



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **315330**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

C 12 N 9/62, 15/57, 1/16

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19944181	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	1994.11.02	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	1994.11.02	(30) Prioritet	1993.11.03, EP, 93810764
(41) Alm. tilgj.	1995.05.04		
(45) Meddelt dato	2003.08.18		
(83) Mikroorganisme deponert:	DSM 5747,3917,7016,7017, 7020,8613,8612		

(71) Patenthaver	Novartis AG, Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, CH
(72) Oppfinner	Frank Buxton, CH-4132 Muttenz, CH Gabor Jarai, CH-4104 Oberwil, CH Jacob Visser, NL-6703 CK Wageningen, NL
(74) Fullmektig	Zacco Norway AS, 0106 Oslo

(54) Benevnelse **Isolert DNA-molekyl, hybridvektor omfattende denne, Aspergillusstamme defisient i et A. niger asparaginproteasegen, A. niger protease og en transformert vert samt fremgangsmåter for å fremstille de ulike elementene**

(56) Anførte publikasjoner Barthomeuf C. et al., 1989. Chemical Pharmaceutical Bulletin, vol 37 no.5.
Inoue H. et al., 1991. J Biol. Chem., vol.266, s.19484-19489
WO 9000192, WO 8807076, NO 19931368

(57) Sammendrag

En ny DNA sekvens kodende for en Aspergillus asparagin protease, en Aspergillus Asparagin protease per se og en fremgangsmåte for fremstilling derav er beskrevet. En ny Aspergillus mutant stamme defekt i en protease av asparagin proteinase-type som er nyttig for ekspressjon av heterologt protein og en fremgangsmåte for fremstilling av en slik mutant stamme er også beskrevet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører et isolert DNA-molekyl, en hybrid vektor omfattende denne og fremgangsmåter for å fremstille DNA-molekylet. Videre omfatter oppfinnelsen en Aspergillusstamme defisient i et Aspergillus niger asparagin proteasegen og en fremgangsmåte for å fremstille denne. Videre angår oppfinnelsen en A. niger asparaginprotease og en fremgangsmåte for å fremstille et ønsket polypeptid. Til slutt angår oppfinnelsen en transformert vert og en fremgangsmåte for å fremstille en transformert vert.

Aspergillus arter, og spesielt Aspergillus niger, blir anvendt for industriell produksjon av enzymer anvendt innen matvare produksjonsindustrien. A. niger har fordeler som en vert for produksjon av rekombinante proteiner på grunn av den store kapasiteten for sekresjon av proteiner, og på grunn av at systemer er tilgjengelige for molekylær genetisk manipulasjon derav. Tilstedeværelse av proteaser i dyrkningsfluidet, periplasmaområdet eller endoplasmisk reticulum og Golgi apparatet har vist seg å være skadelig for ekspressjonen av heterologe proteiner i A. niger. Aspergillus blir til og med anvendt kommersielt for å produsere proteaser. Et antall ekstracellulære proteaser fra Aspergillus er blitt beskrevet i litteraturen. Genet pepA kodende for aspergillopepsin A fra Aspergillus awamori er nylig blitt klonet. PepA genproduktet står for en hoveddel av utskilte syreproteaser til A. niger og stammer hvor pepA gen er blitt deletert har muliggjort øket ekspressjon av heterologe proteiner i A. niger var. awamori. Andre proteasegener er også nylig blitt klonet fra Aspergilli og disse innbefatter en alkalisk asparagin protease til A. oryzae, en alkalisk asparaginprotease til A. fumigatus, en ikke-pepsintype syreprotease fra A. niger var. macrosporus, en metalloprotease betegnet nøytral protease II fra A. oryzae og to serinproteaser fra A. niger.

Isolerte og muterte proteasegener fra *A. niger* kan bli
anvendt for genødeleggelseeksperimenter, dvs. fremstilling
av mutante stammer hvor det tilsvarende naturlige genet er
ødelagt. For eksempel er pepA genet fra *Aspergillus awamori*
5 blitt ødelagt ved genødeleggelse for å danne
aspergillopepsin A-manglende stammer.

Som nevnt ovenfor produserer *Aspergilli* et stort antall
forskjellige proteaser og det er derfor fortsatt behov for
10 *Aspergillus* stammer som mangler andre proteaser for
industriell produksjon av proteiner. For dette formålet er
det også behov for andre proteasegener som kan bli anvendt
for fremstilling av proteasemanglende stammer ved in vitro
mutagenese, for eksempel genødeleggelse. Det er derimot
15 også behov for rekombinante proteaseproteiner som kan bli
industrielt anvendt for proteinprosessering.

