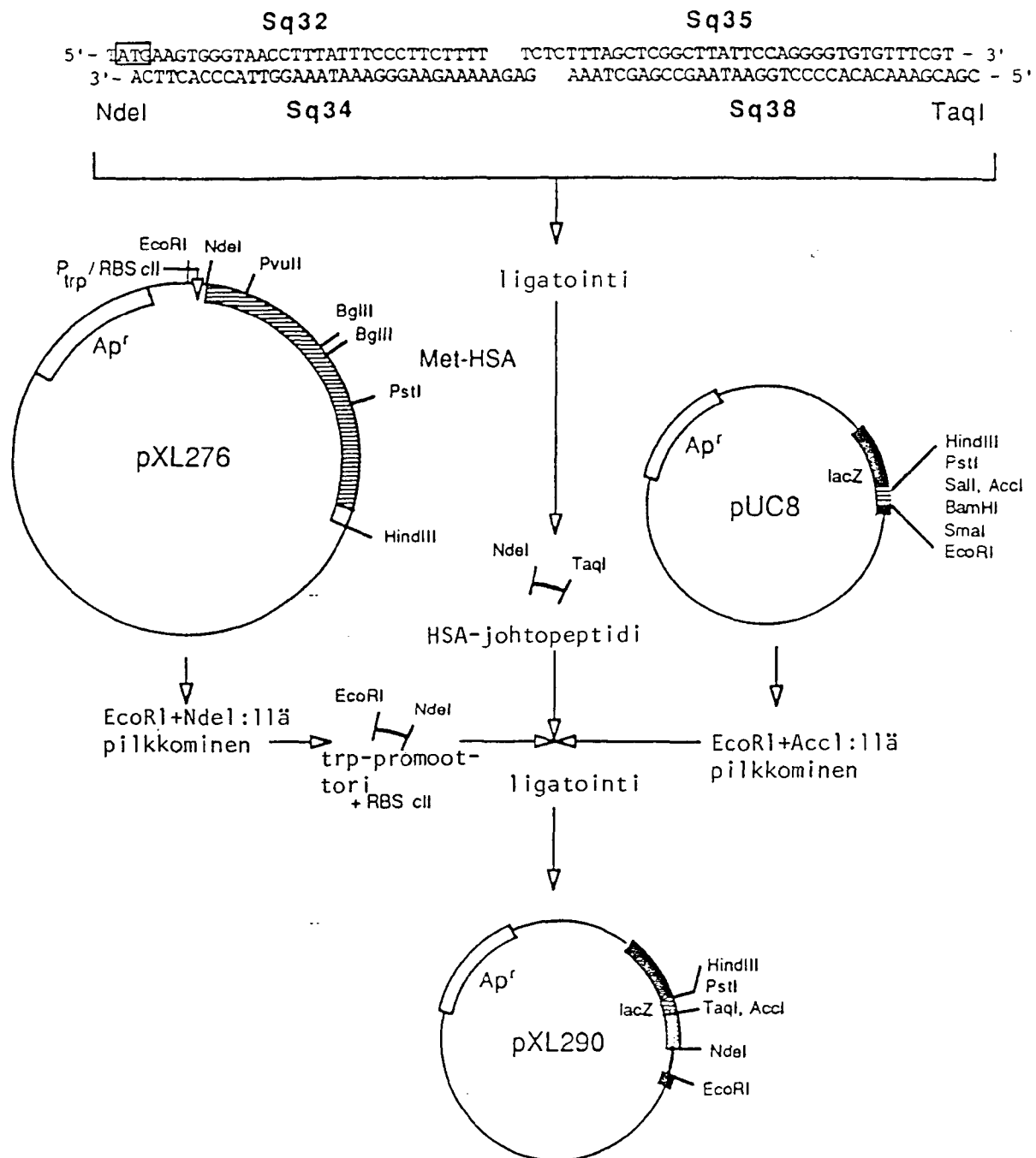
20 17. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valikointimerkki on auksotrofeja komplementoiva geeni.

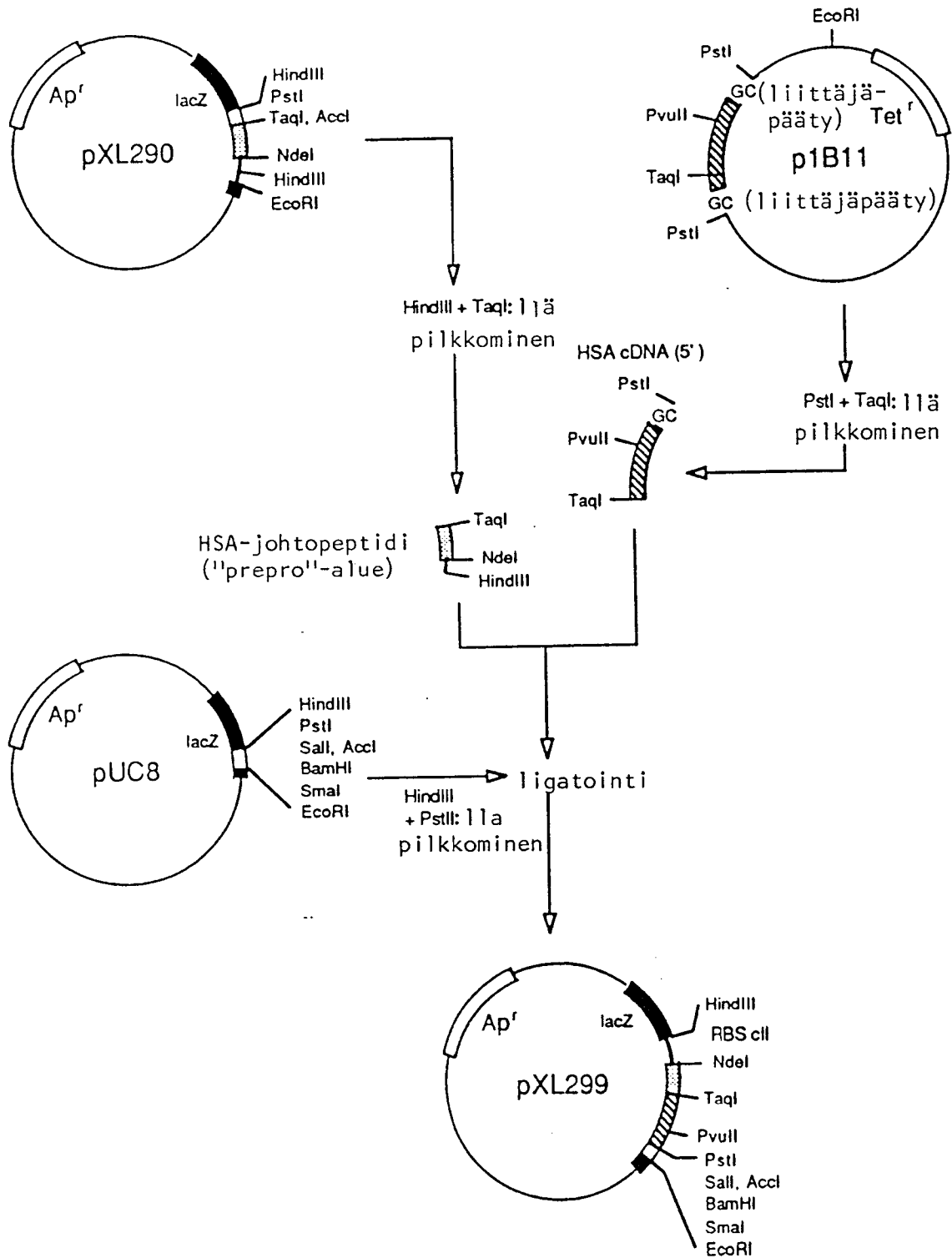
25 18. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 17 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kanta on lajeista K. marxianus, K. wickerhamii, K. waltii tai K. bulgaricus.

30 19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kanta on lajeista K. marxianus var. drosophilum, K. marxianus var. marxianus tai K. marxianus var. lactis.

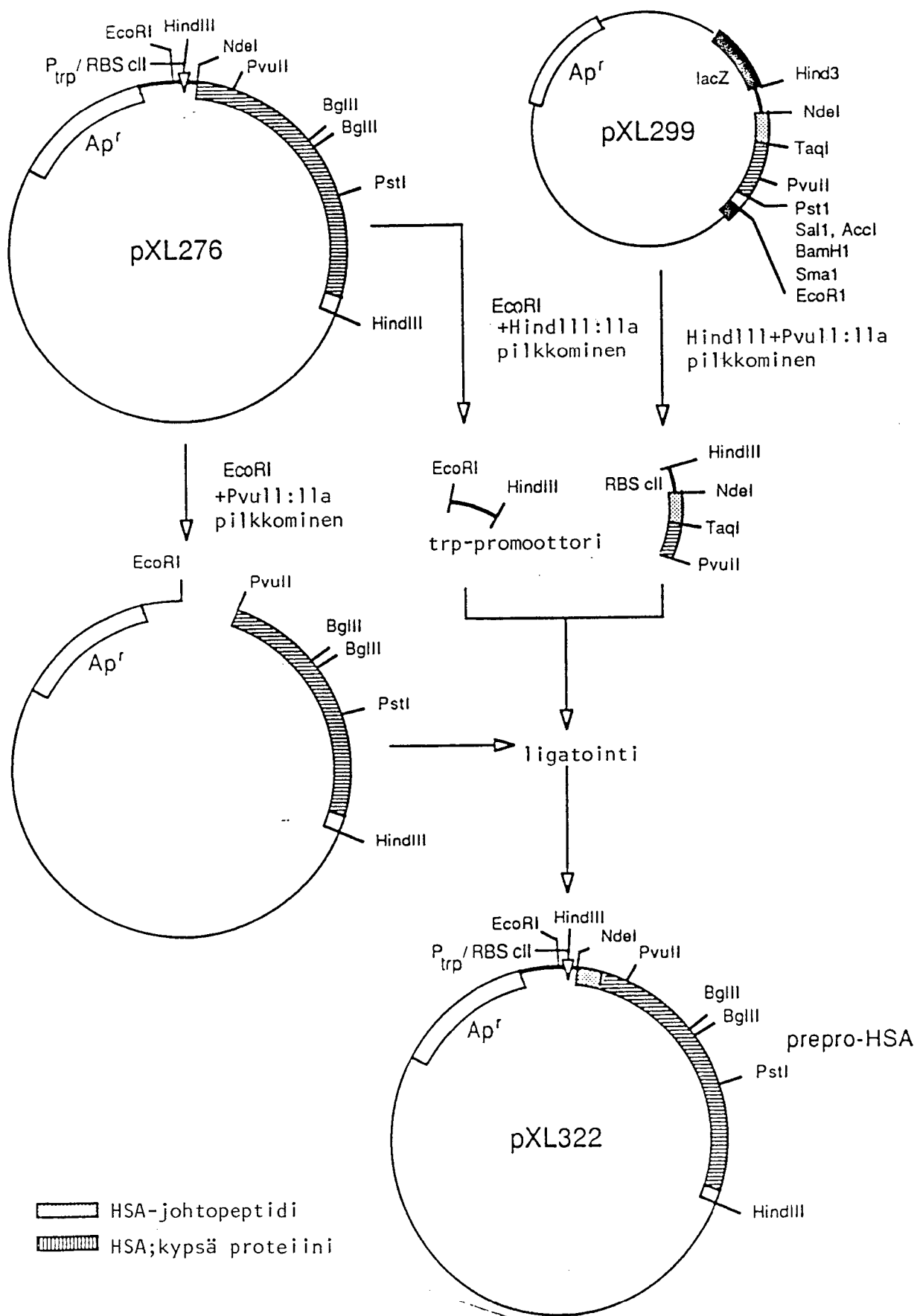
35 20. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 19 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hiivat viljellään glukosia sisältävässä alustassa, johon lisätään laktoosia keskilogaritmisien ja aikaisen stationäärikasvuvaiheen välillä.

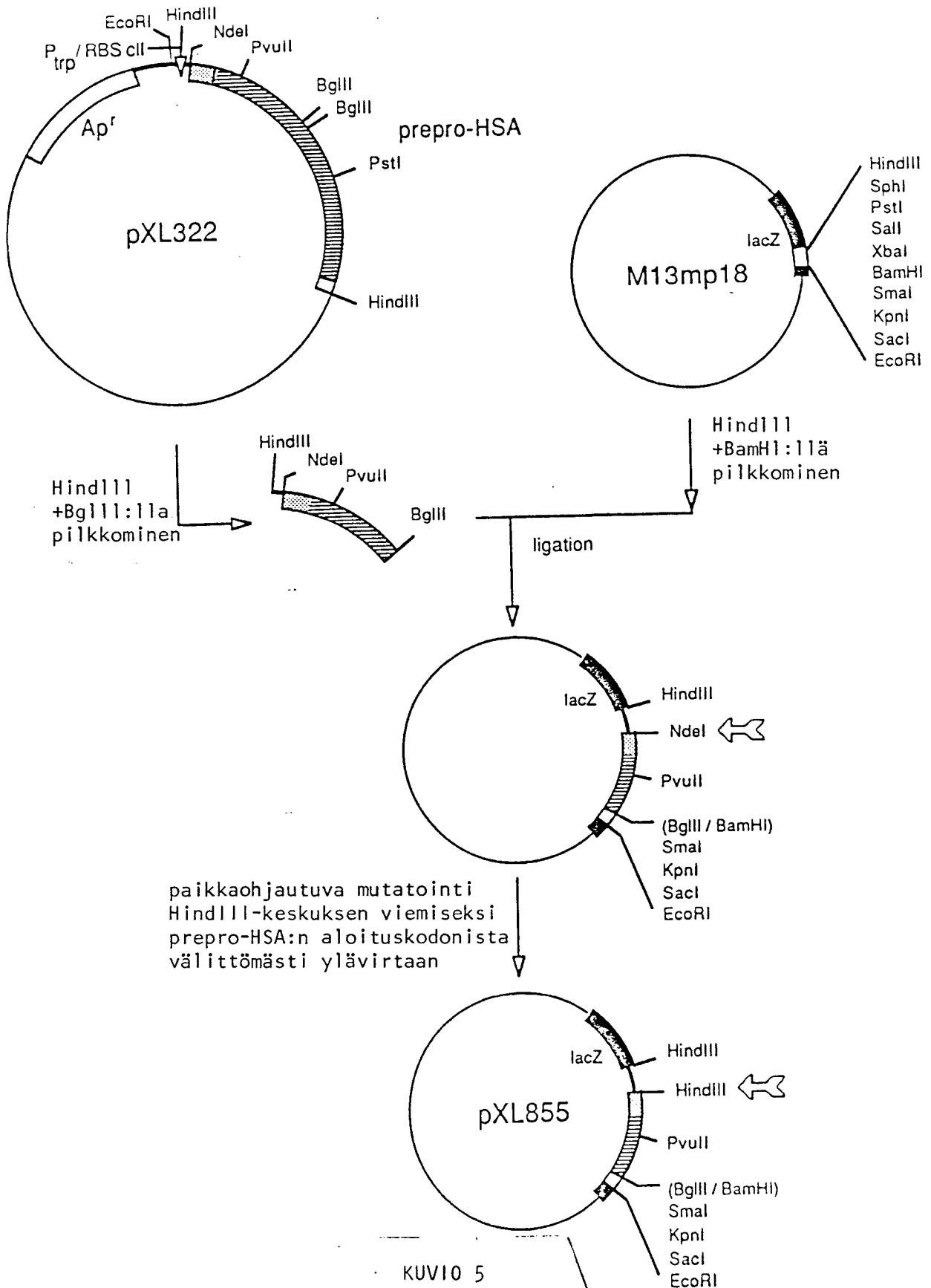


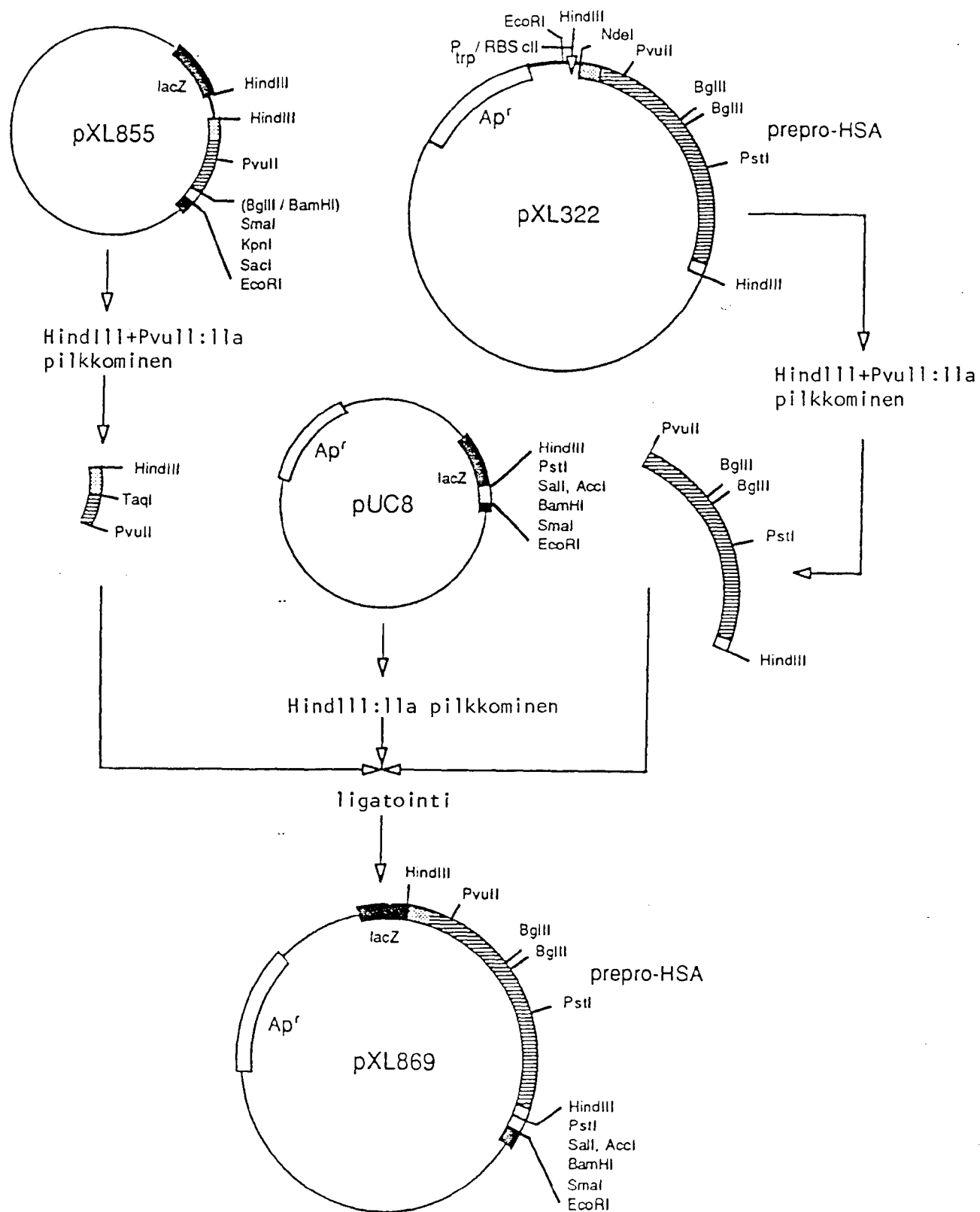




KUVIO 3







Pl. VII/61

MetLysTrpValThrPheIleSerLeuLeuPheLeuPheSerSerAlaTyrSerArgGlyValPheArg
AAGCTTATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCCCTTCTTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATCCAGGGGTGTGTTTCGT
1 11 21 31 41 51 61 71

ArgAspAlaHisLysSerGluValAlaHisArgPheLysAspLeuGlyGluGluAsnPheLysAlaLeuValLeu
CGAGATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTG
76 86 96 106 116 126 136 146

IleAlaPheAlaGlnTyrLeuGlnGlnCysProPheGluAspHisValLysLeuValAsnGluValThrGluPhe
ATTGCCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCATTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAAGTGAATTT
151 161 171 181 191 201 211 221

AlaLysThrCysValAlaAspGluSerAlaGluAsnCysAspLysSerLeuHisThrLeuPheGlyAspLysLeu
GCAAAACATGTGTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTGGAGACAAATTA
226 236 246 256 266 276 286 296

CysThrValAlaThrLeuArgGluThrTyrGlyGluMetAlaAspCysCysAlaLysGlnGluProGluArgAsn
TGACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAAT
301 311 321 331 341 351 361 371

GluCysPheLeuGlnHisLysAspAspAsnProAsnLeuProArgLeuValArgProGluValAspValMetCys
GAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAATCCAAATCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGC
376 386 396 406 416 426 436 446

ThrAlaPheHisAspAsnGluGluThrPheLeuLysLysTyrLeuTyrGluIleAlaArgArgHisProTyrPhe
ACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTT
451 461 471 481 491 501 511 521

TyrAlaProGluLeuLeuPhePheAlaLysArgTyrLysAlaAlaPheThrGluCysCysGlnAlaAlaAspLys
TATGCCCCGGAACCTCTTTTCTTGTCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAA
526 536 546 556 566 576 586 596

AlaAlaCysLeuLeuProLysLeuAspGluLeuArgAspGluGlyLysAlaSerSerAlaLysGlnArgLeuLys
GCAGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGATGAAGCTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAG
601 611 621 631 641 651 661 671

CysAlaSerLeuGlnLysPheGlyGluArgAlaPheLysAlaTrpAlaValAlaArgLeuSerGlnArgPhePro
TGTGCCAGTCTCCAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCTGAGCCAGAGATTTCCT
676 686 696 706 716 726 736 746

LysAlaGluPheAlaGluValSerLysLeuValThrAspLeuThrLysValHisThrGluCysCysHisGlyAsp
AAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGAT
751 761 771 781 791 801 811 821

LeuLeuGluCysAlaAspAspArgAlaAspLeuAlaLysTyrIleCysGluAsnGlnAspSerIleSerSerLys
CTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTGATCTCCAGTAAA
826 836 846 856 866 876 886 896

LeuLysGluCysCysGluLysProLeuLeuGluLysSerHisCysIleAlaGluValGluAsnAspGluMetPro
CTGAAGGAATGCTGTGAAAACCTCTGTTGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGGAATGATGAGATGCCT
901 911 921 931 941 951 961 971

AlaAspLeuProSerLeuAlaAlaAspPheValGluSerLysAspValCysLysAsnTyrAlaGluAlaLysAsp
GCTGACTTGCCCTTCATTAGCGGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAACTATGCTGAGGCAAGGAT
976 986 996 1006 1016 1026 1036 1046

ValPheLeuGlyMetPheLeuTyrGluTyrAlaArgArgHisProAspTyrSerValValLeuLeuLeuArgLeu
GTCTTCTTGGGCATGTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTACTGCTGCTGAGACTT
1051 1061 1071 1081 1091 1101 1111 1121

AlaLysThrTyrGluThrThrLeuGluLysCysCysAlaAlaAlaAspProHisGluCysTyrAlaLysValPhe
 GCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTG
 1126 1136 1146 1156 1166 1176 1186 1196

AspGluPheLysProLeuValGluGluProGlnAsnLeuIleLysGlnAsnCysGluLeuPheGluGlnLeuGly
 GATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTGTGAGCAGCTTGGA
 1201 1211 1221 1231 1241 1251 1261 1271

GluTyrLysPheGlnAsnAlaLeuLeuValArgTyrThrLysLysValProGlnValSerThrProThrLeuVal
 GAGTACAAATTCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTCTTGTA
 1276 1286 1296 1306 1316 1326 1336 1346

GluValSerArgAsnLeuGlyLysValGlySerLysCysCysLysHisProGluAlaLysArgMetProCysAla
 GAGGTCTCAACAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCA
 1351 1361 1371 1381 1391 1401 1411 1421

GluAspTyrLeuSerValValLeuAsnGlnLeuCysValLeuHisGluLysThrProValSerAspArgValThr
 GAAGACTATCTATCCGTGGTCCTGAACCAAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACC
 1426 1436 1446 1456 1466 1476 1486 1496

LysCysCysThrGluSerLeuValAsnArgArgProCysPheSerAlaLeuGluValAspGluThrTyrValPro
 AAATGCTGCACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAACATACGTTCCC
 1501 1511 1521 1531 1541 1551 1561 1571