En annen hovedbestanddel av de utskilte proteaseaktiviteter
i *A. niger* er asparaginproteaser. Asparaginproteaser er
20 blitt klonet i et antall sopp, for eksempel vakuolært
protein pep4(=pepA) til *S. cerevisiae*, utskilte proteaser
fra *Candida*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cryphonectria* og *Pencillium*
arter og utskilte vesentlig sure proteaser fra både *A.*
niger og *A. oryzae*. Nylig ble et vakuolært proteingen
25 isolert fra *Neurospora crassa* og ble vist å ha betraktelig
sekvens homologi med gjær pep4.

Det er nå blitt oppdaget at *Aspergillus* også produserer en
annen asparaginprotease som er homolog med pepsiner, med
30 som ikke viser noen homologi med det kjente
Aspergillopepsin. Foreliggende oppfinnelse fokuserer på den
nye proteasen.

Det er en hensikt ifølge oppfinnelsen å tilveiebringe et
35 DNA molekyl som koder for en *Aspergillus* asparaginprotease
("Aspergillus aspartic protease").

En annen hensikt er å tilveiebringe rekombinant *Aspergillus* asparaginprotease og for dette formålet også en transformert *Aspergillus*stamme for produksjonen derav.

En annen hensikt er å tilveiebringe en *Aspergillus* stamme som er defekt i et asparaginprotease gen hvor stammen kan bli anvendt for en mer effektiv produksjon av heterologe eller homologe proteiner.

Foreliggende oppfinnelse vedrører et isolert DNA molekyl kjennetegnet ved at det omfatter en DNA-sekvens kodende for en *A. niger* asparagin protease med aminosyresekvensen SEQ ID NO. 2.

Videre omfatter oppfinnelsen en hybridvektor kjennetegnet ved at den omfatter en DNA-sekvens ifølge oppfinnelsen. Hybridvektoren ifølge oppfinnelsen kjennetegnes særlig ved at en DNA-sekvens kodende for en *Aspergillus niger* asparagin protease er funksjonelt koblet til regulatoriske regioner egnede for ekspresjon av et *Aspergillus niger* asparagin protease gen i en egnet vertscelle.

Videre omfatter oppfinnelsen en fremgangsmåte for fremstilling av en DNA-sekvens kjennetegnet ved å dyrke en vertscelle transformert med nevnte DNA-sekvens og isolering av nevnte DNA-sekvens fra vertsceller.

Oppfinnelsen omfatter også en *Aspergillus* stamme defisient i et *Aspergillus niger* asparagin proteasegen kjennetegnet ved at genet er pepE-genet som har sekvensen ifølge SEQ ID No. 1 og en fremgangsmåte for fremstilling av en *Aspergillus* stamme ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved at den omfatter (i) in vitro mutagenese av et *Aspergillus niger* asparagin proteasegen, (ii) transformering av en *Aspergillus* vert inneholdende et korresponderende endogent kromosomalt *Aspergillus niger* asparagin proteasegen med mutert eksogent gen, og (iii) isolering av mutanter hvori det endogene genet er erstattet med det muterte eksogene

genet.

Videre omfatter oppfinnelsen en fremgangsmåte for fremstilling av et ønsket polypeptid kjennetegnet ved at
5 den omfatter (i) transformering av en *Aspergillus* stamme ifølge oppfinnelsen med en ekspresjonsvektor som inneholder en ekspresjonskassett egnet for ekspresjon av det ønskede polypeptidet, (ii) dyrking av den transformerte *Aspergillus* verten under betingelser som muliggjør ekspresjon av det
10 ønskede polypeptidet og (iii) isolering av det ønskede polypeptidet.

Oppfinnelsen omfatter også en *A. niger* asparagin protease kjennetegnet ved at den har aminosyresekvensen vist i SEQ
15 ID NO. 2, og fragmenter derav som har asparagin protease aktivitet og en fremgangsmåte for fremstilling av en *Aspergillus niger* asparagin protease kjennetegnet ved å dyrke en egnet vert som er transformert med en hybrid ekspresjonsvektor ifølge oppfinnelsen.

20 Oppfinnelsen vedrører også en vert kjennetegnet ved at den er transformert med en hybrid ekspresjonsvektor ifølge oppfinnelsen, og en fremgangsmåte for fremstilling av en transformert vert ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved å
25 transformere en egnet vert ved en hybrid ekspresjonsvektor ifølge oppfinnelsen. Den transformerte verten ifølge oppfinnelsen kjennetegnes særlig ved at den er en *Aspergillus* stamme.