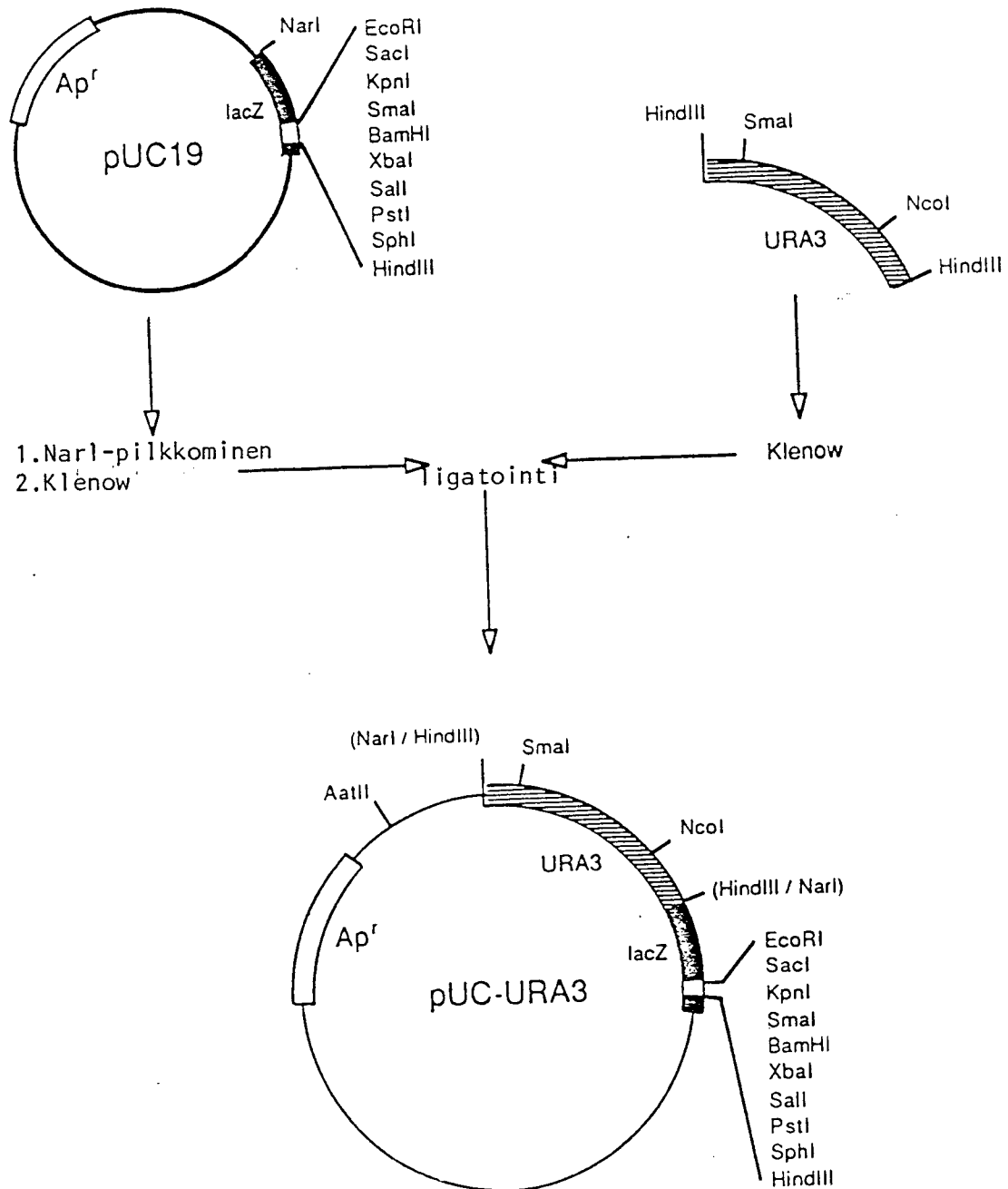
LysGluPheAsnAlaGluThrPheThrPheHisAlaAspIleCysThrLeuSerGluLysGluArgGlnIleLys
 AAAGAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAG
 1576 1586 1596 1606 1616 1626 1636 1646

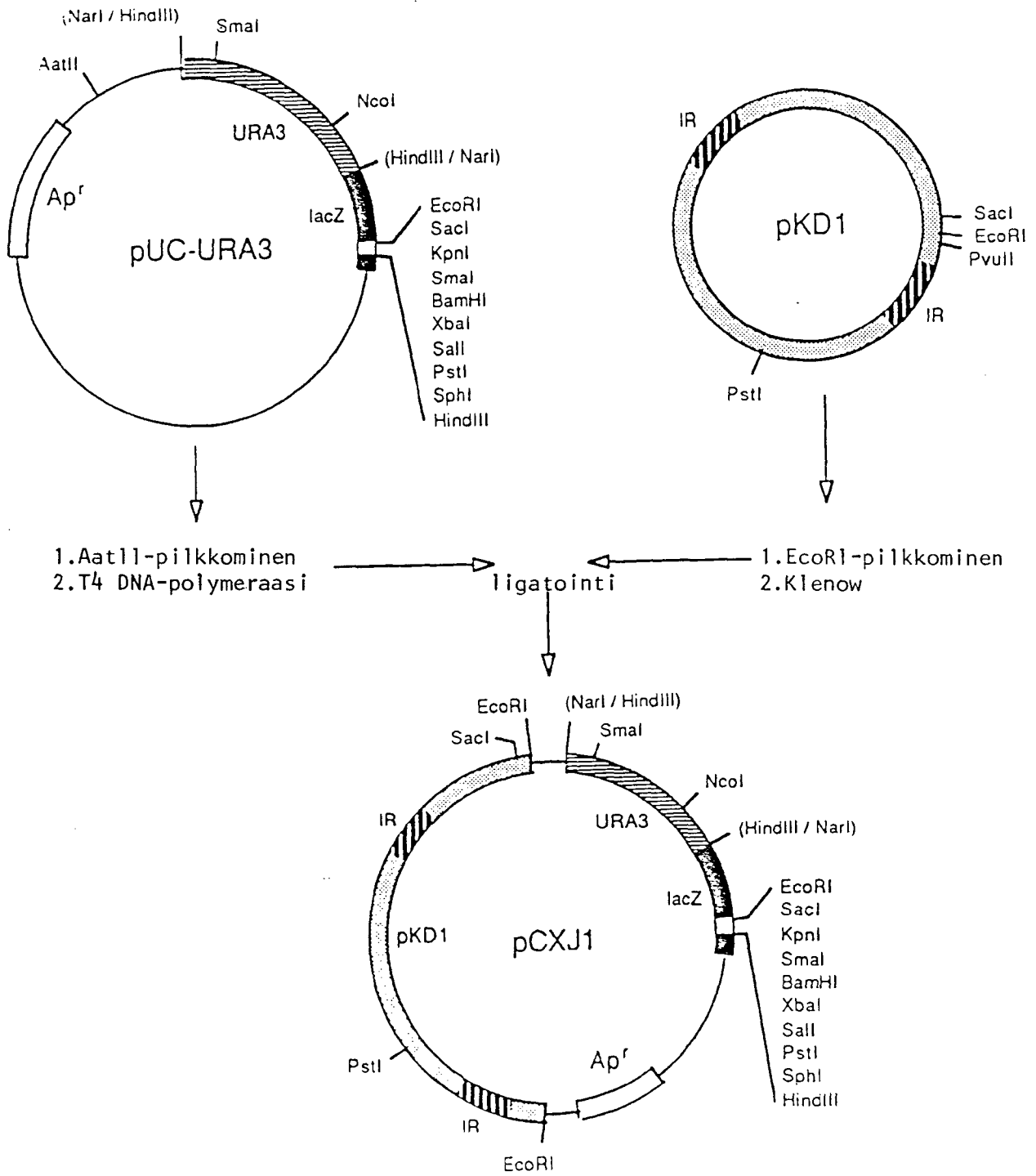
LysGlnThrAlaLeuValGluLeuValLysHisLysProLysAlaThrLysGluGlnLeuLysAlaValMetAsp
 AAACAAACTGCACCTTGTGAGCTTGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTATGGAT
 1651 1661 1671 1681 1691 1701 1711 1721

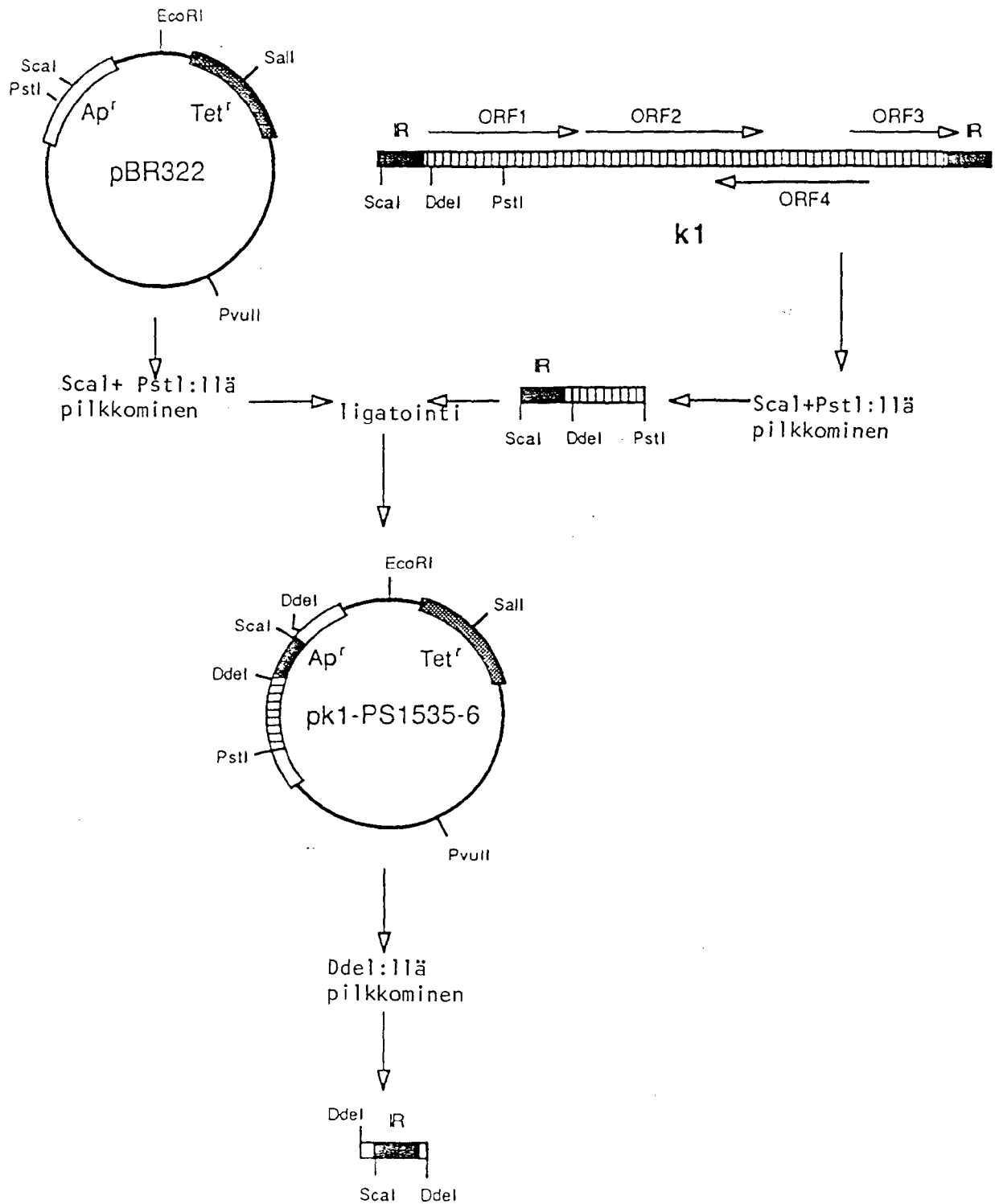
AspPheAlaAlaPheValGluLysCysCysLysAlaAspAspLysGluThrCysPheAlaGluGluGlyLysLys
 GATTTCGAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAAACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAA
 1726 1736 1746 1756 1766 1776 1786 1796

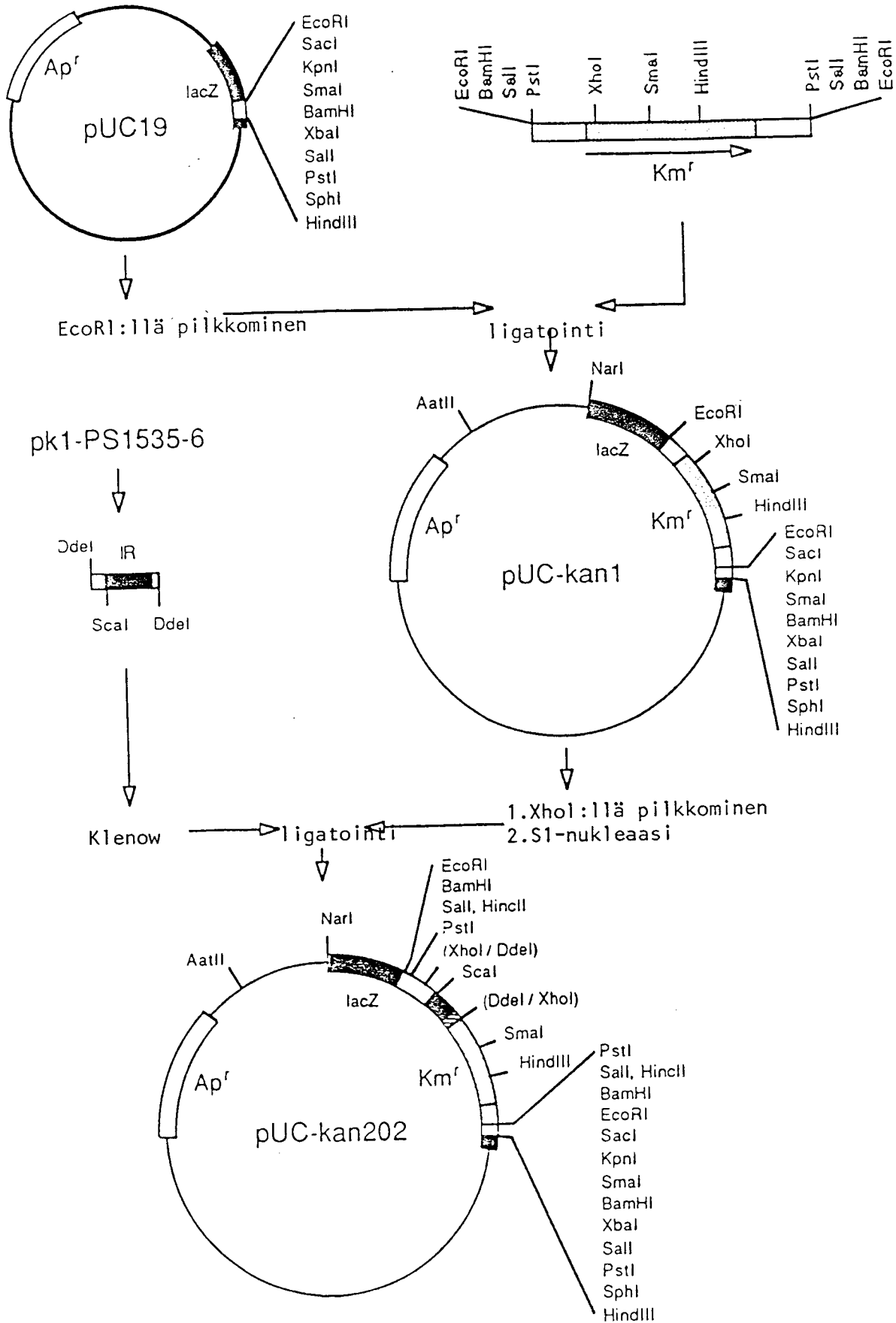
LeuValAlaAlaSerGlnAlaAlaLeuGlyLeu***
 CTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTAGGCTTATAACATCACATTTAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAA
 1801 1811 1821 1831 1841 1851 1861 1871

GAGAAAGAAAATGAAGATCAAAAGCTT
 1876 1886 1896









ScaI promoottori pk1

5' - AGTACTAAAAGTGAGATTATTGGAAGATTAGATCGTCTCCATTTTTTTCTGTTTTTTTGTTTTAT

ATATTAGGTTATTTTTTTTCAGTTTATACTTCTCTGTATAACAAGTCTATTTTTTTATATTTTAAGTC

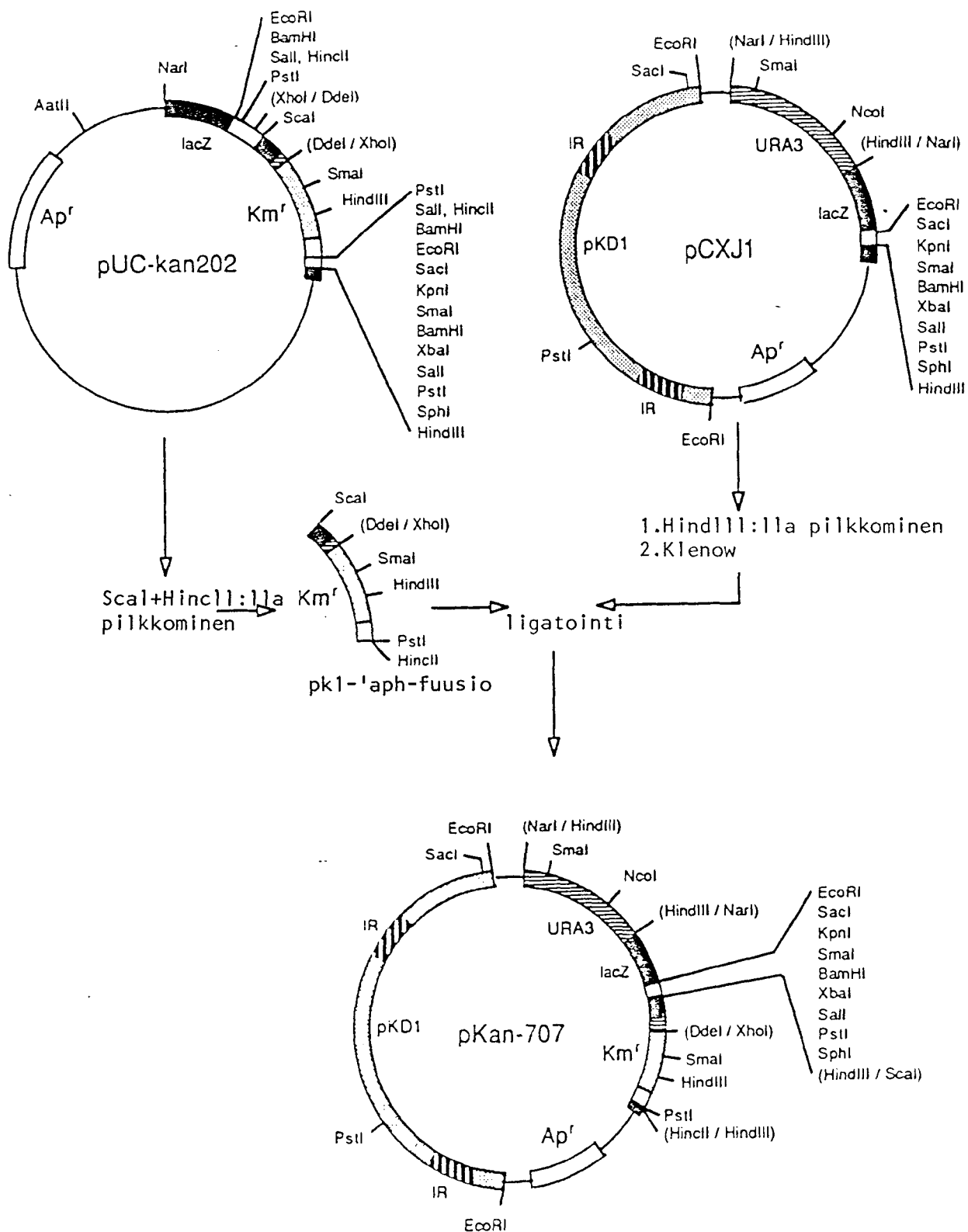
TATTTTACACTTATGACCTATAAGTCATTTTATTATACACATTTTCCAATAAATATATGAATTACATT

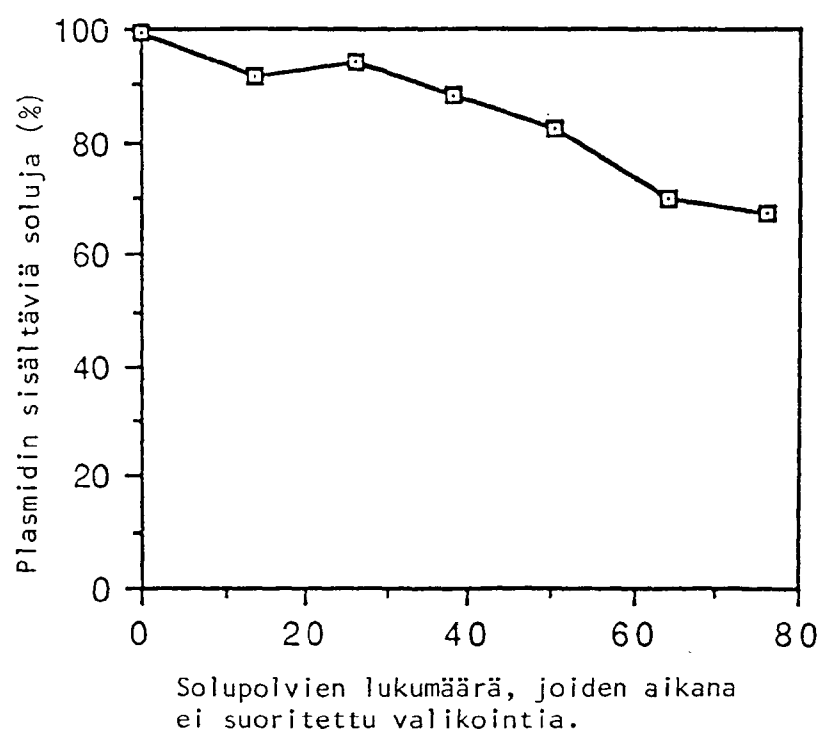
(DdeI/XhoI)

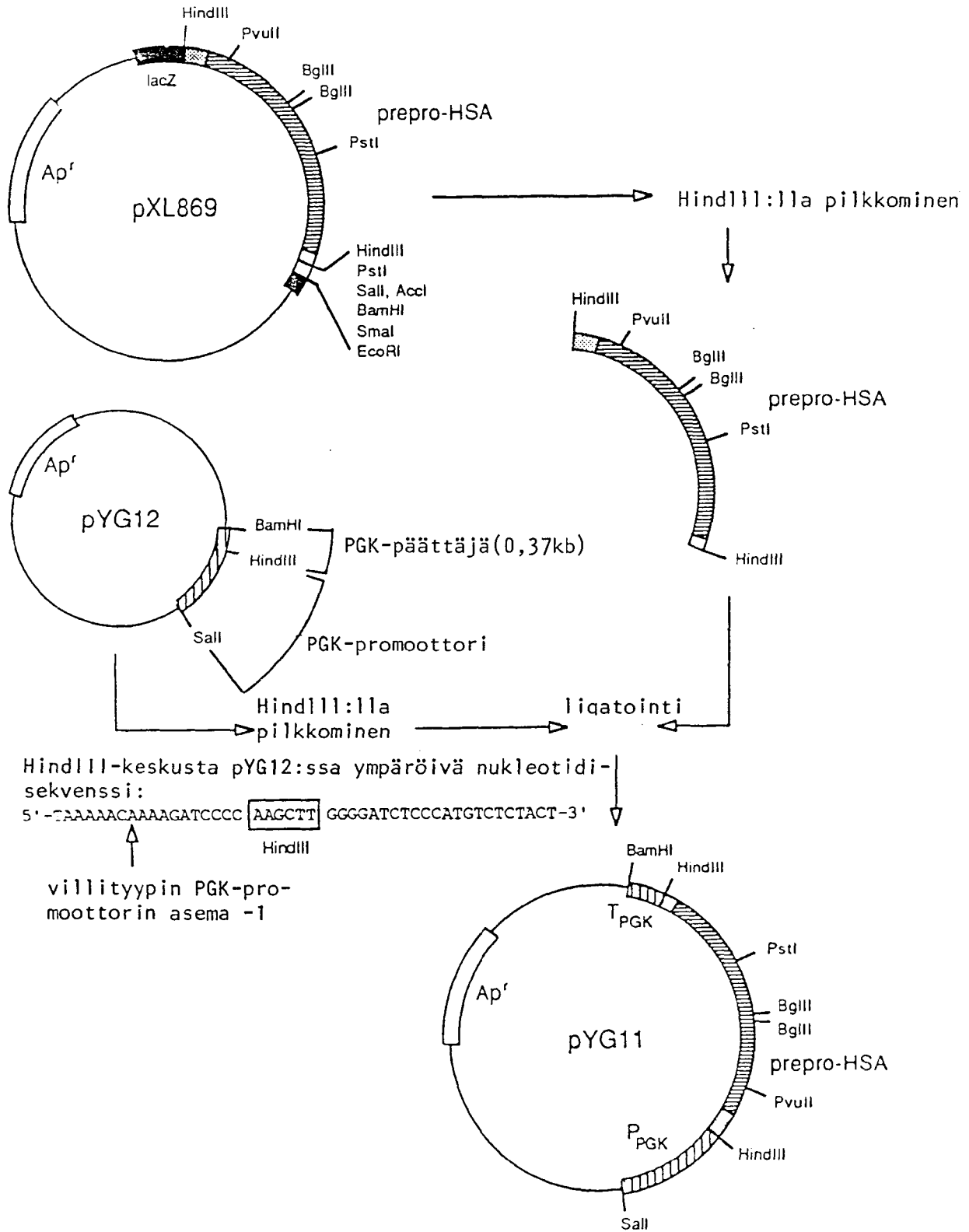
ATTAATTTAAAA | ATG GAT TTC AAA GAT AAG GCT TTA AAT GAT CTA | AGG CCG CGA

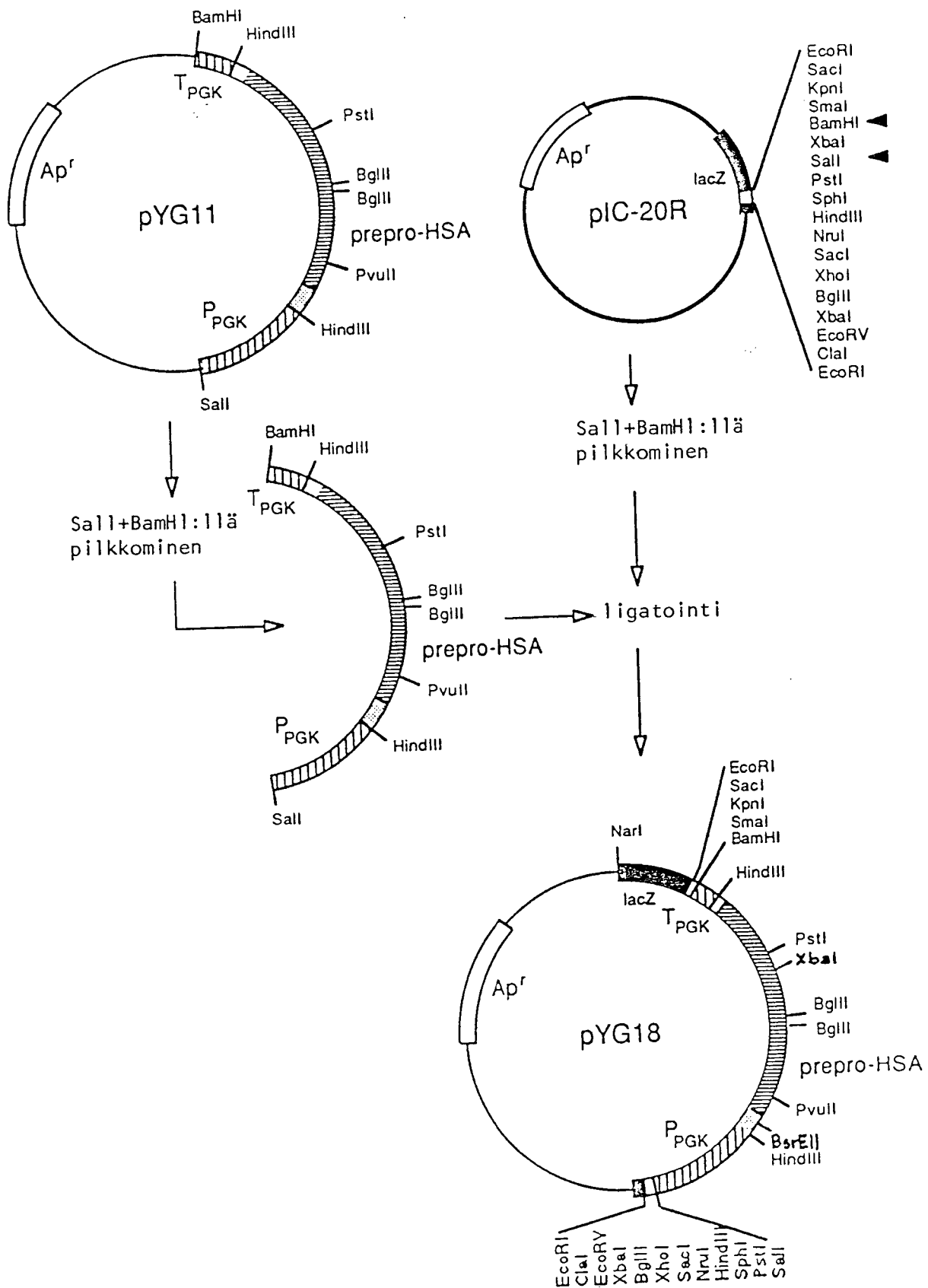
ORF1' 'aph'

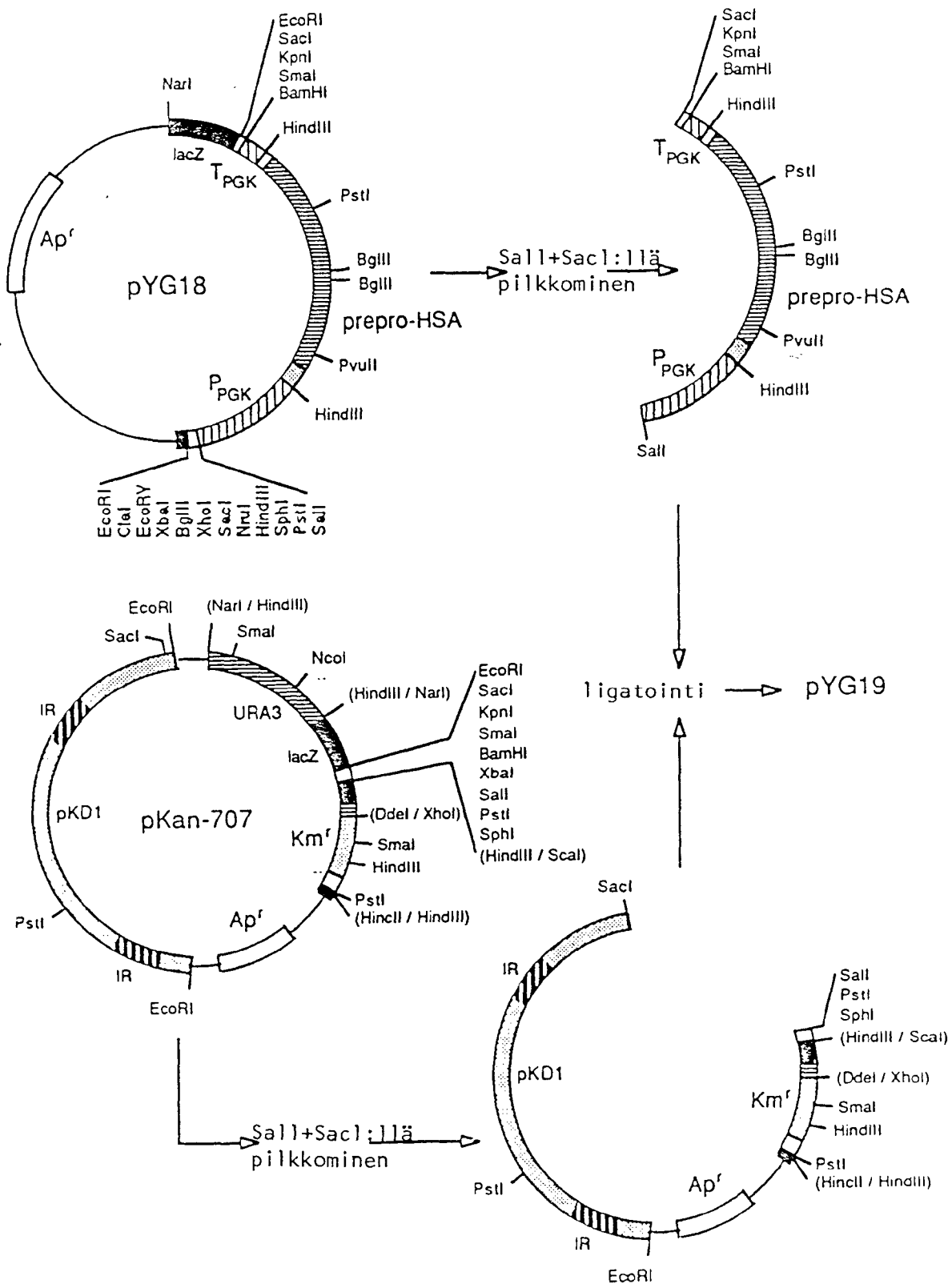
TTA AAT TCC AAC ... - 3'



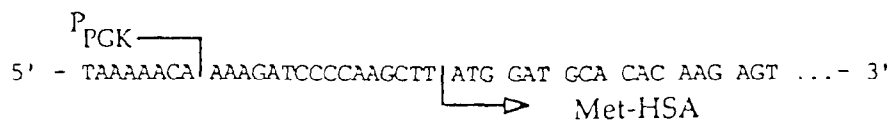
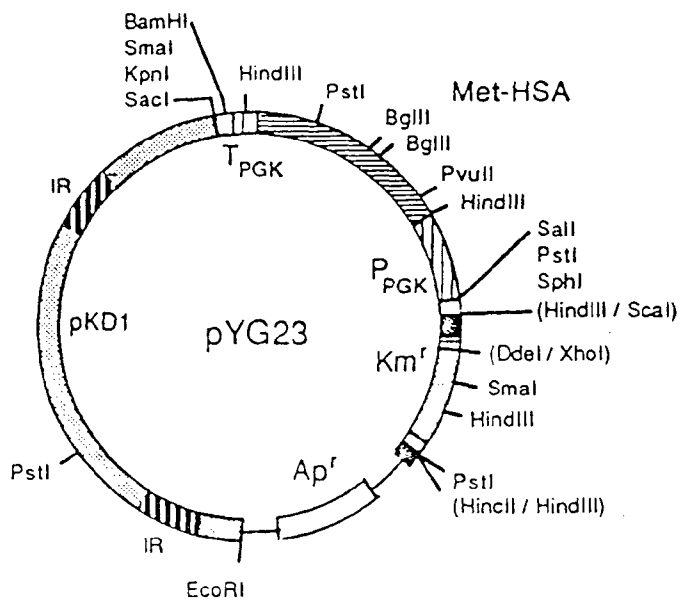
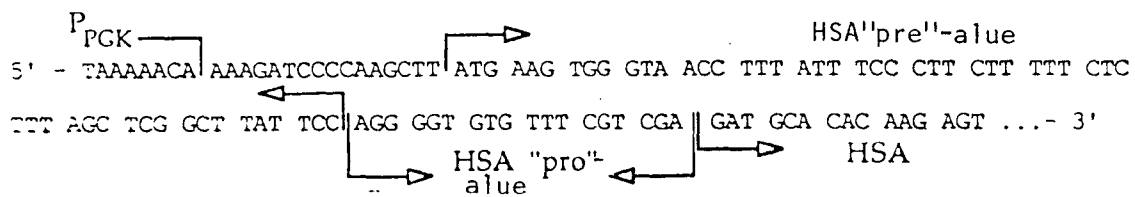
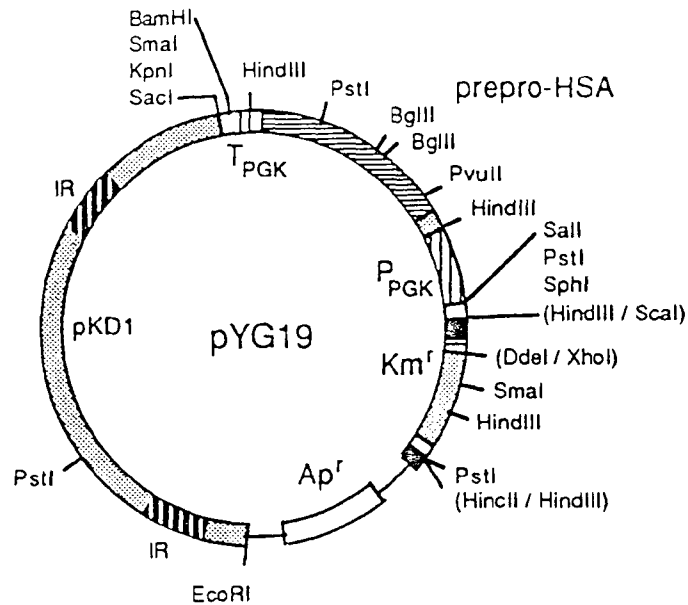


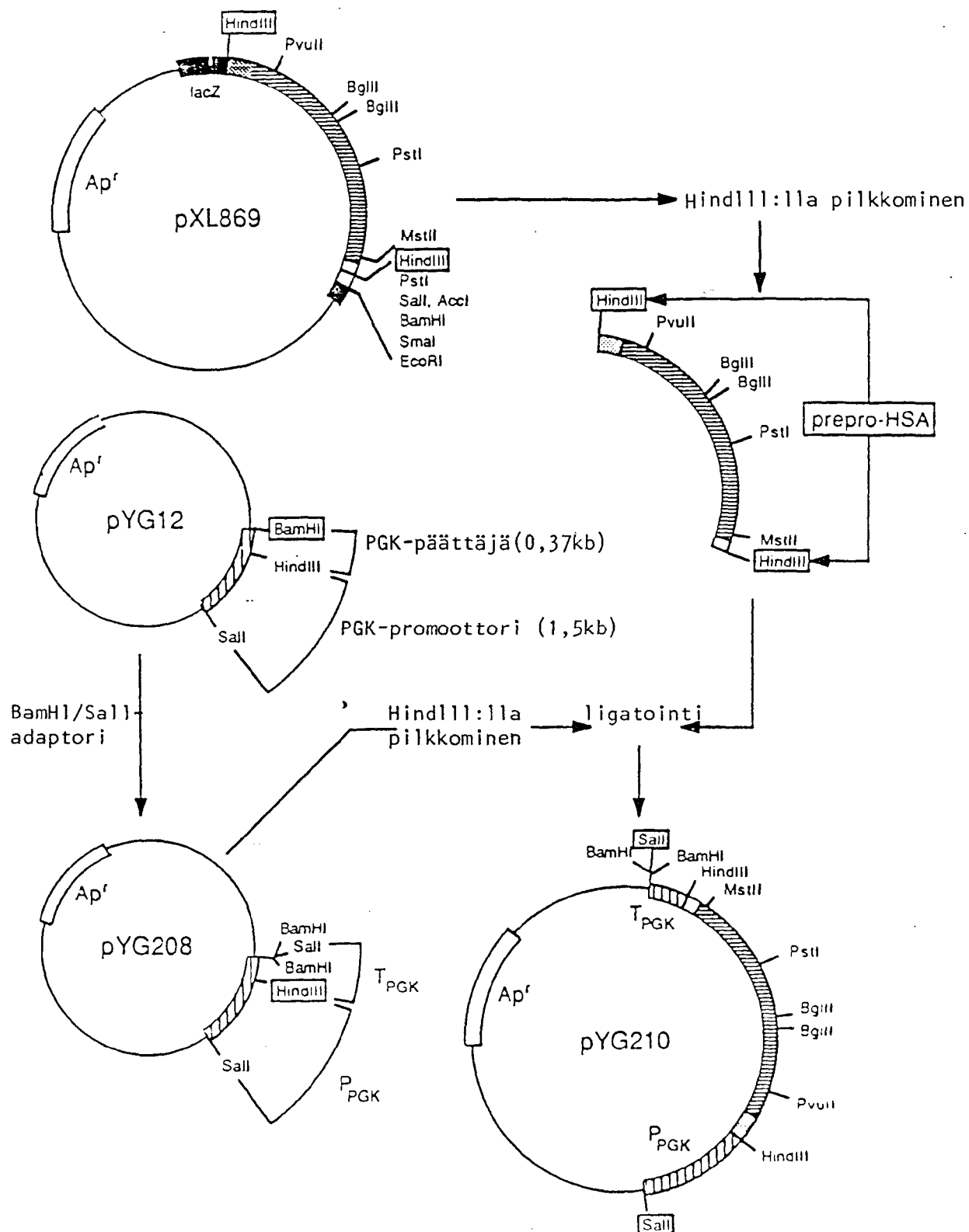




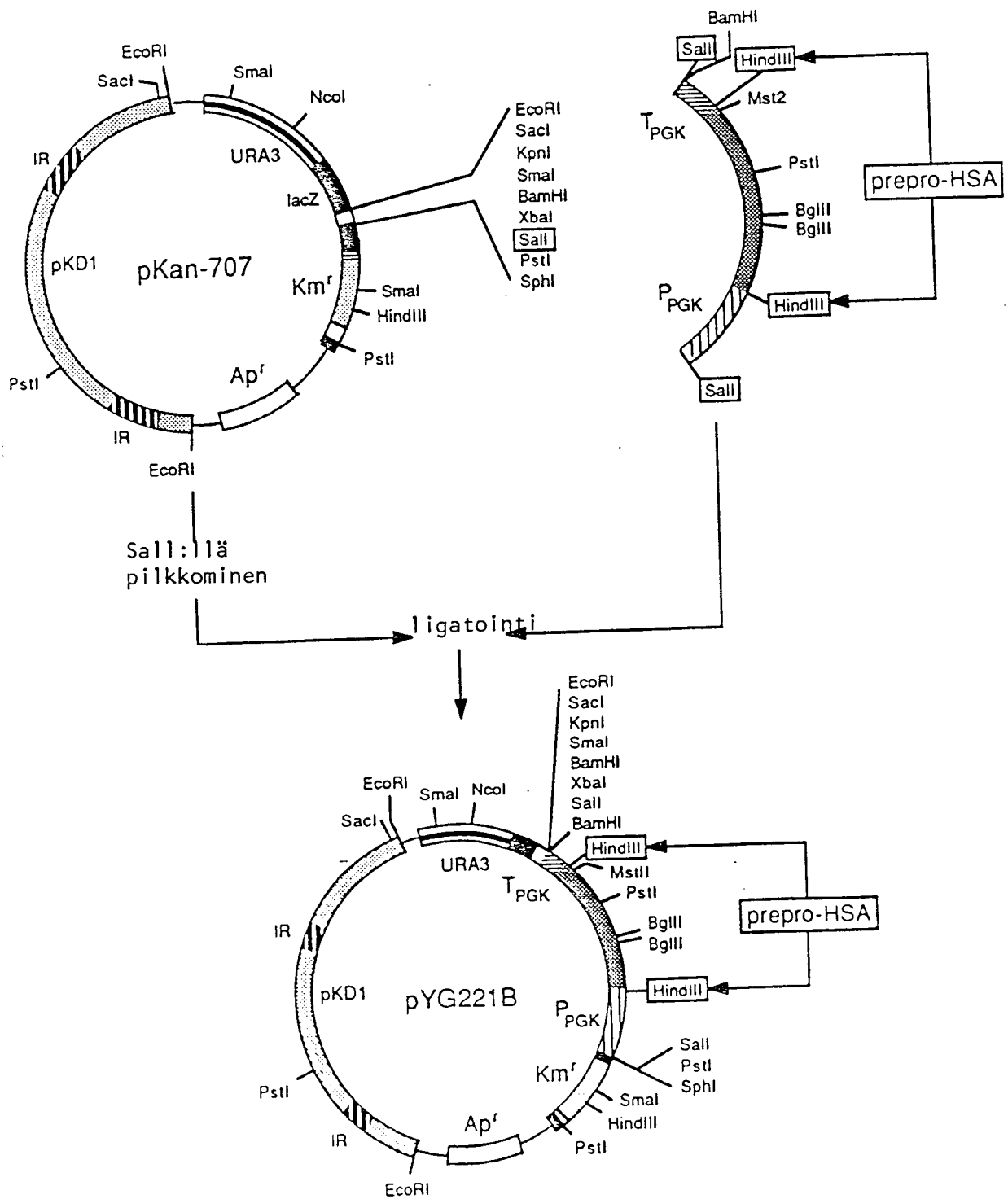


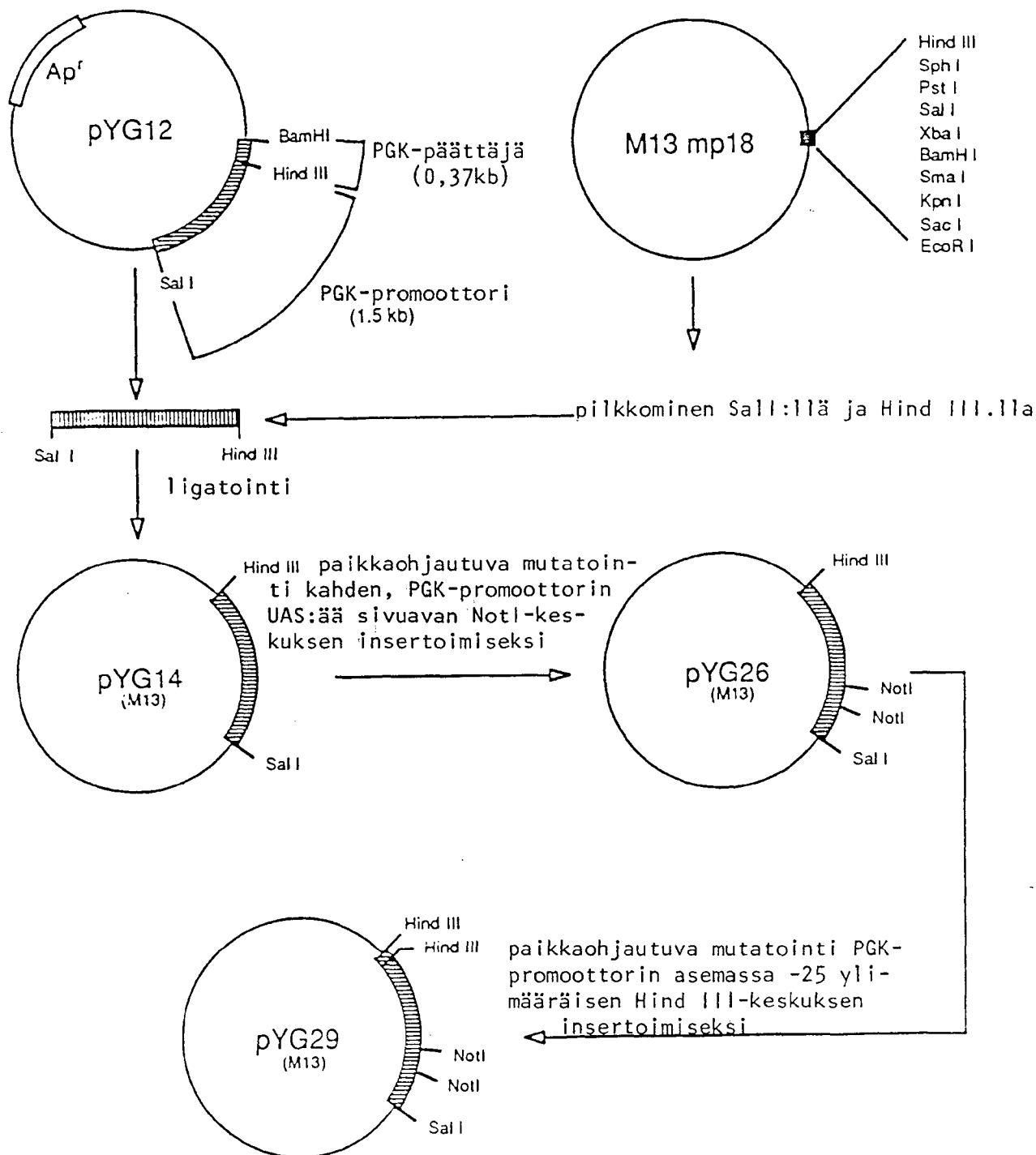
Pl. XIX/61





KUVIO 19A





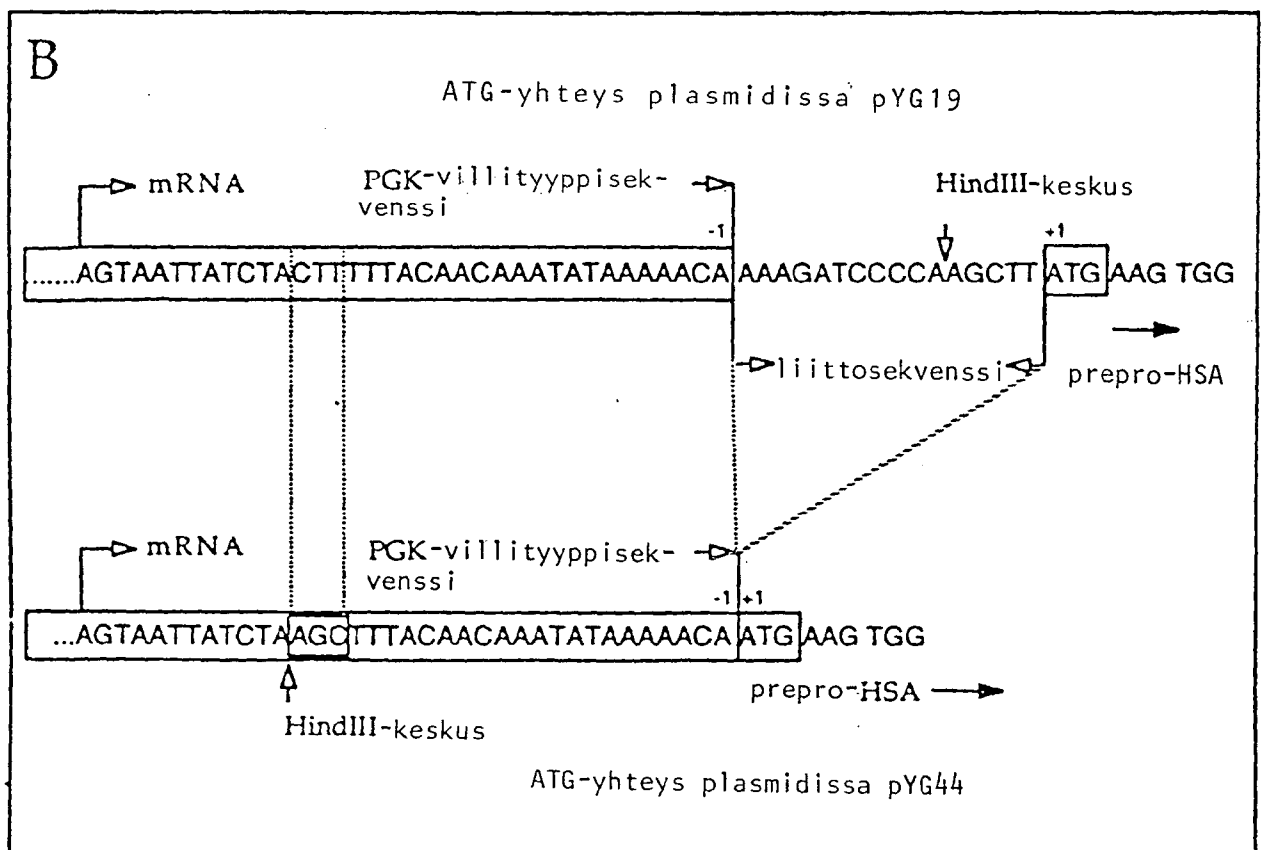
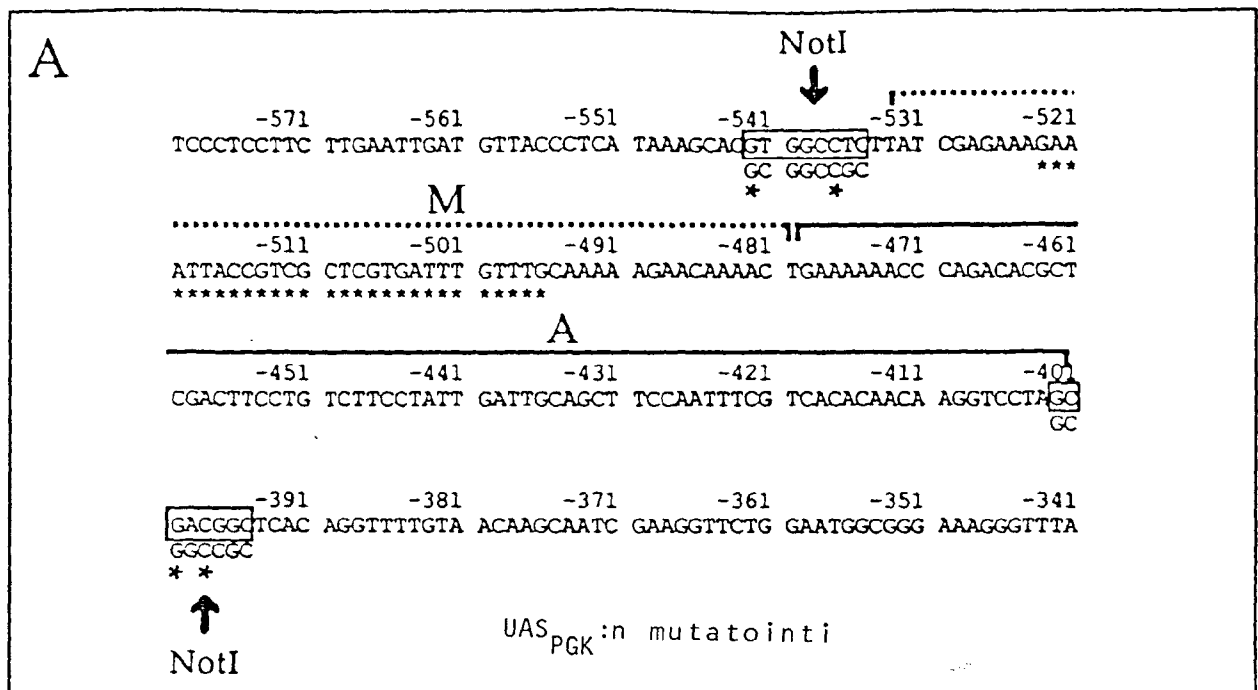


FIG. 21

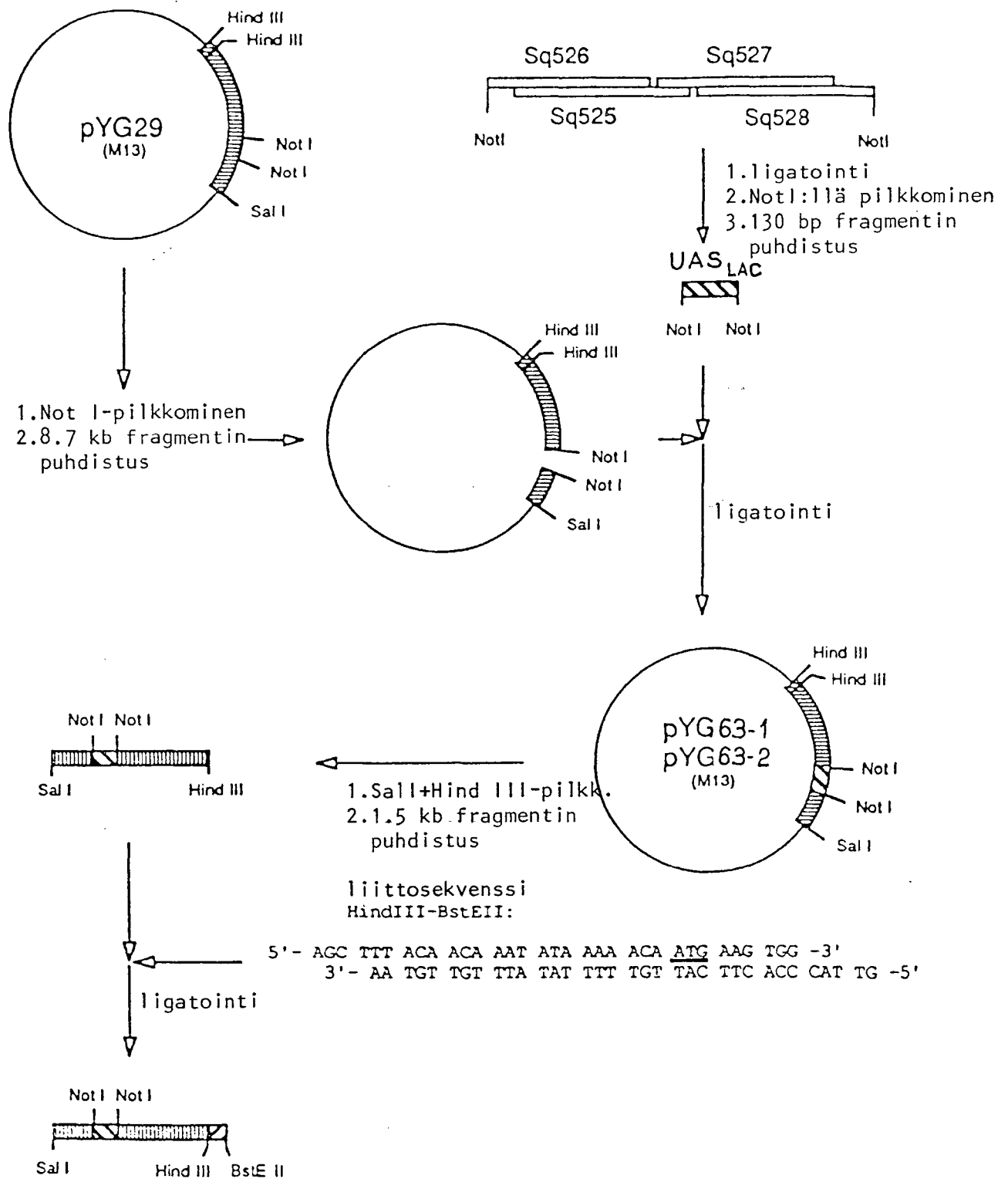
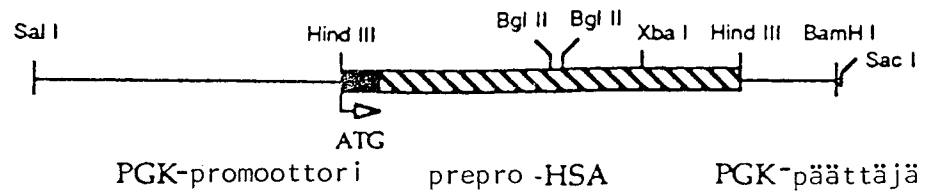
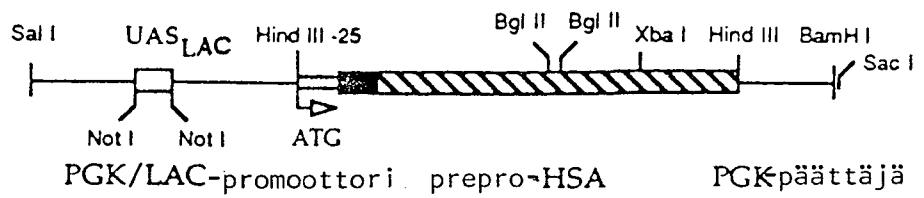


FIG. 22

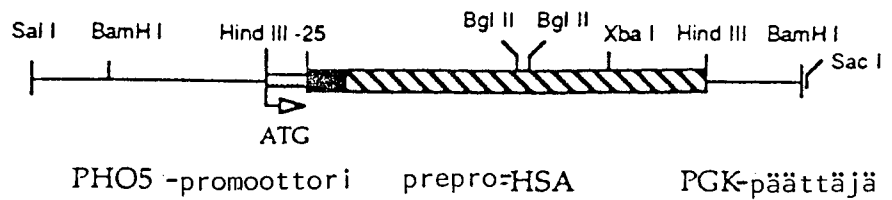
pYG19



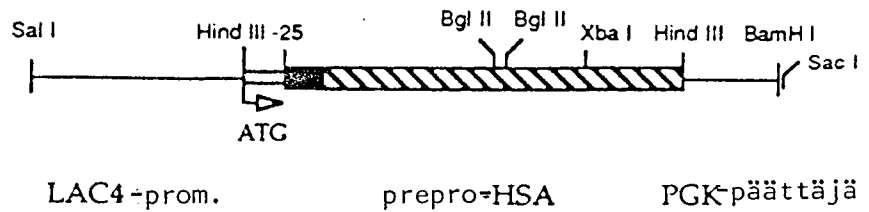
pYG44-5
pYG44-7



pYG51



pYG404



pYG58

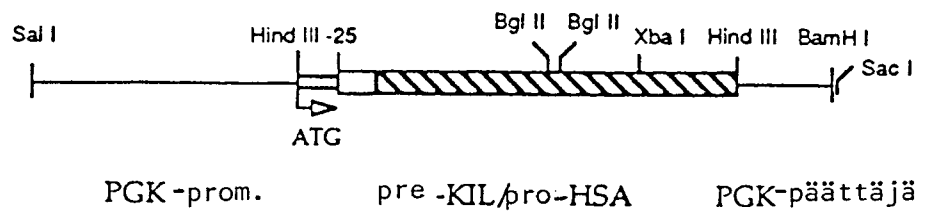


FIG. 23

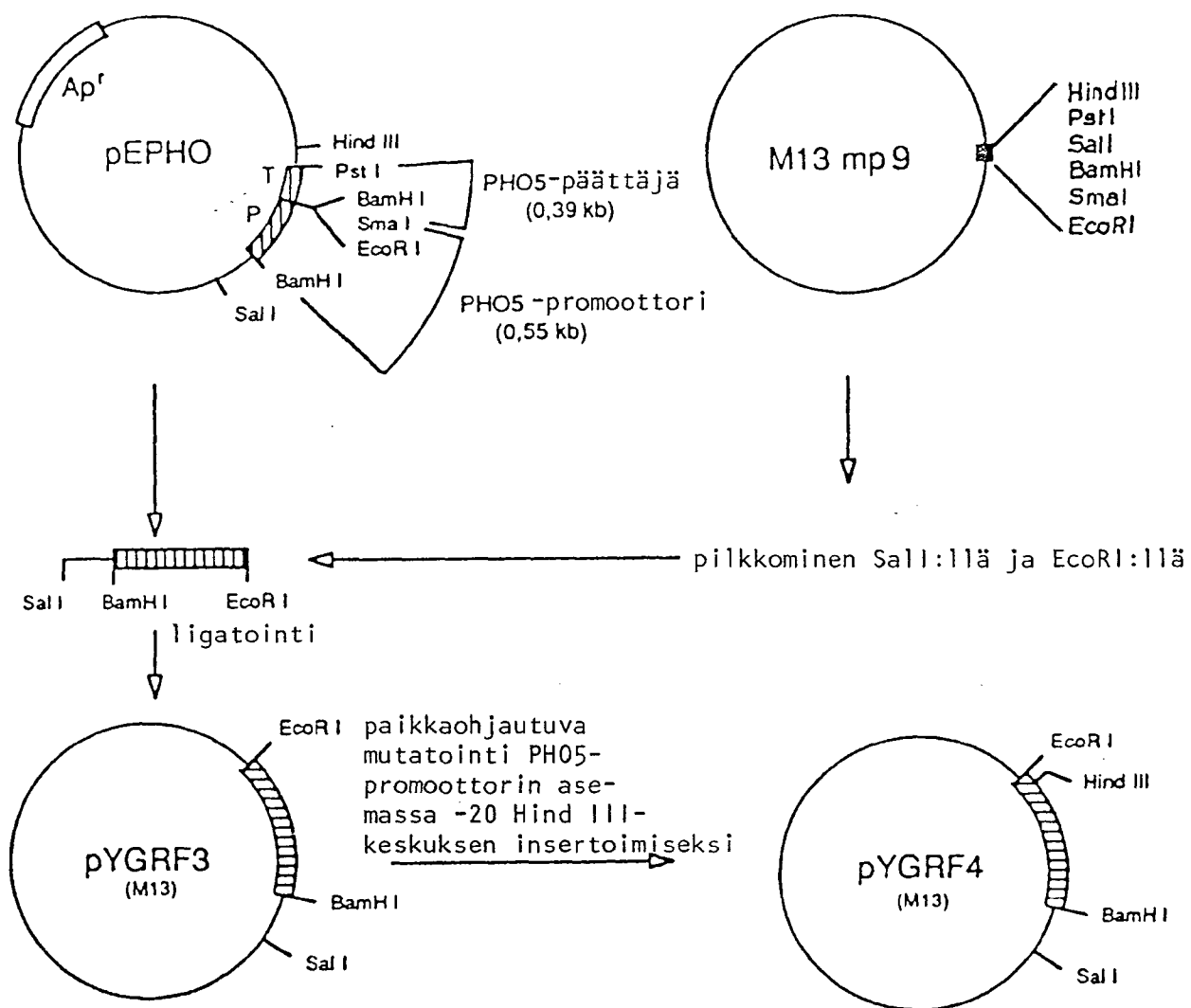


FIG. 24

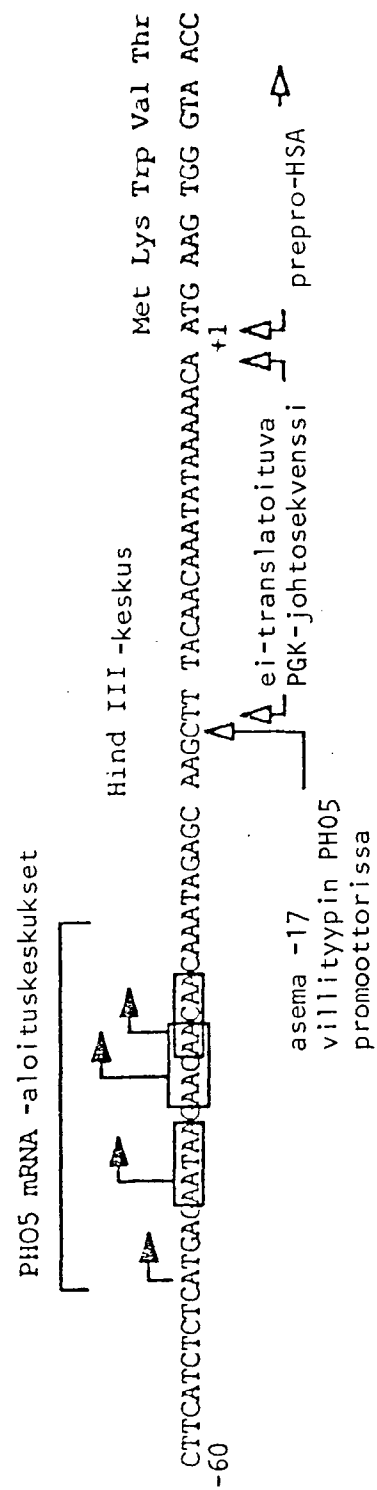


FIG. 25

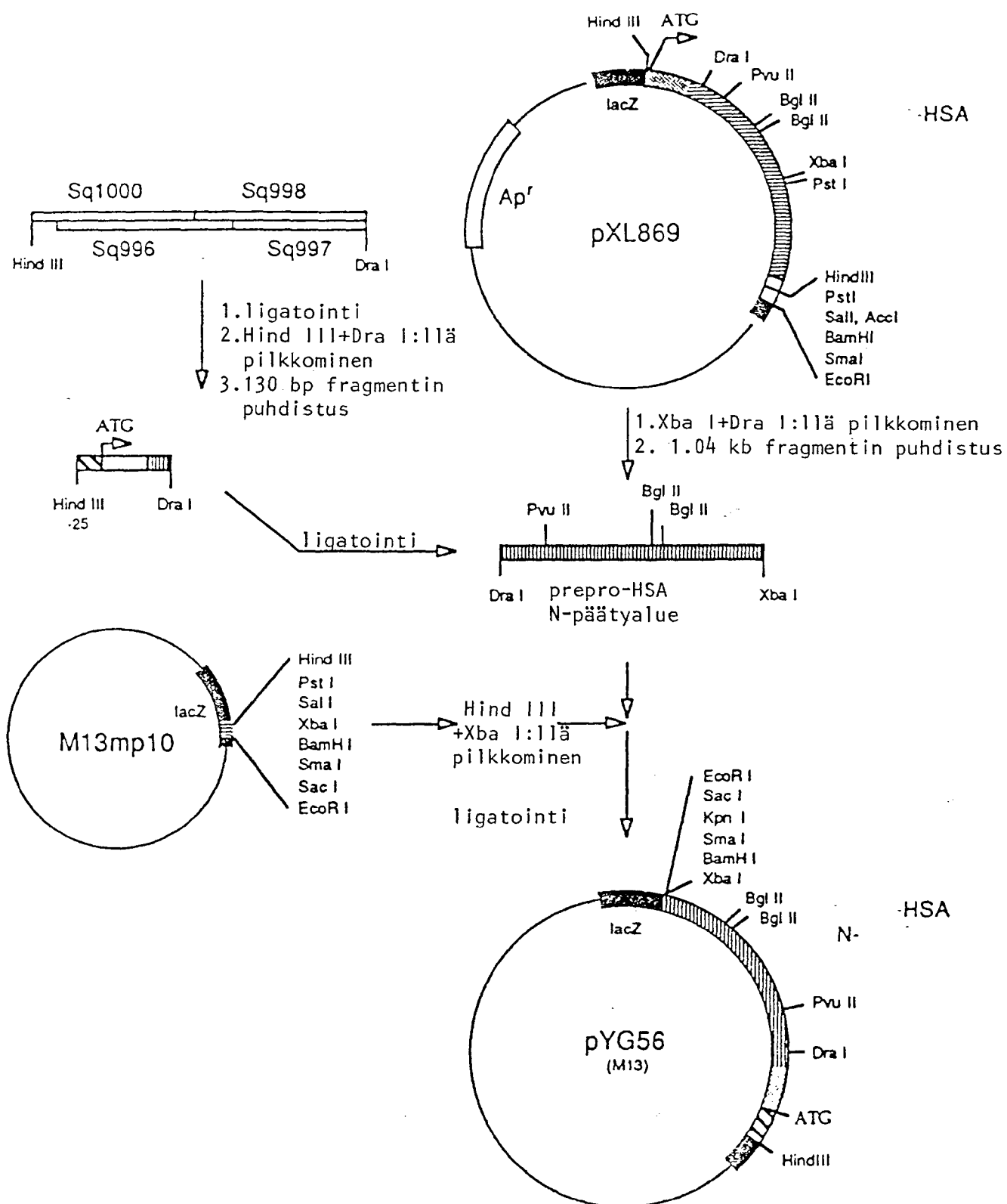


FIG. 26

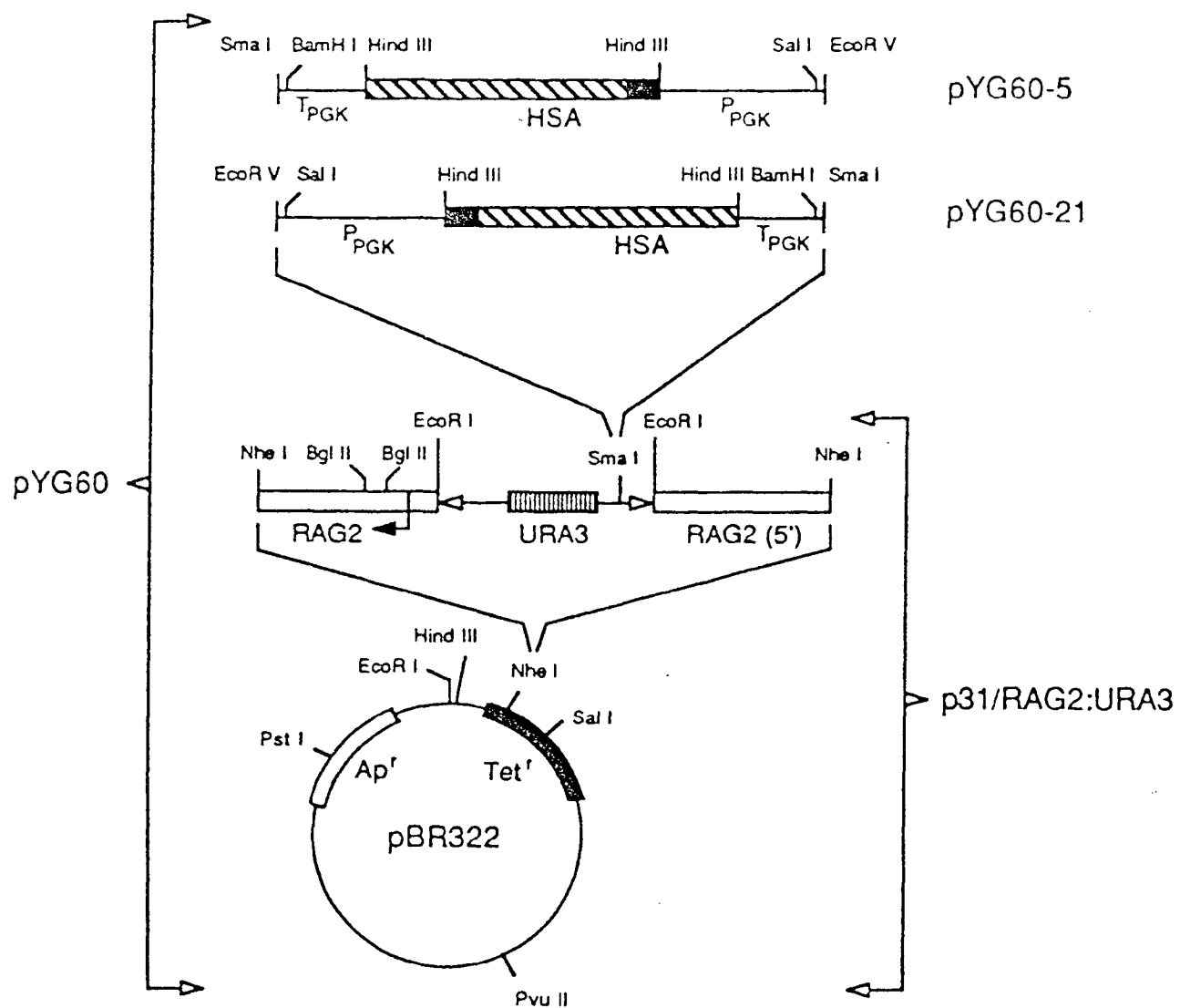


FIG. 27

pYG19 et pYG23

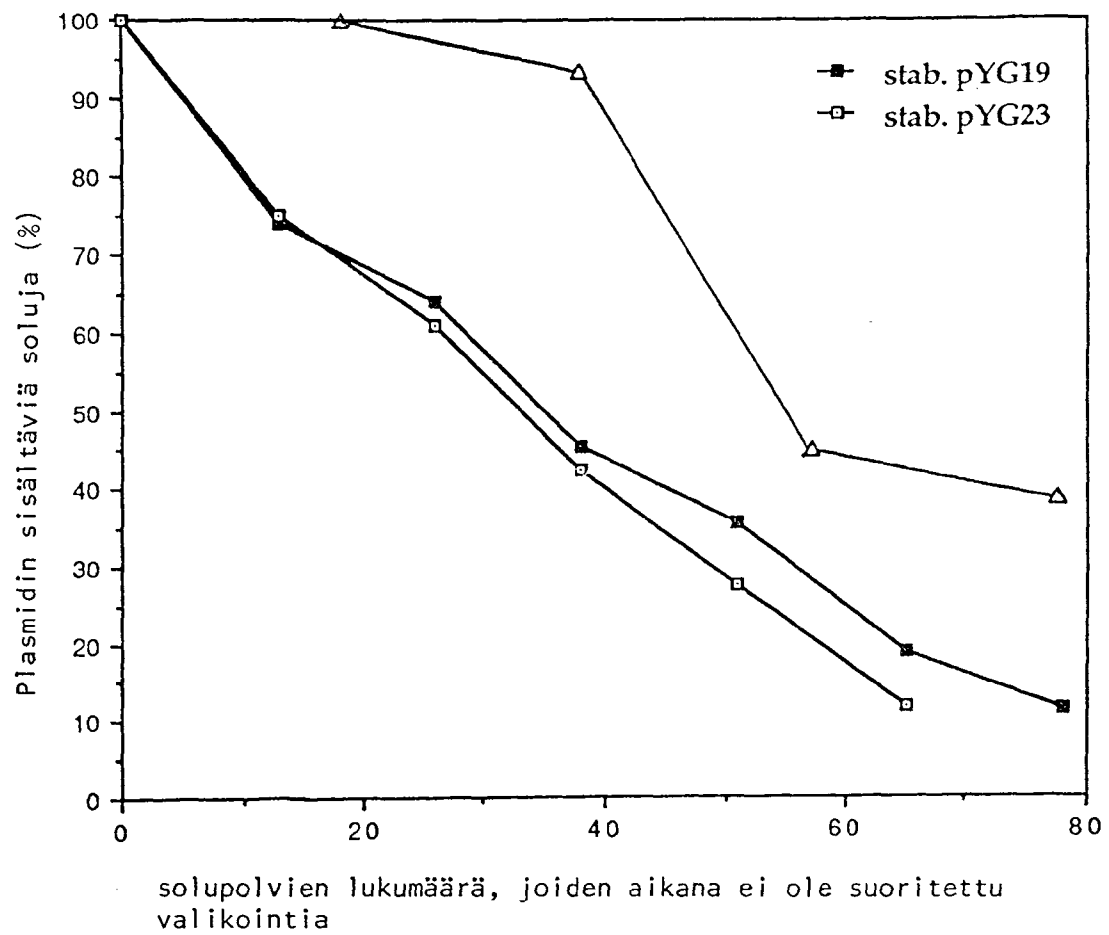
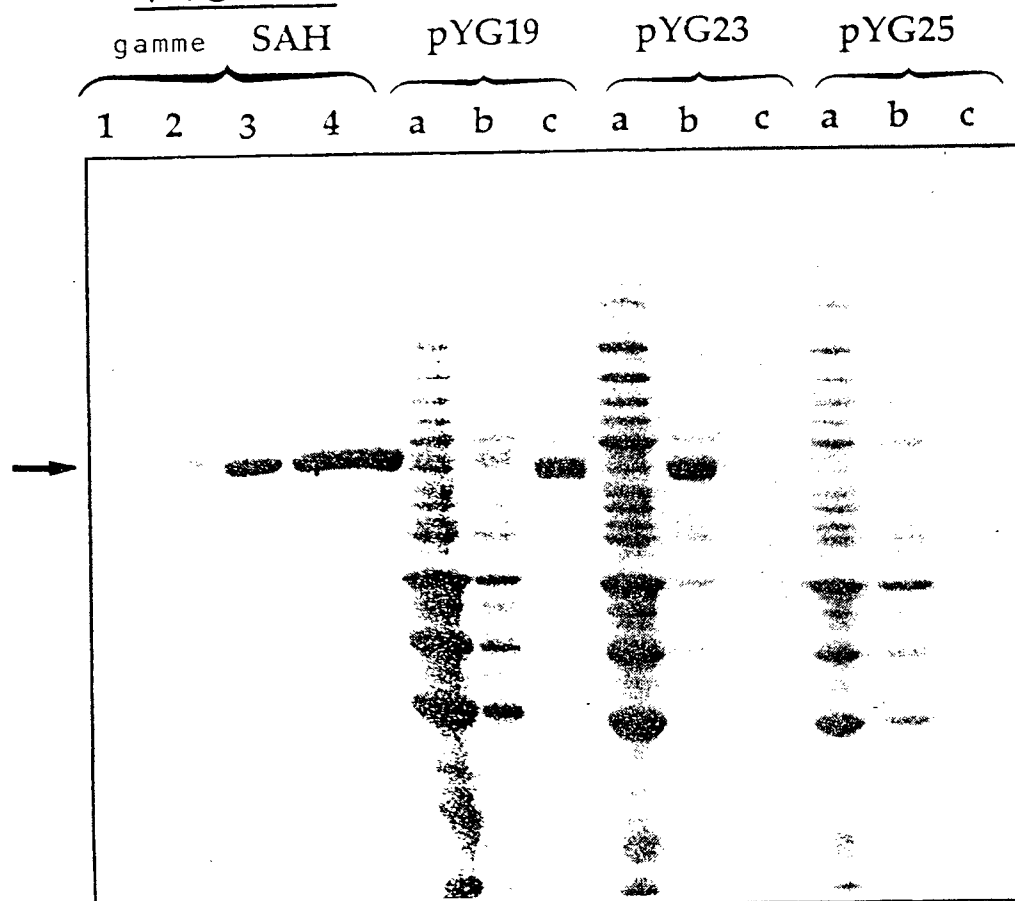
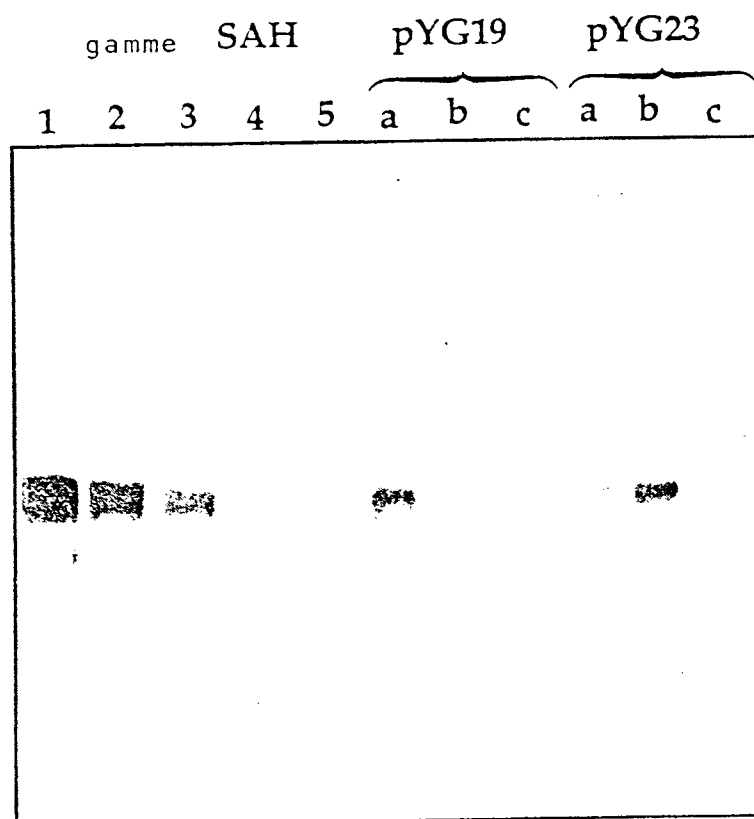


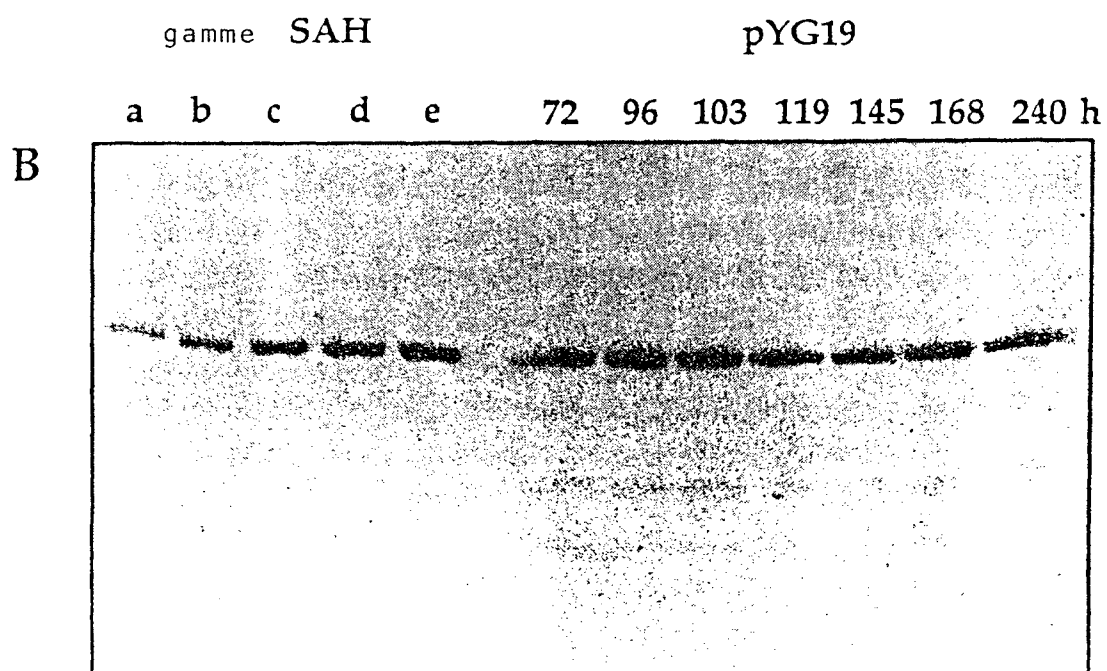
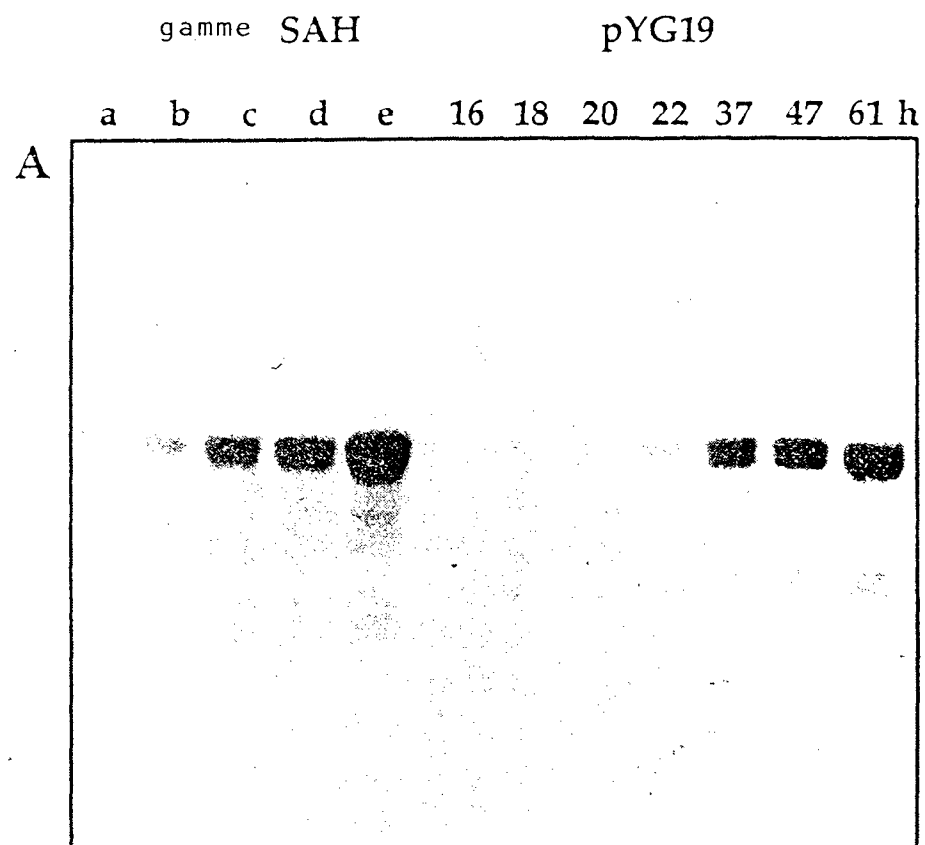
FIG. 28

FIG_29



FIG_30





FIG_31

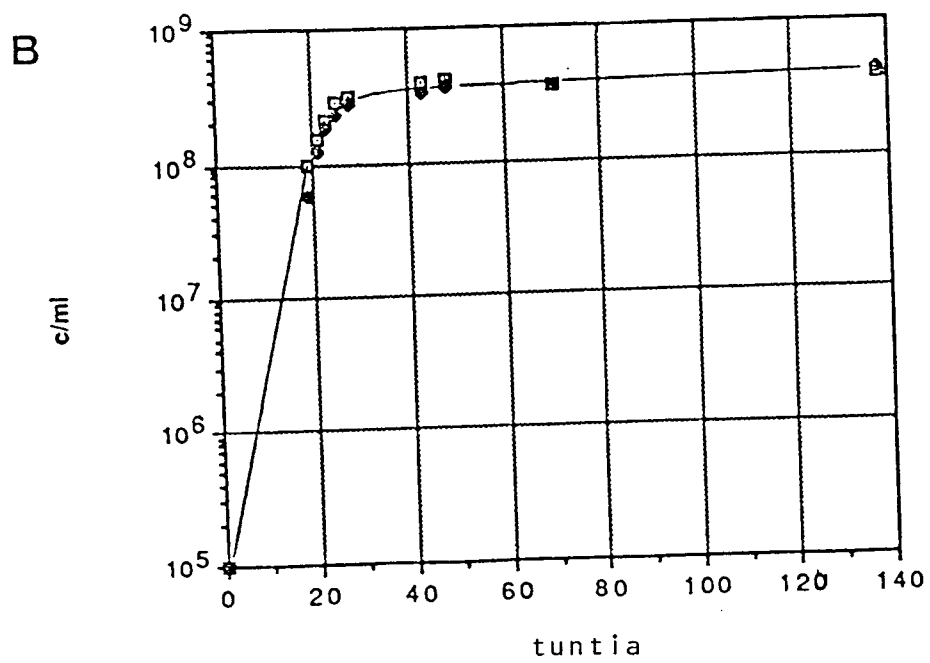
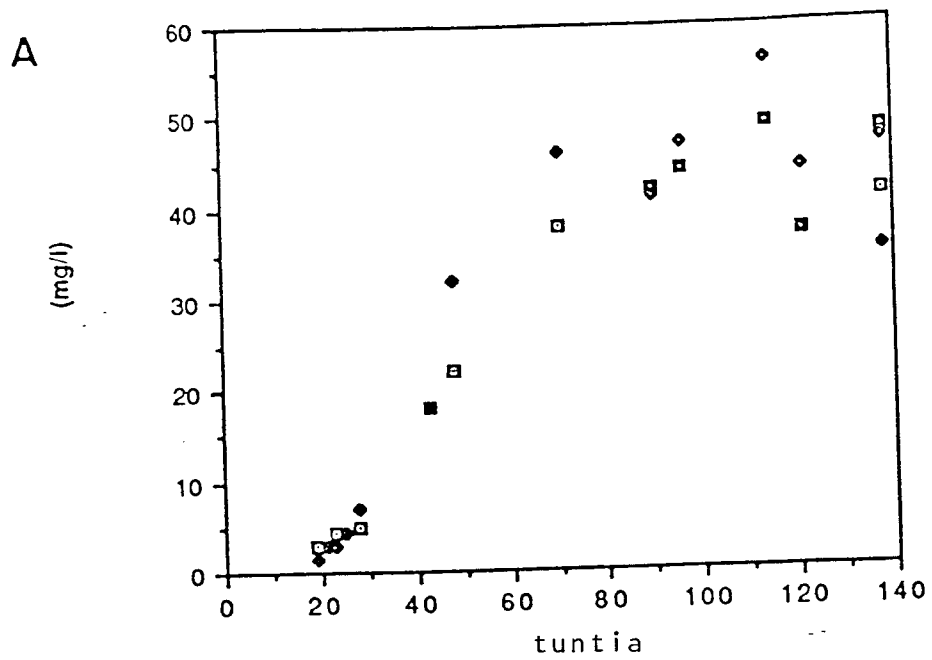
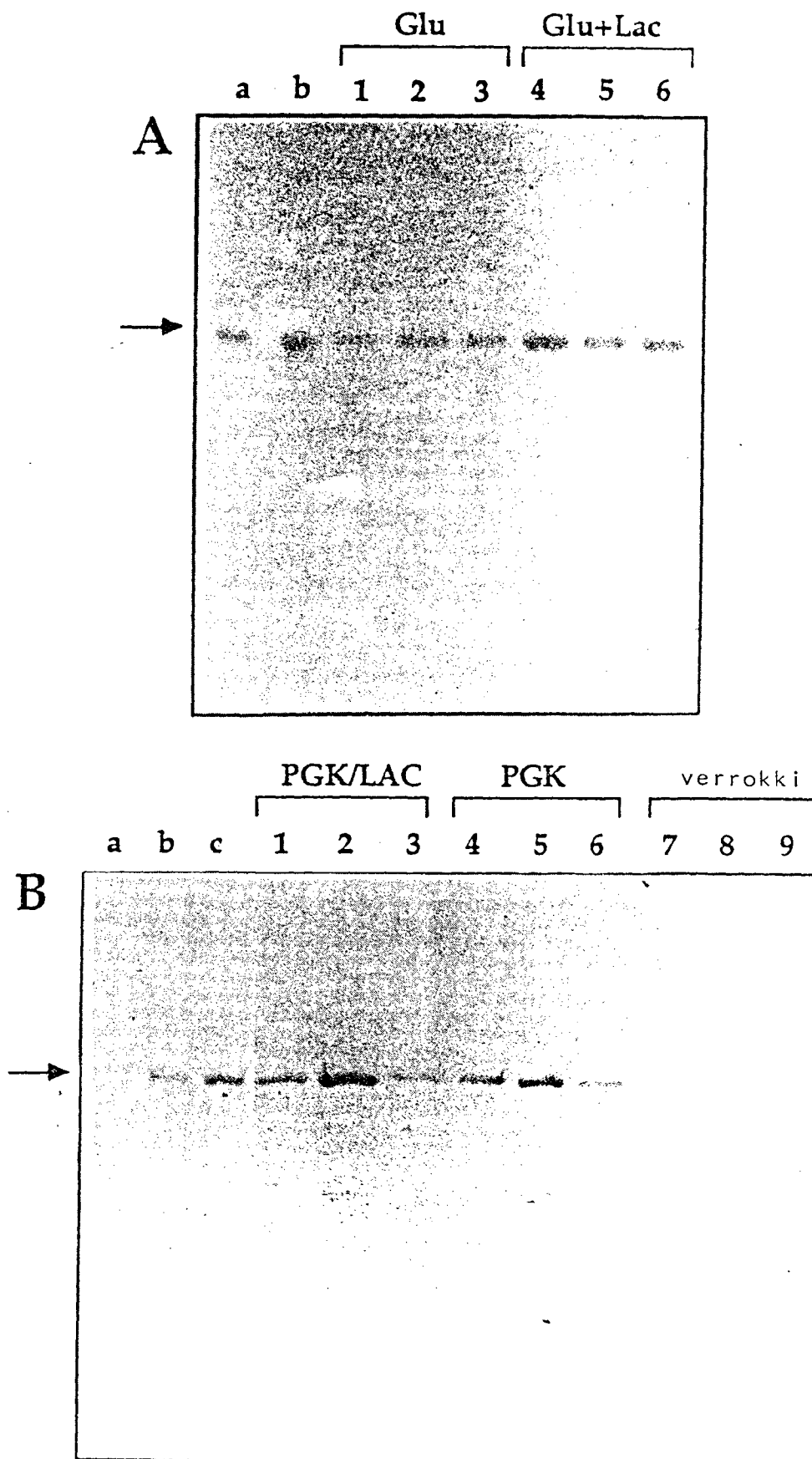
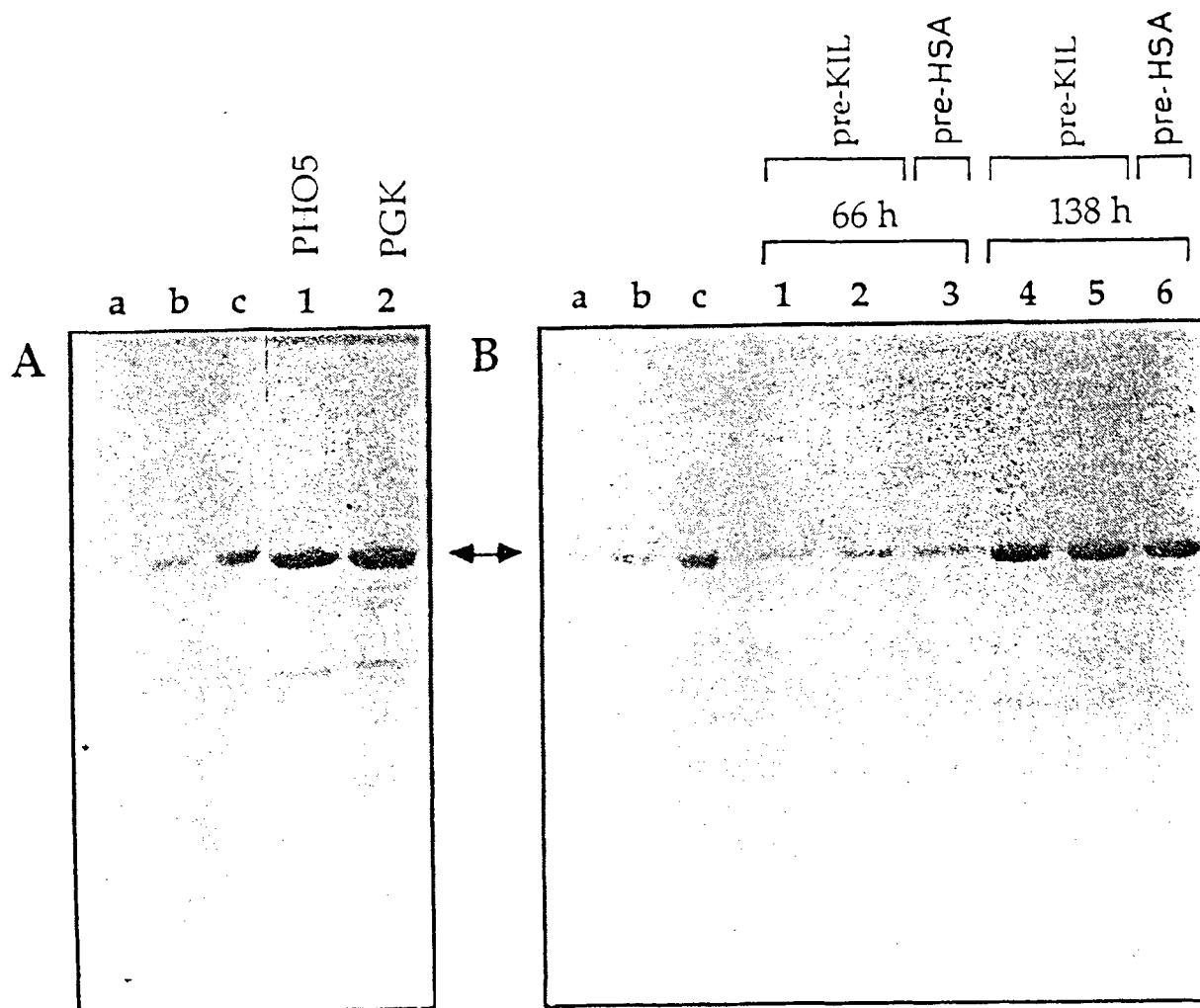


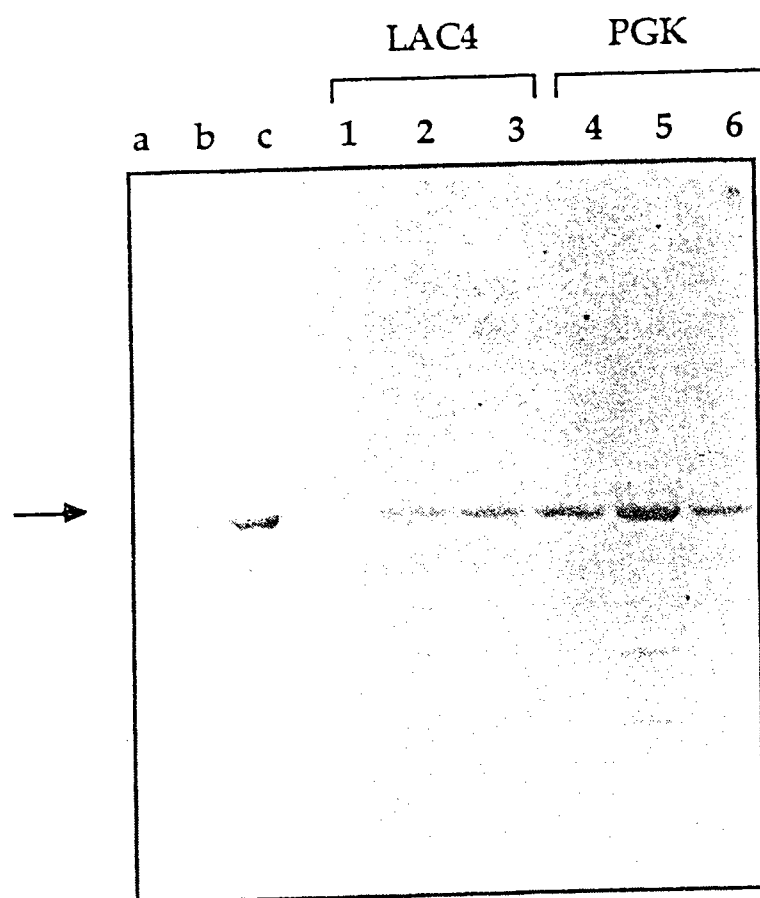
FIG. 32



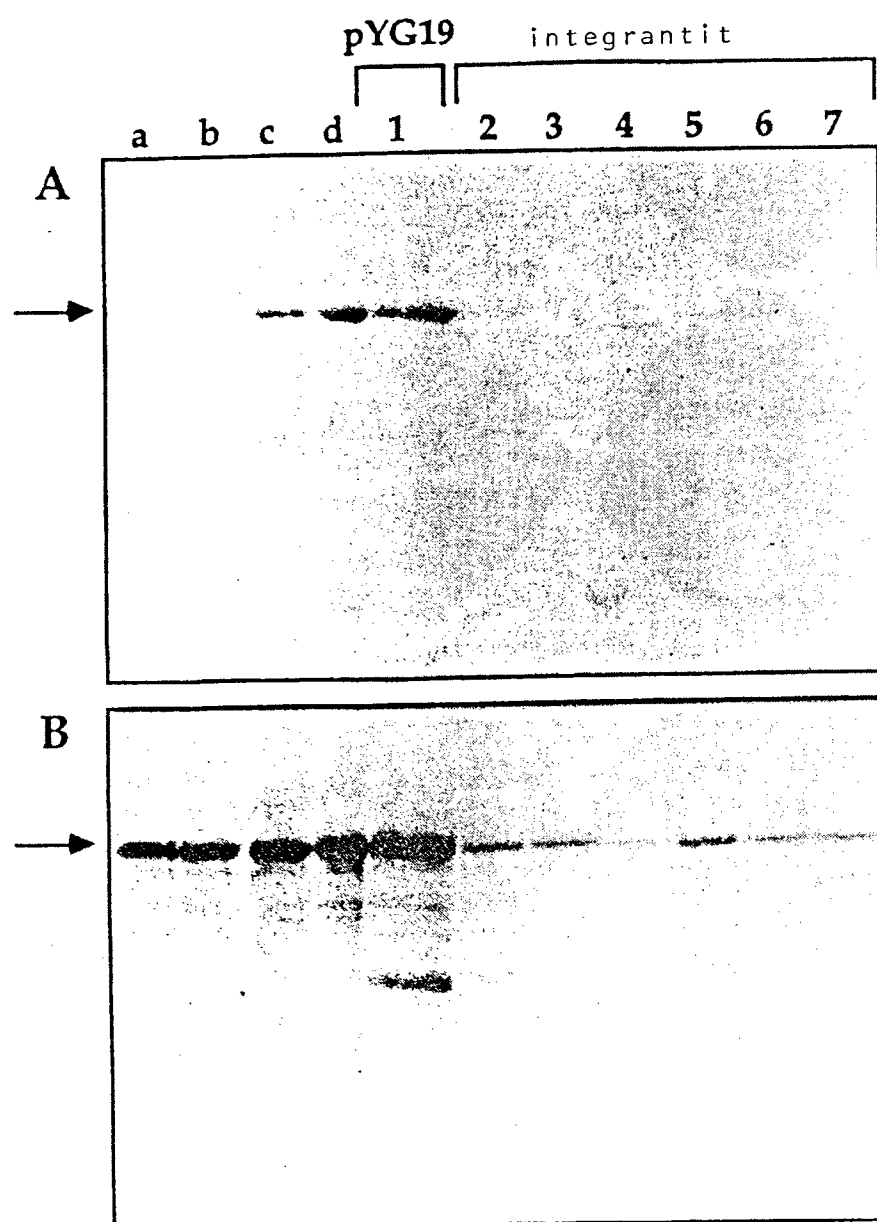
FIG_33



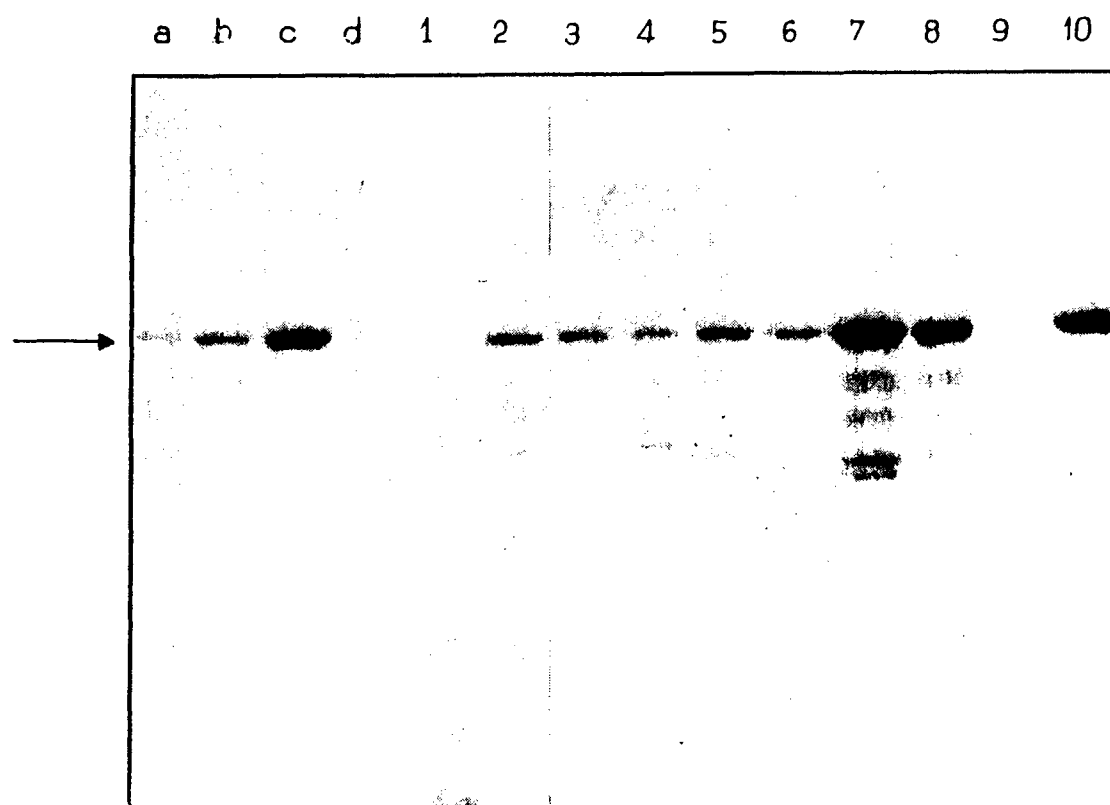
FIG_34



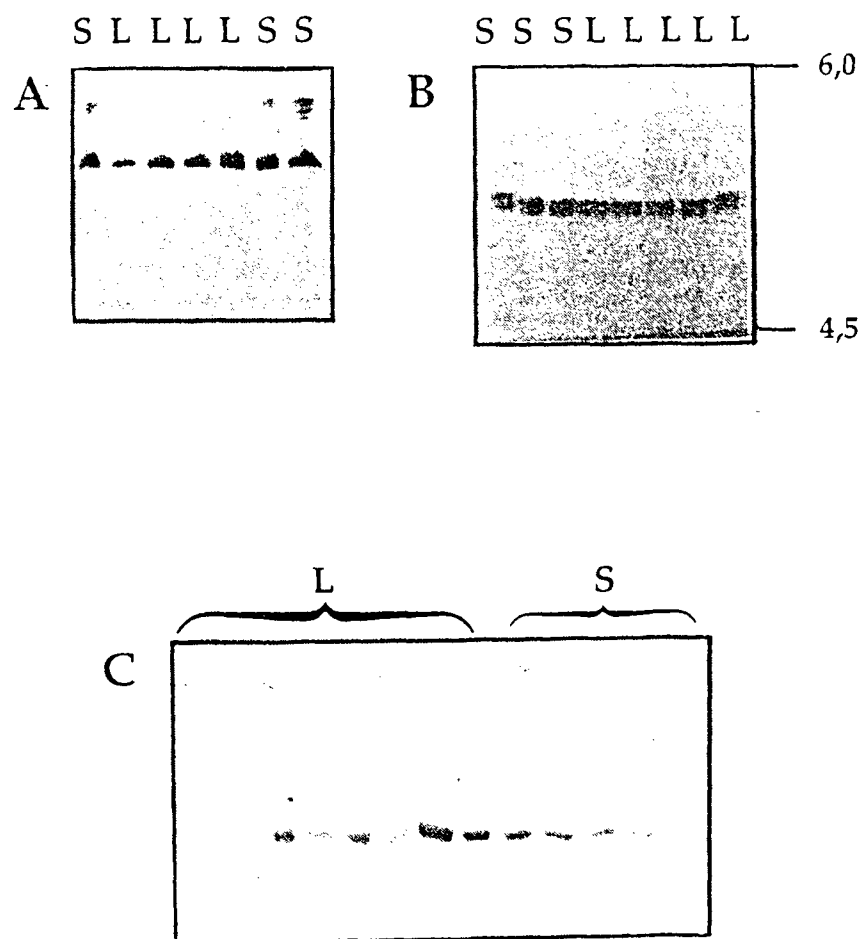
FIG_35



FIG_36



FIG_37



FIG_38

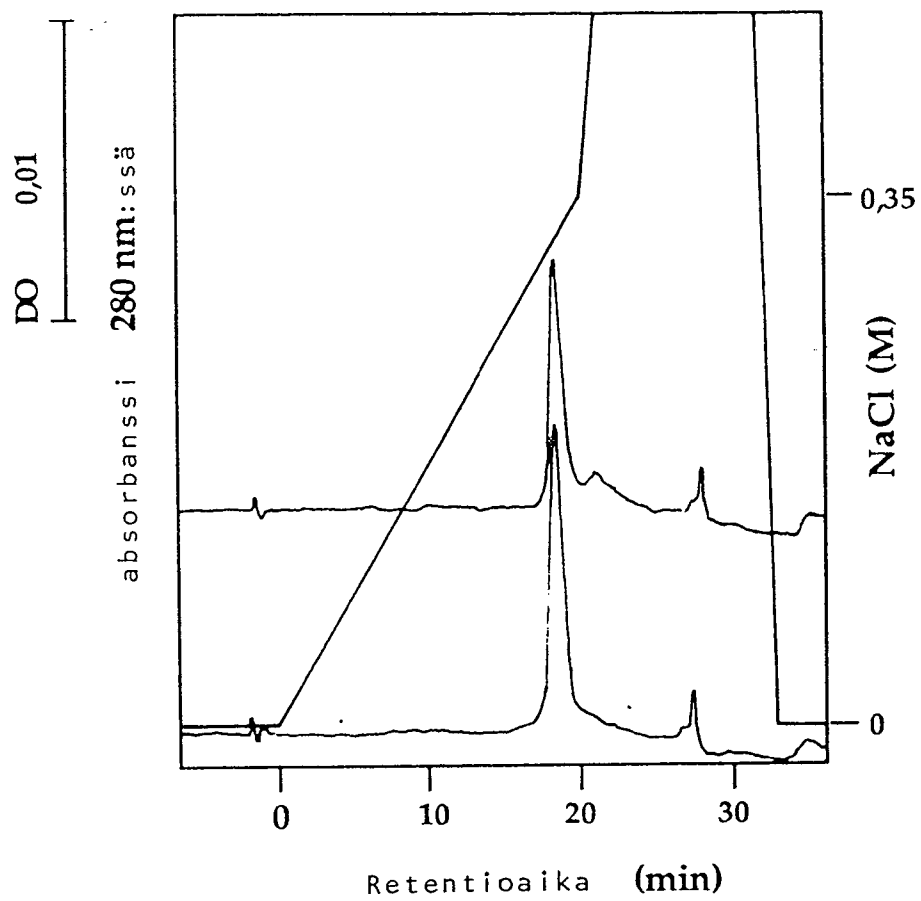


FIG.39

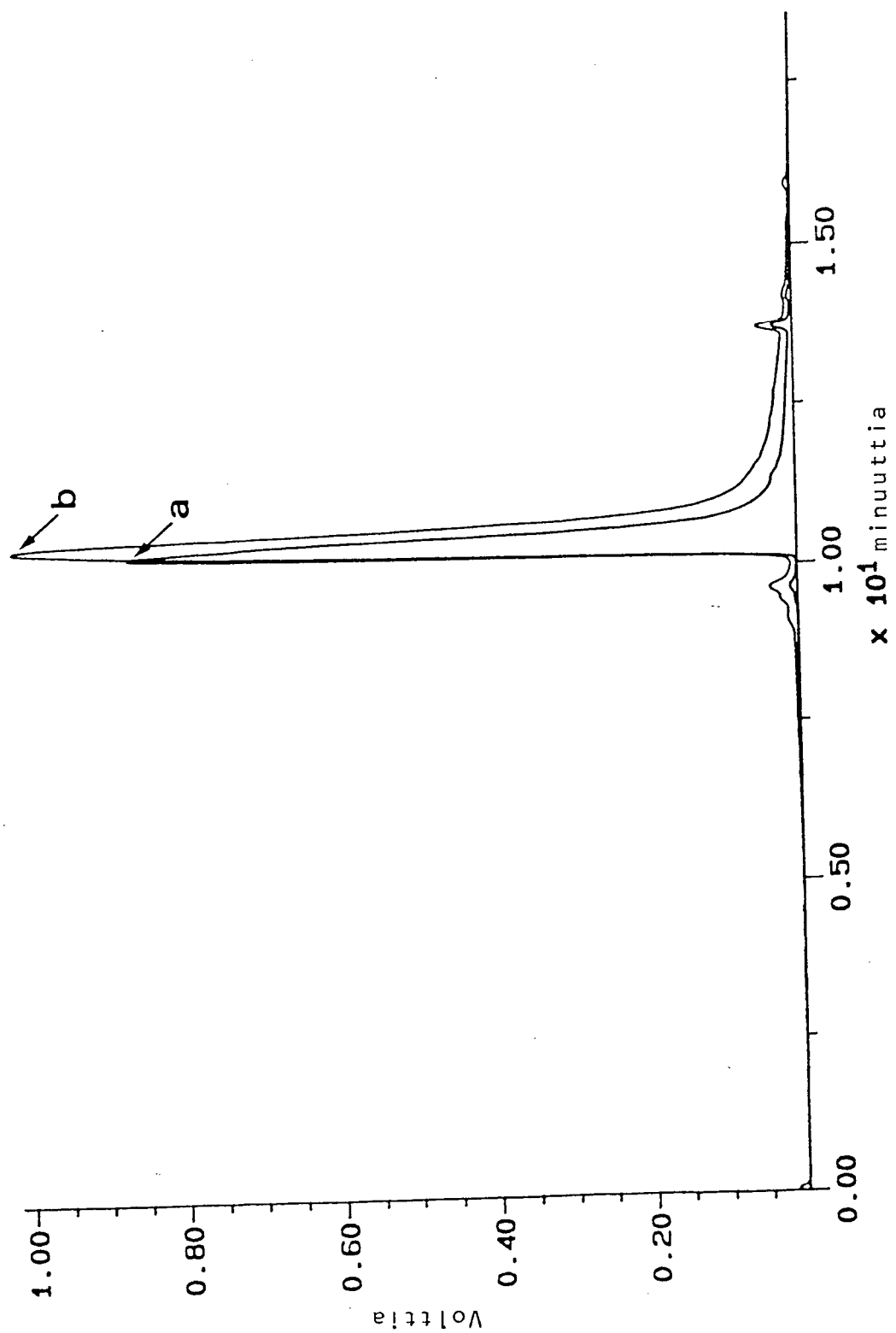
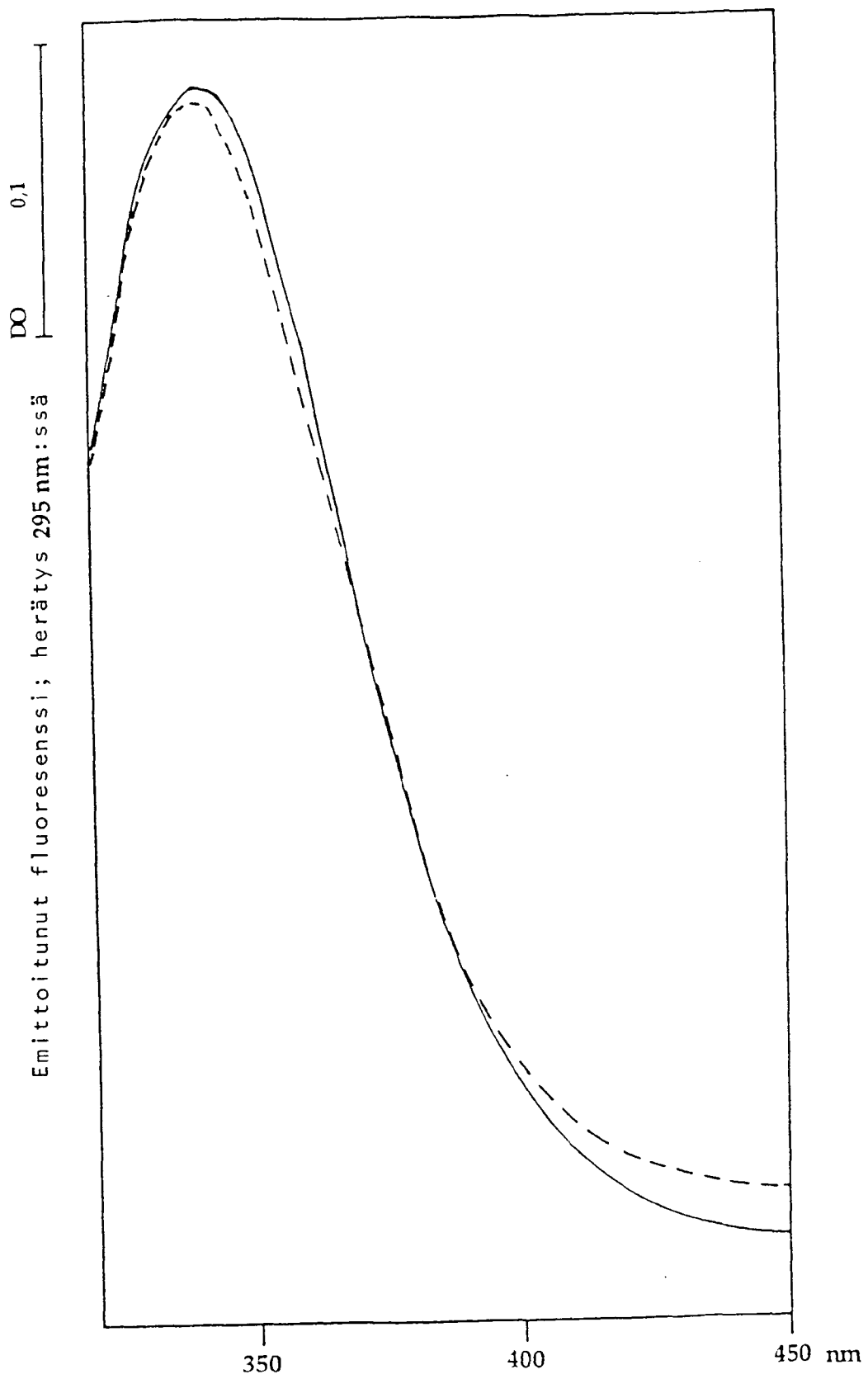


FIG.40



FIG_41

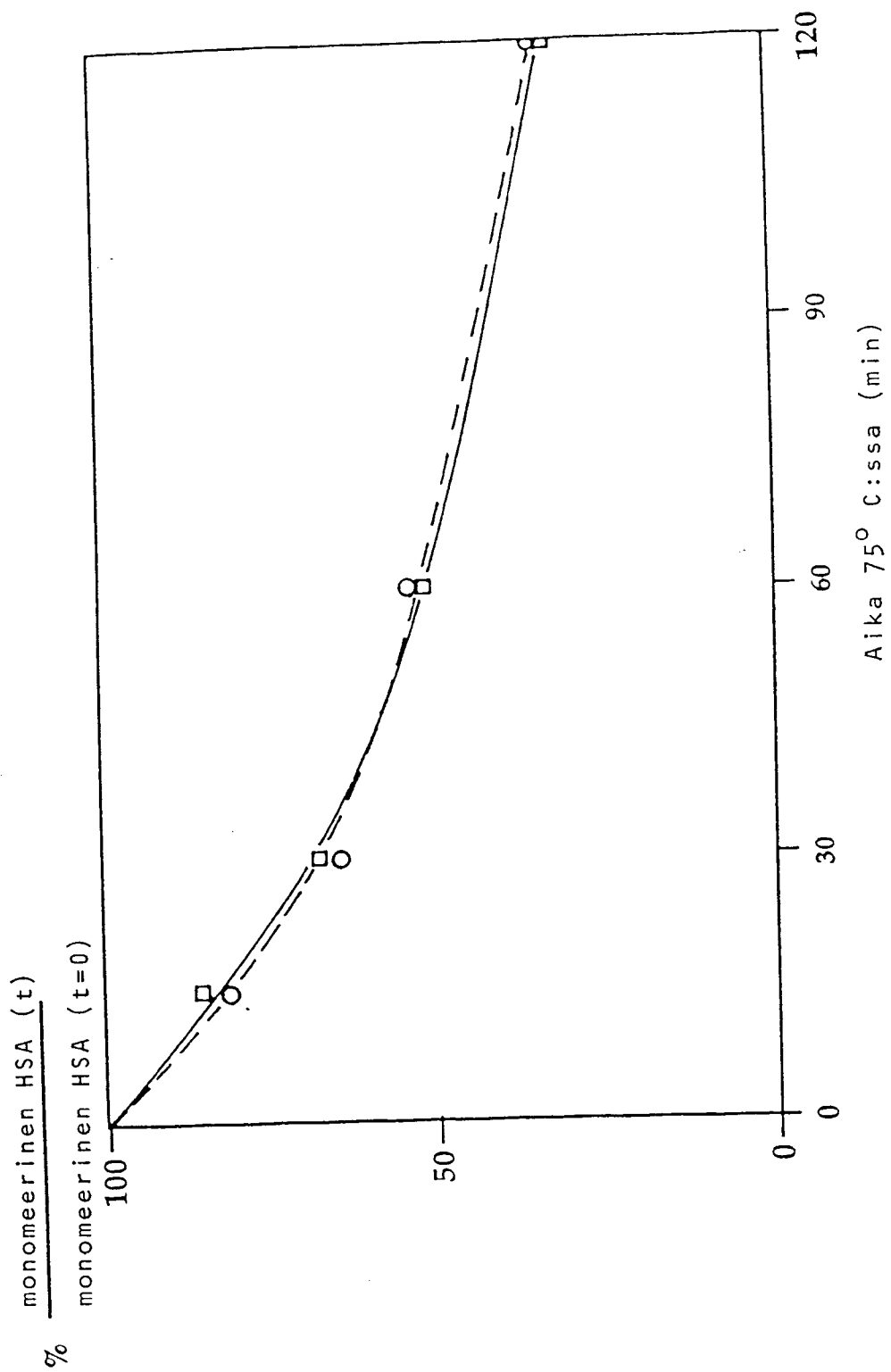


FIG.42

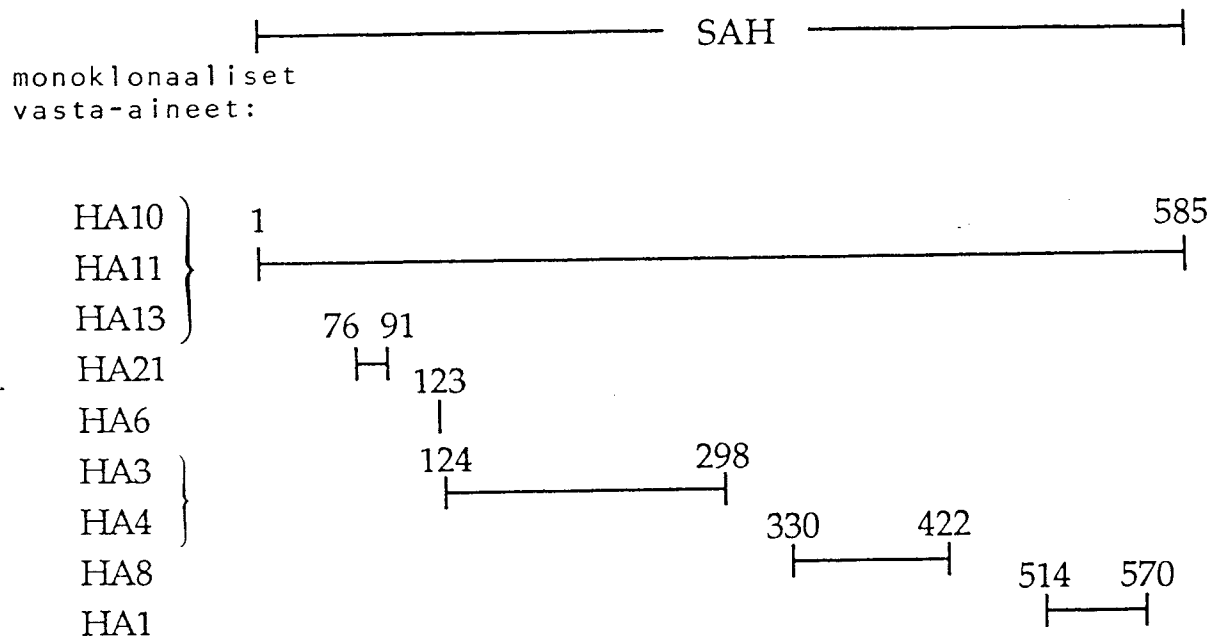
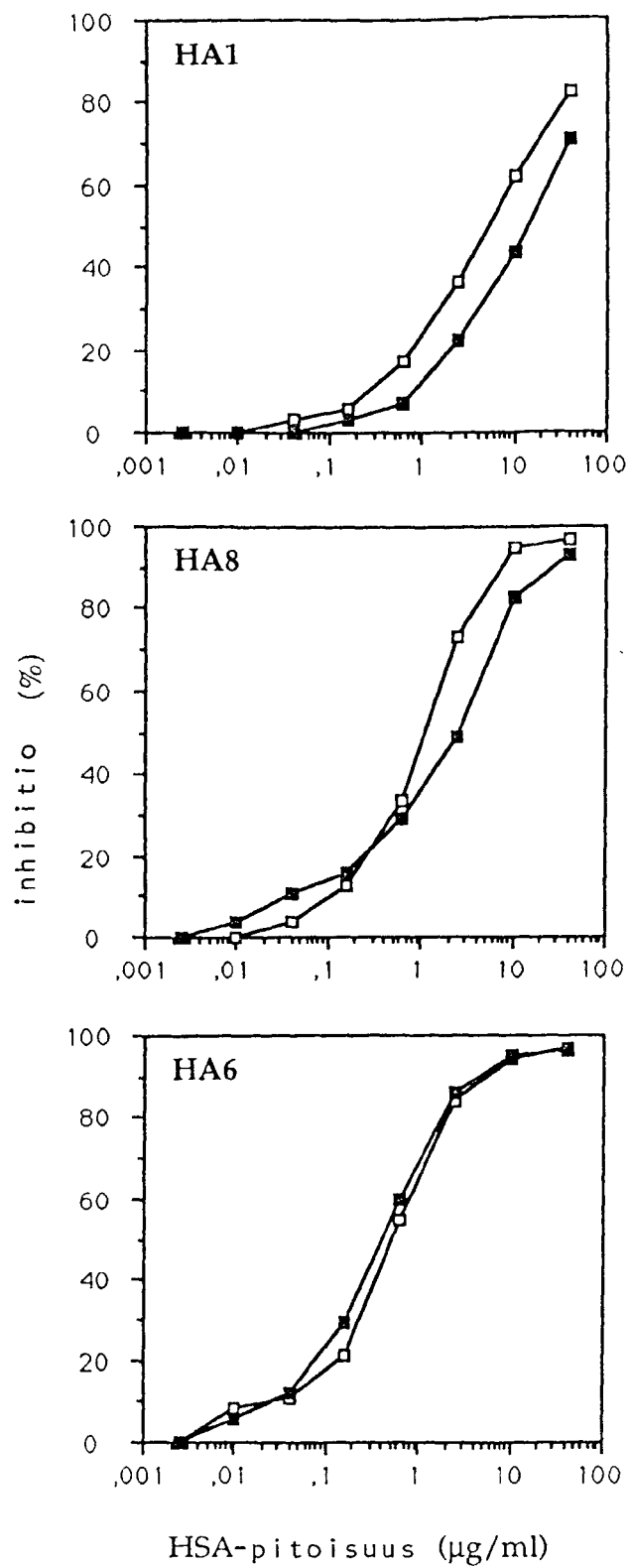
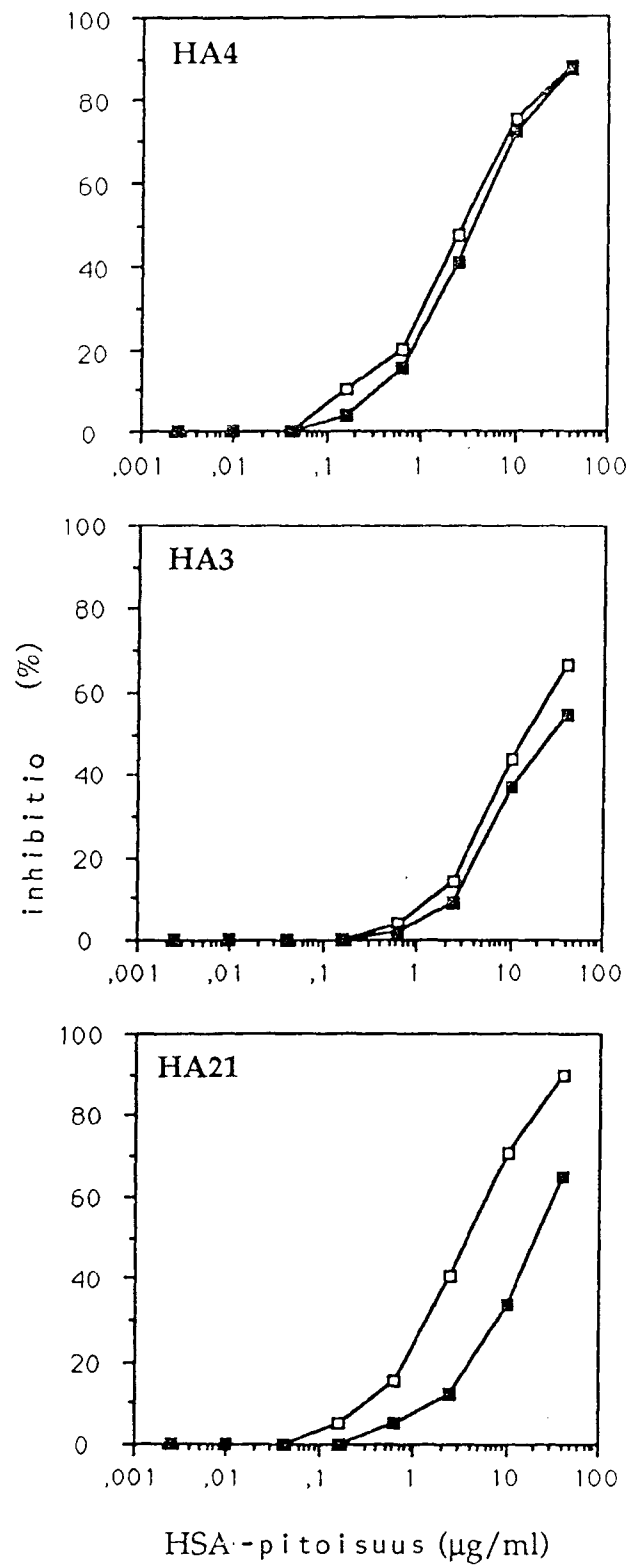


FIG.43

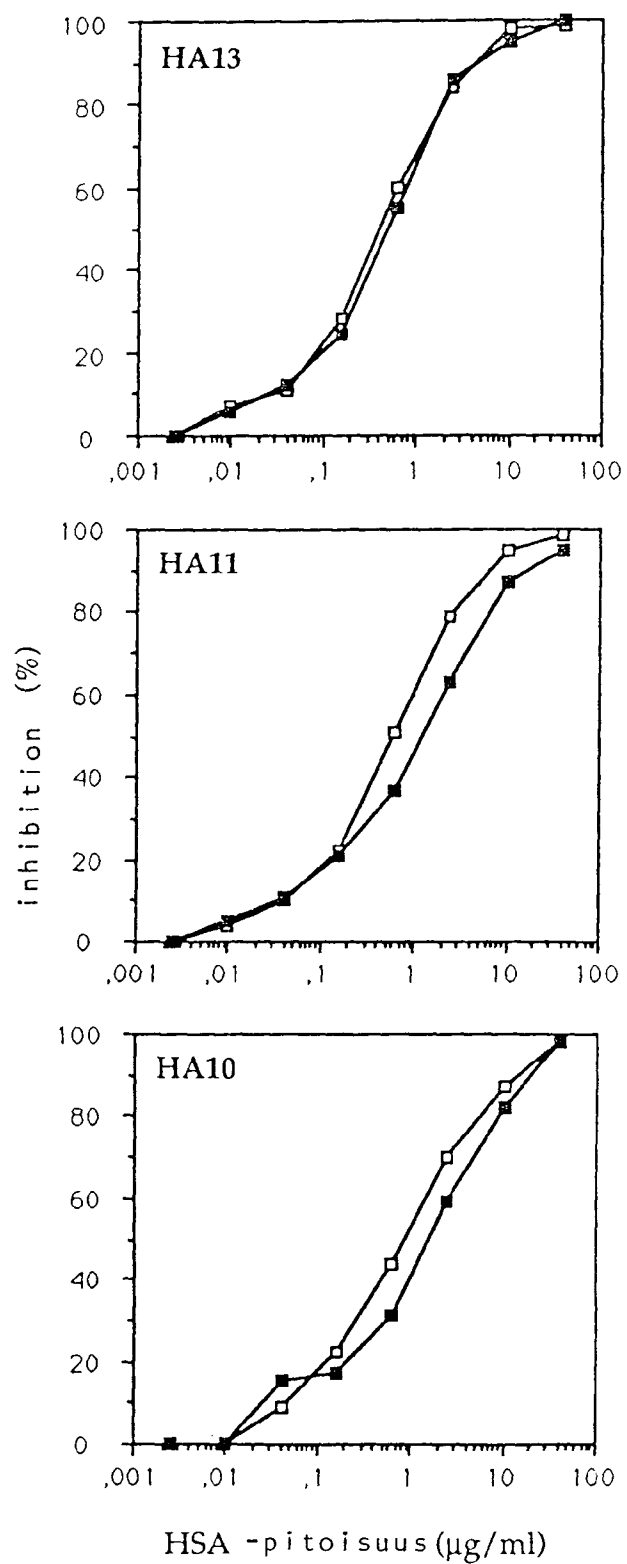


FIG_44A



HSA-pitoisuus (µg/ml)

FIG_44B



FIG_44C

(EcoRI[®]) Met Asn Ile Phe Tyr Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Phe Val Gln Gly Lys Arg

AATT ATG AAT ATA TTT TAC ATA TTT TTG TTT TTG CTG TCA TTC GTT CAA GGT AAA AG
TAC TTA TAT AAA ATG TAT AAA AAC AAA AAC GAC AGT AAG CAA GTT CCA TTT TCT TAA

EcoRI

Synteettinen EcoRI-fragmentti, joka koodaa tappajatoksiinin erityssignaalia

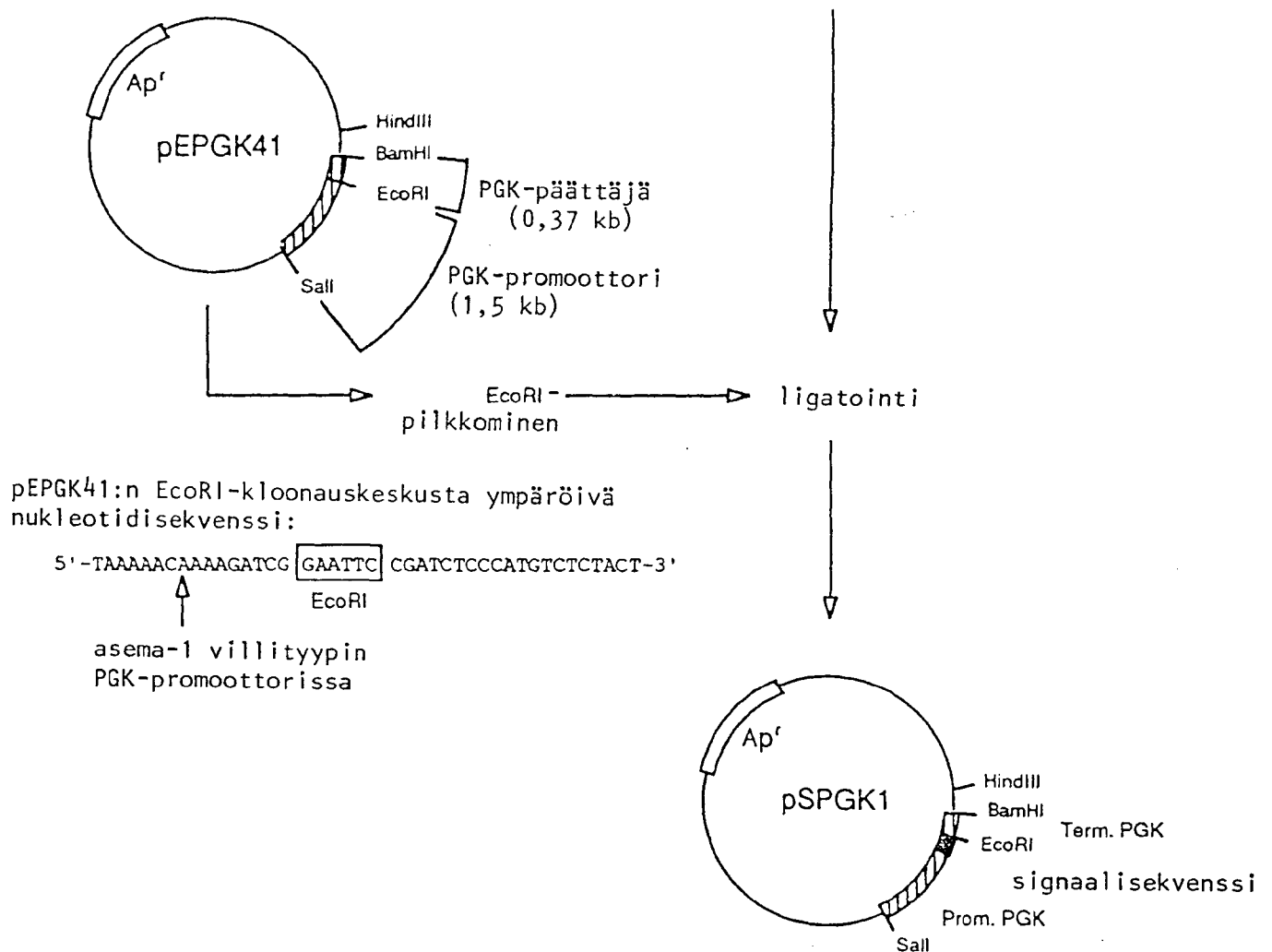
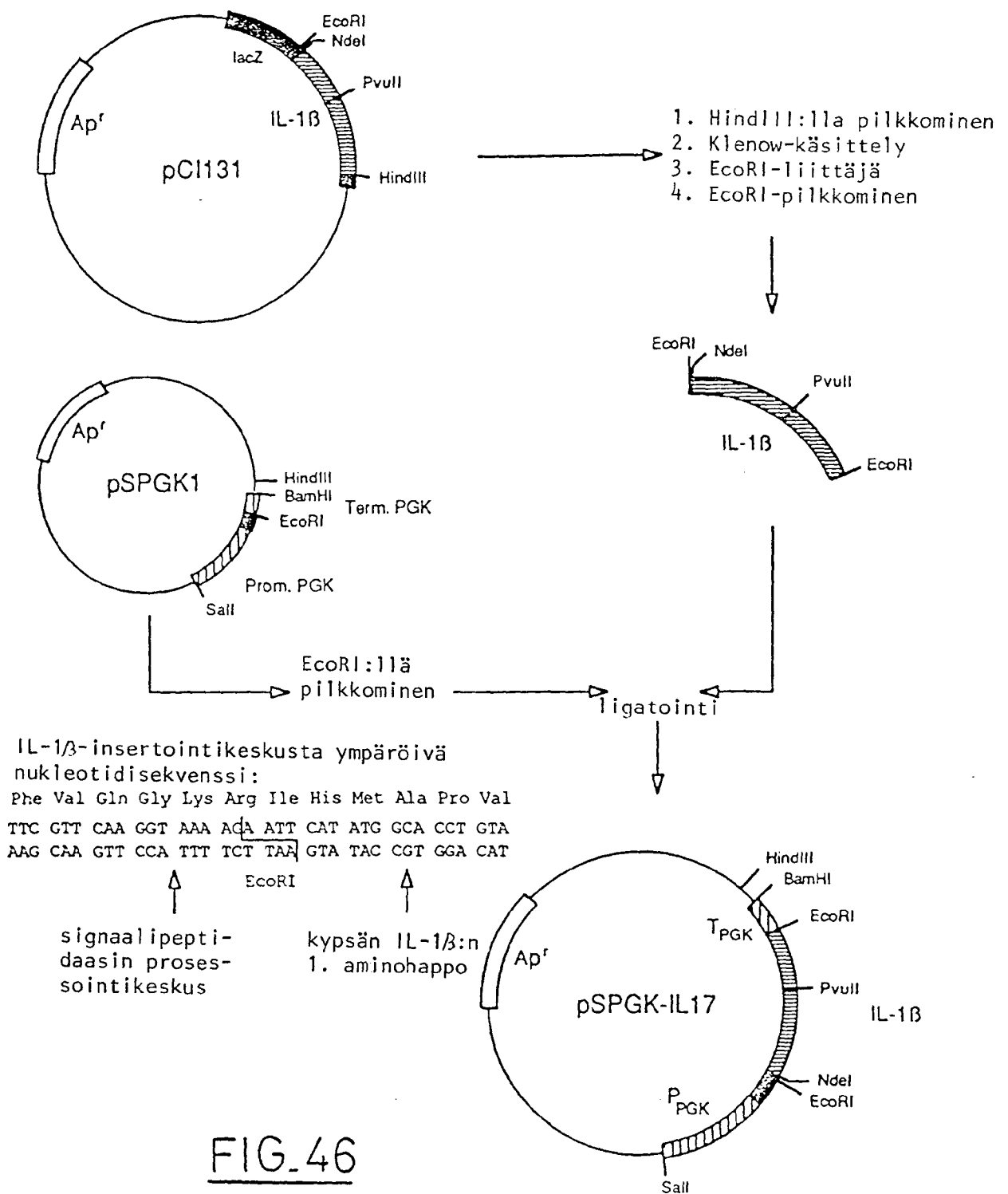
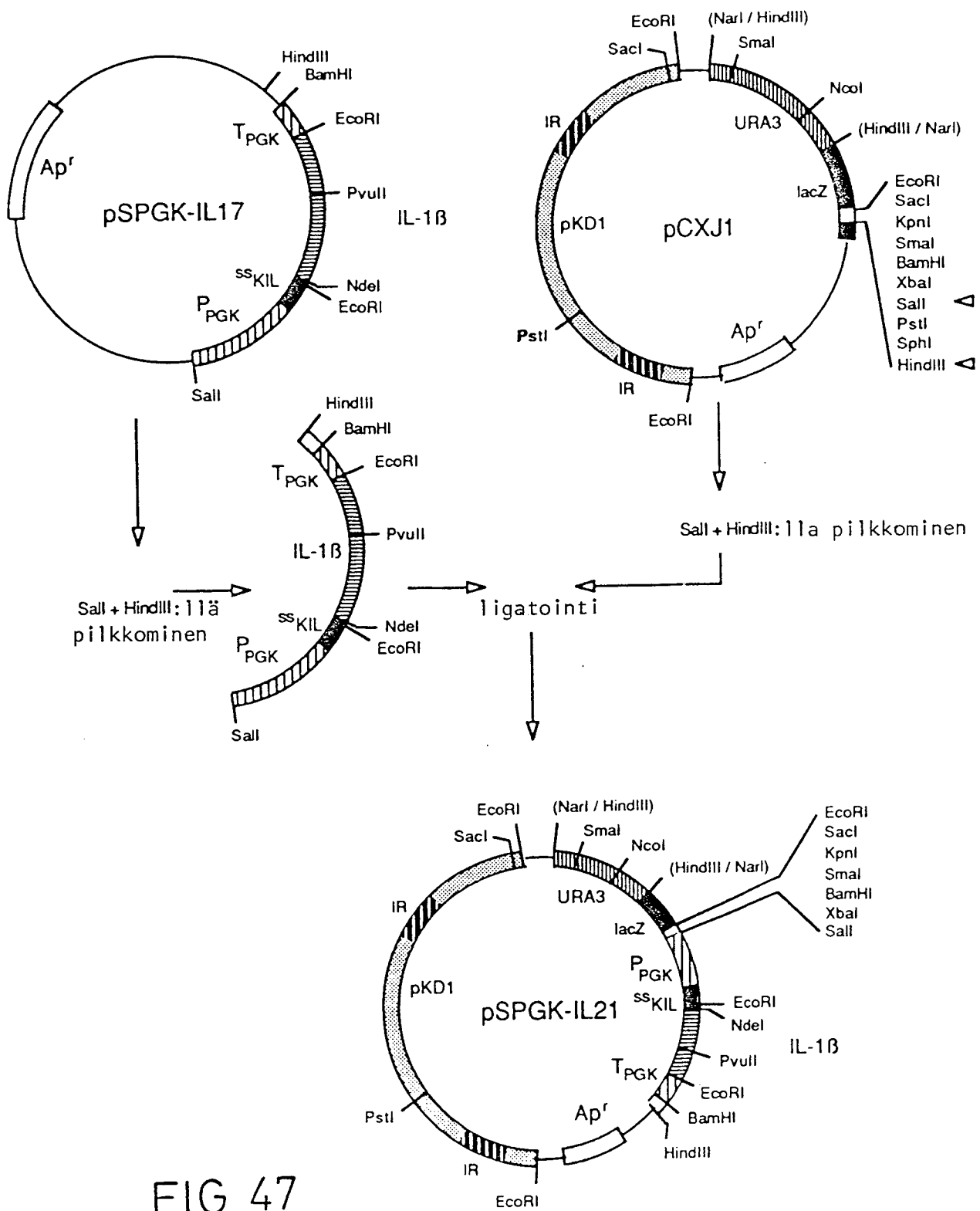


FIG. 45





FIG_47

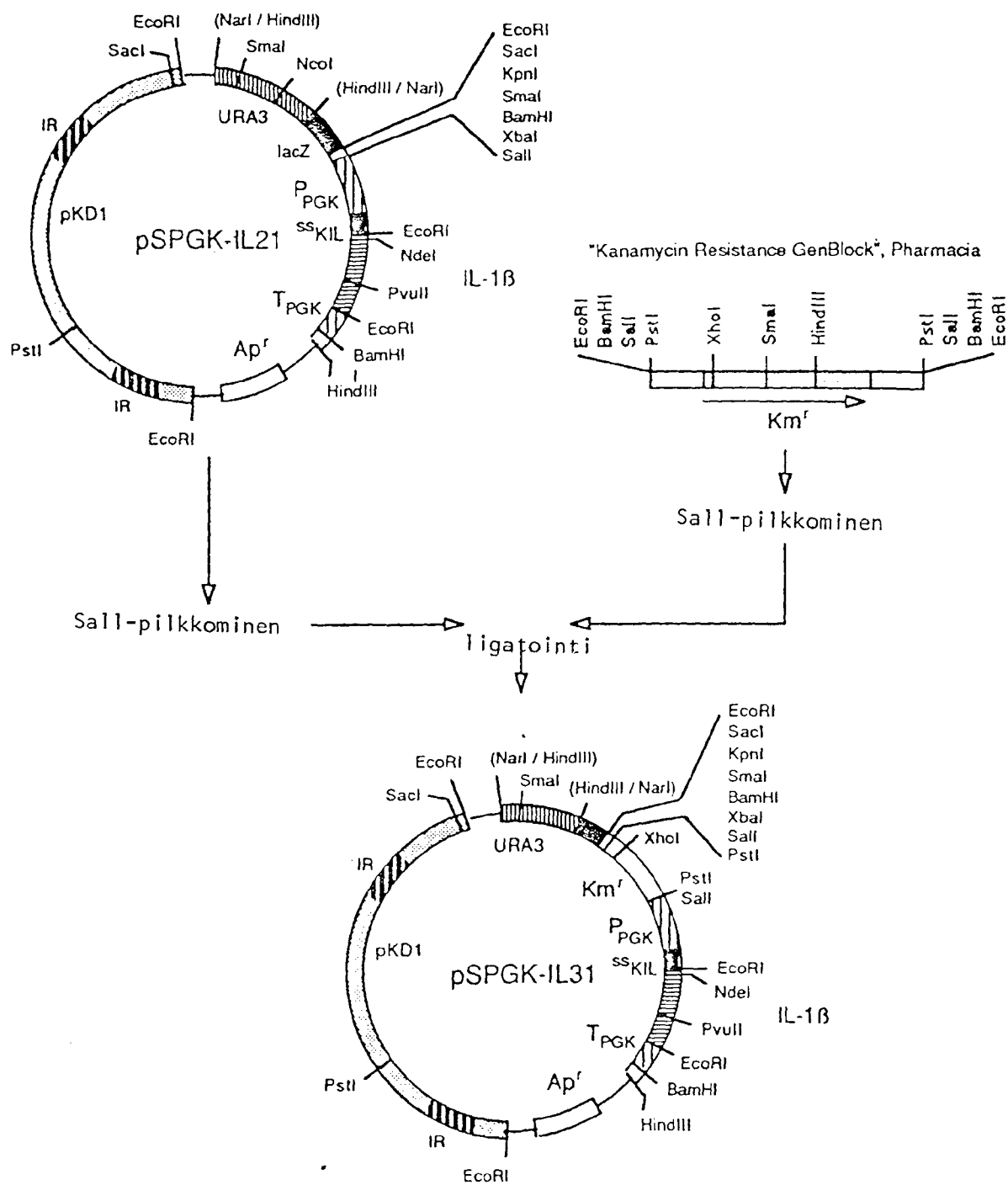


FIG. 48

(EcoRI^o) Met Asn Ile Phe Tyr Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Phe Val Gln Gly Lys Arg

AATT ATG AAT ATA TTT TAC ATA TTT TTG TTT TTG CTG TCA TTC GTT CAA GGT AAA AG

TAC TTA TAT AAA ATG TAT AAA AAC AAA AAC GAC AGT AAG CAA GTT CCA TTT TCT TAA

EcoRI

synteettinen EcoRI-fragmentti, joka koodaa tappajatoksiinin erityssignaalia

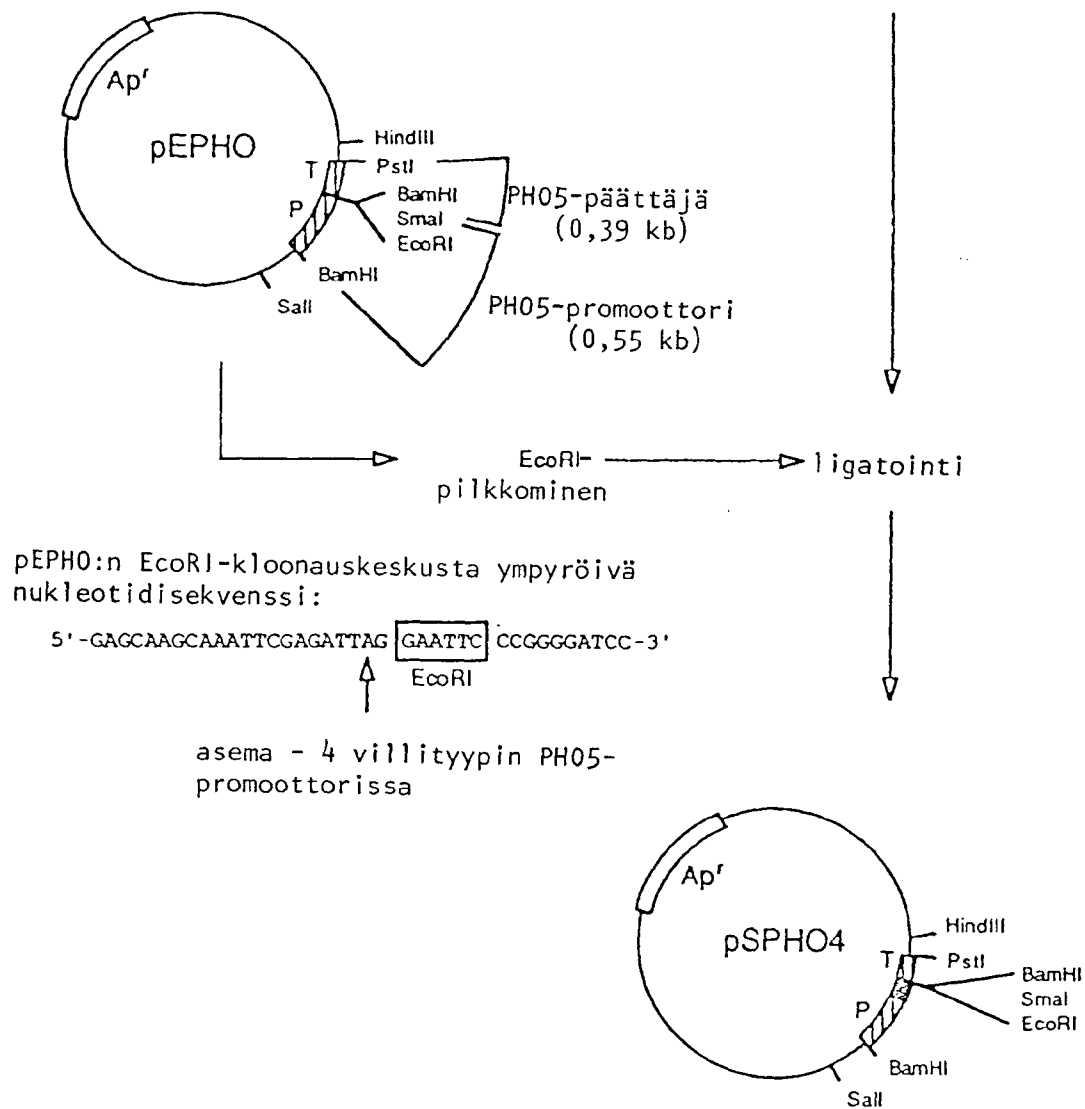


FIG. 49

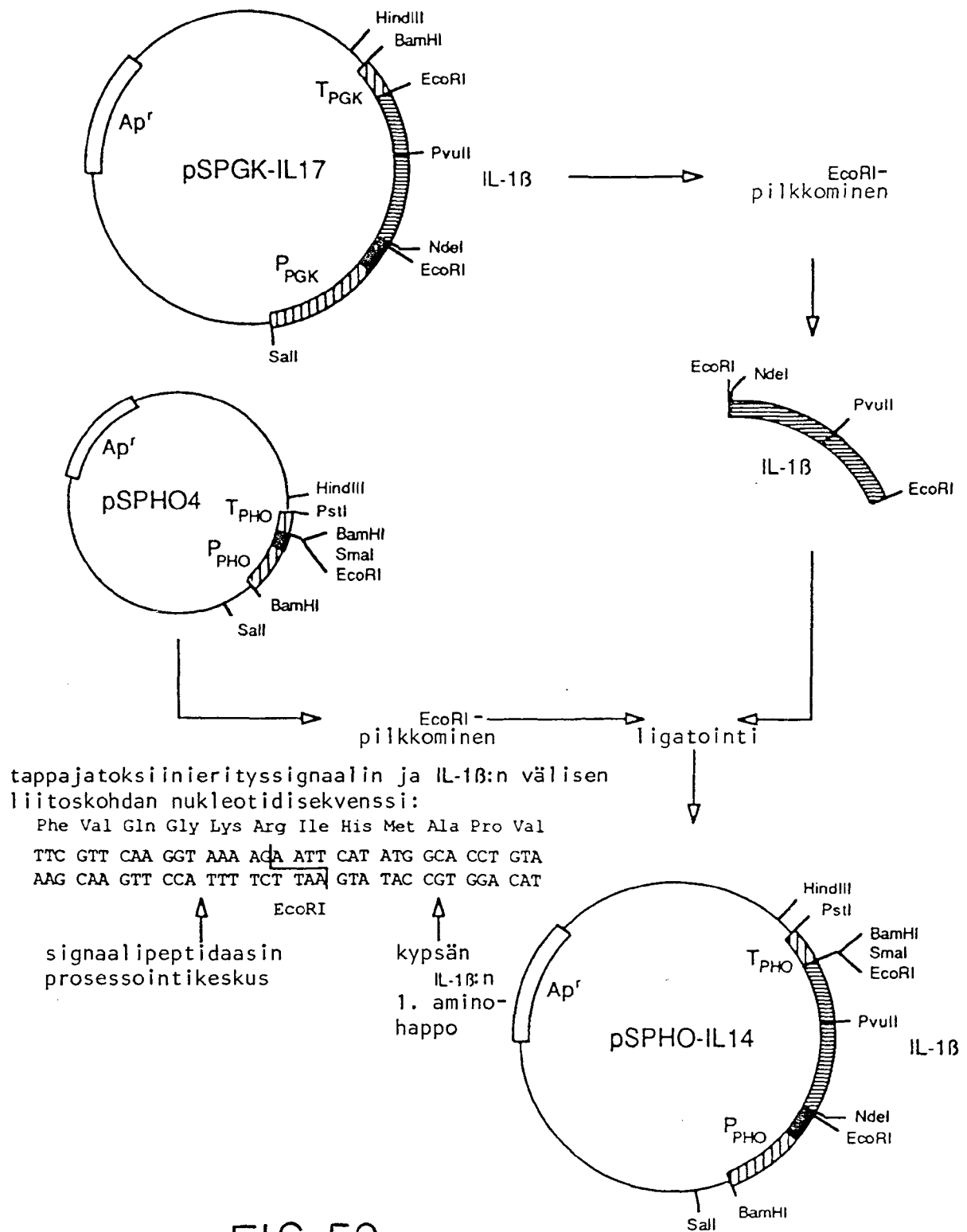


FIG. 50

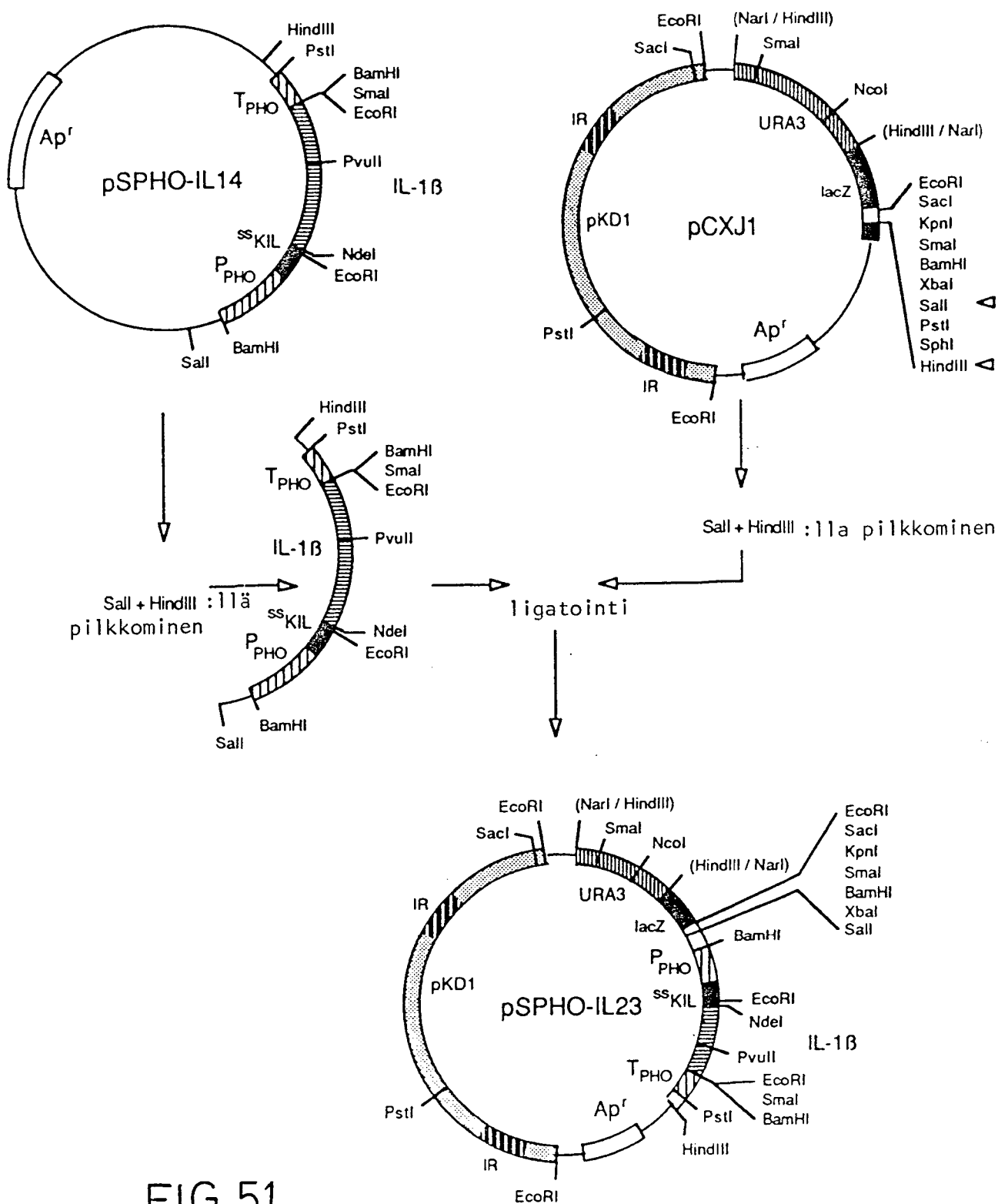


FIG.51

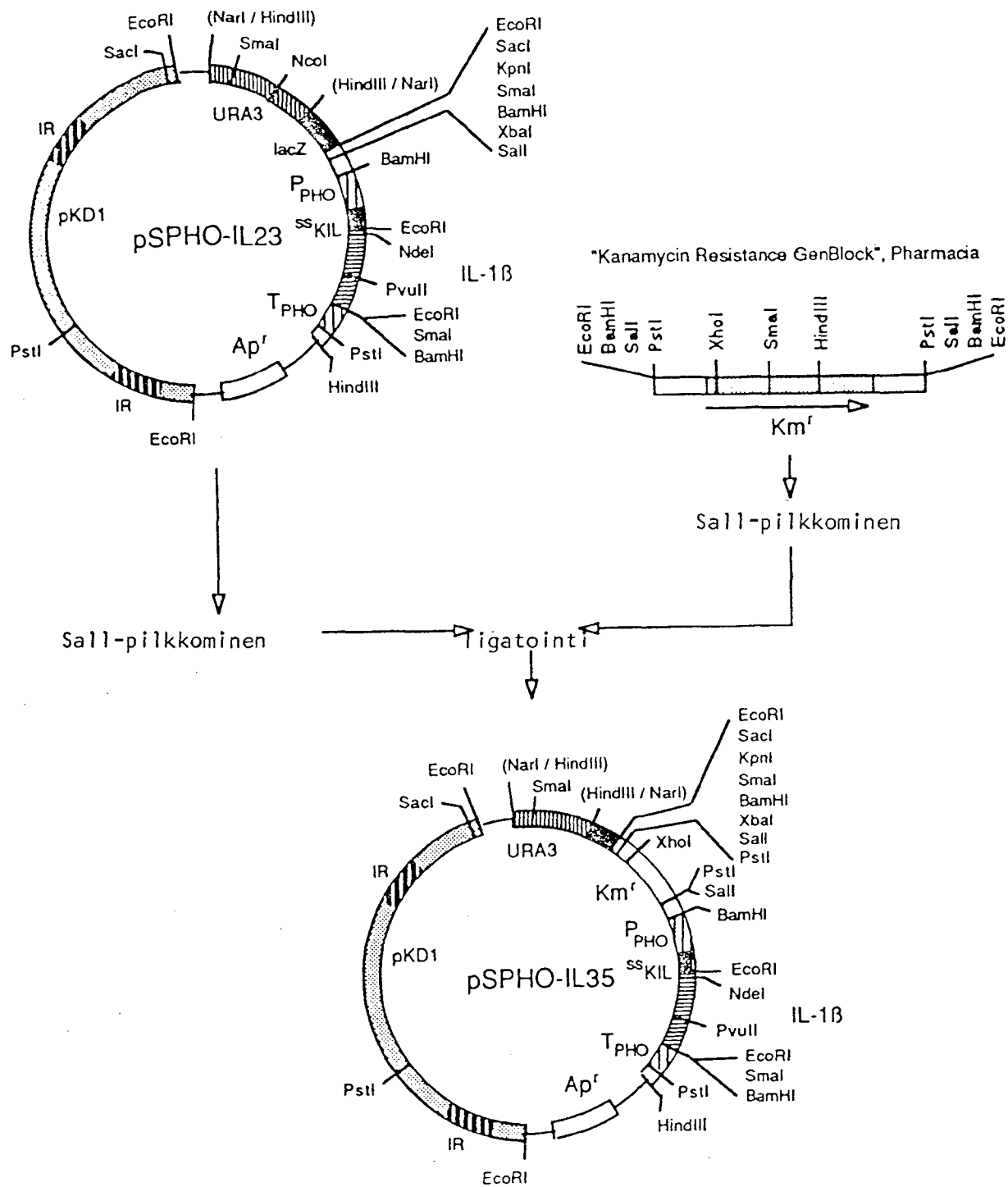
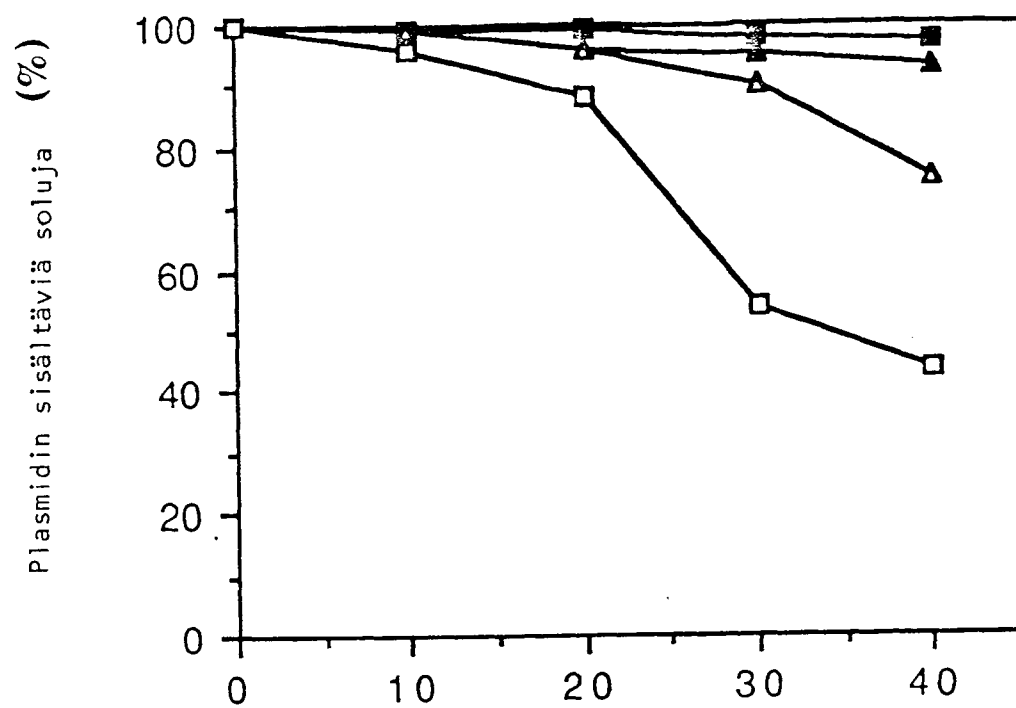
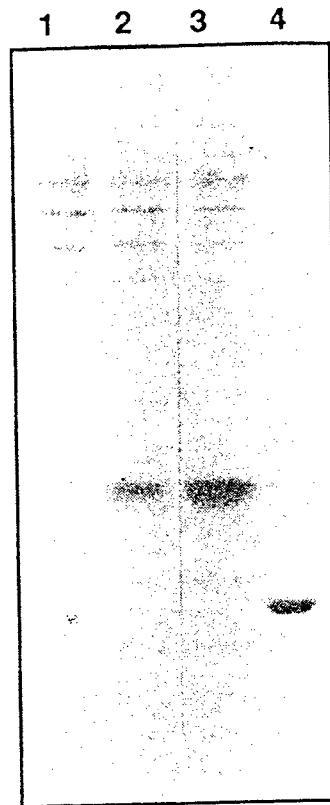


FIG.52



Solupolvien lukumäärä, joiden aikana ei suoritettu valikointia.

FIG.53



FIG_54

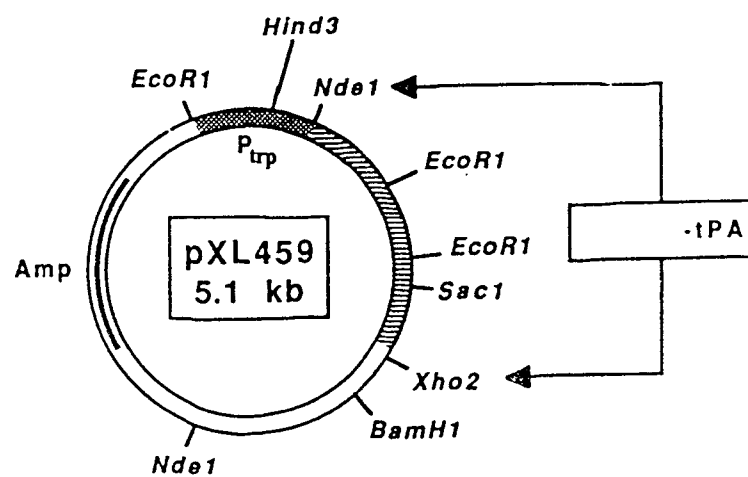
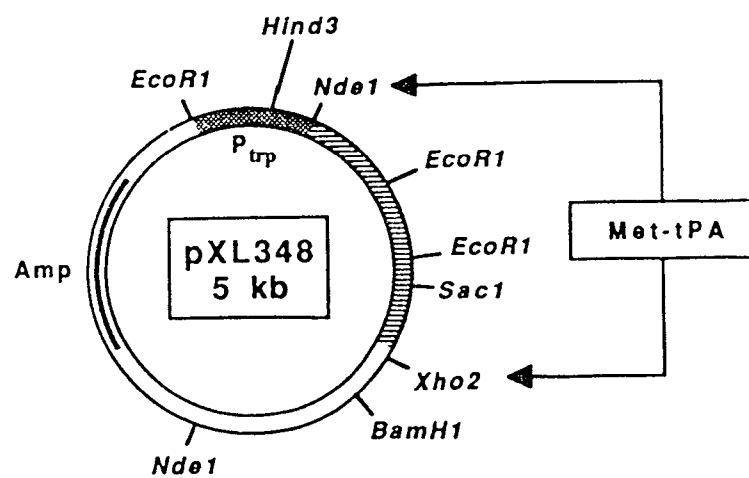
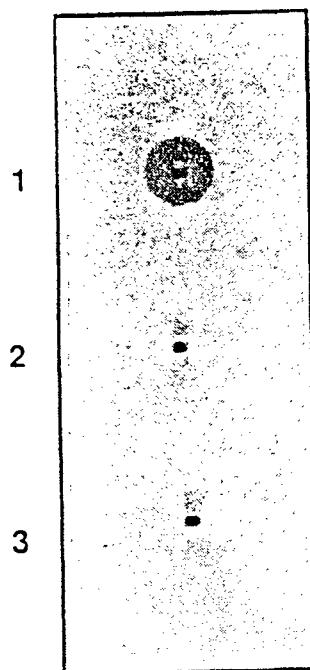
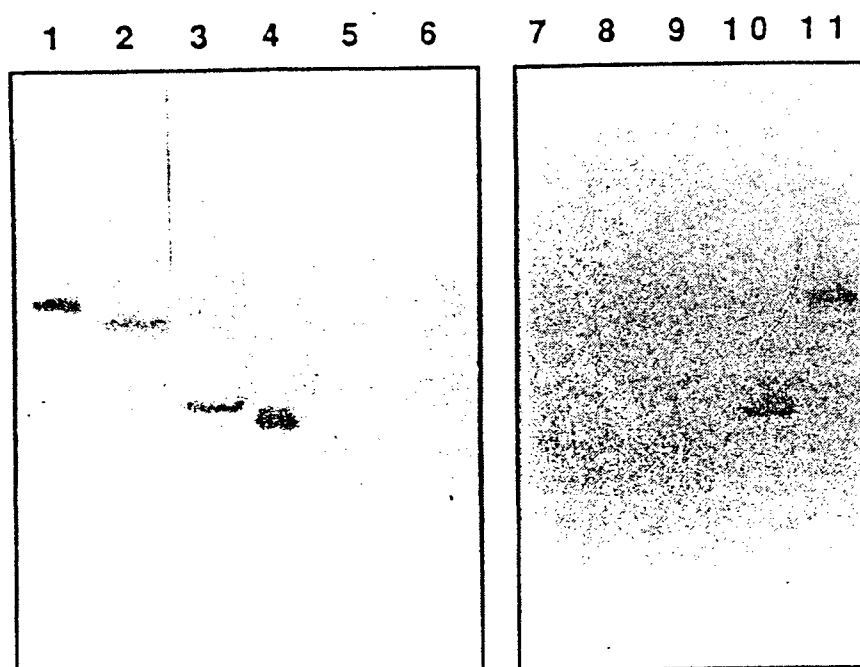


FIG.55



FIG_56



FIG_57

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

FI A 901219 (C12N 15/14)

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP A 241435 (C12 N 15/00)

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

J. Basic Microbiol. vol. 28 (1988) s. 211-220

Current Genetics vol. 12 (1987) p. 185-192

Elias Savel 14/9-99

Allekirjoitus