30 Oppfinnelsen vedrører fortrinnsvis et DNA molekyl omfattende en DNA sekvens kodende for *A. niger* asparagin protease PEPE som har aminosyresekvensen vist i SEQ ID NO. 1 eller et fragment derav som har beholdt asparaginprotease aktiviteten. En DNA sekvens ifølge oppfinnelsen er
35 fortrinnsvis den kodende regionen for moden PEPE protease vist i nukleotidsekvensen med SEQ ID NO. 1. Oppfinnelsen omfatter videre degenererte DNA sekvenser kodende for PEPE

eller et fragment derav, dvs. sekvenser hvor nukleotider er erstattet uten åforandre den kodede aminosyresekvensen. Slike DNA sekvenser er for eksempel nyttige på grunn av forskjellene i den foretrukne kodonbruken i forskjellige verter eller på grunn av tilstedeværelse av nye gjenkjenningsseter for restriksjonsenzymmer.

Oppfinnelsen vedrører også en hybrid vektor som omfatter som innskudd en DNA sekvens kodende for en Aspergillus-asparagin proteinase ifølge oppfinnelsen, fortrinnsvis en foretrukket form derav. En slik hybridvektor ifølge oppfinnelsen er nyttig for propagering og formering av en DNA sekvens ifølge oppfinnelsen.

En hybrid vektor ifølge oppfinnelsen, inkludert en eks-presjonsvektor, kan bli avledet fra hvilke som helst av vektorer som er nyttige innenfor området genetisk omkonstruering, så som fra virusser, fag, kosmider, plasmider eller kromosomalt DNA, så som derivater av SV40, herpes virusser, Papilloma viures, Retrovirusser, Baculovirus, fag λ , for eksempel NM989 eller EMBL4 eller fag M13, for eksempel M13mp8, bakterielle plasmider, for eksempel pBR322, pUC18 eller gjærplasmider, for eksempel gjær 2μ plasmid eller et defekt virus, fag eller plasmid i nærvær av en hjelpervirus, fag eller plasmid som muliggjør replikasjon av nevnte defekte virus, fag eller plasmid, for eksempel M13(+)KS vektor i nærvær av for eksempel M14K07 hjelper fag og også kromosomalt DNA, avledet for eksempel fra filamentøs sopp så som Aspergillus spec., for eksempel A. niger, for eksempel de som er tilveiebragt av EP 184 438. Foretrukket er vektorer for S. cerevisiae eller filamentøs sopp, fortrinnsvis for Aspergillus spec., mer foretrukket for A. niger.

En hybrid vektor ifølge oppfinnelsen, inkludert en eks-presjonsvektor, tilveiebringer replikasjon av et ønsket DNA i en egnet vert, enten som et ekstrakromosomalt element

eller ved integrering i vertskromosomet. Flere mulige vektorsystemer er tilgjengelige for integrering og ekspresjon av klonet DNA ifølge oppfinnelsen. I prinsippet blir alle vektorer som replikerer og blir stabilt opprettholdt i den valgte verten egnede. Vektoren blir derfor valgt avhengig av vertsceller som blir betraktet for transformasjon. Slike vertsceller kan generelt være prokaryote eller eukaryote mikroorganismer så som bakterier, sopp så som gjær, fortrinnsvis *S. cerevisiae*, eller som filamentøse sopp, fortrinnsvis *Aspergillus spec.*, mer foretrukket er *A. niger* eller celler med høyere eukaryotisk opprinnelse så som vertebrat, for eksempel pattedyr, celler. Egnede vertsceller vil bli diskutert i detalj nedenfor. En hybrid vektor ifølge oppfinnelsen, inkludert en ekspresjonsvektor, som blir opprettholdt som ekstrakromosomalt element omfatter et replikasjonsorigo (ori) eller en autonomt replikerende sekvens (ARS), selekterbare markørsekvenser og eventuelt ytterligere restriksjonssteder. En vektor som er for integrering inn i et vertskromosom behøver ikke å omfatte en ori eller ARS på grunn av at det blir replikert i cellen i sammenheng med kromosomet.

Et replikasjonsorigo eller en autonomt replikerende sekvens (et DNA element som gir autonomt replikerende evner til ekstrakromosomale elementer) blir gitt enten ved konstruksjon av en vektor som innbefatter et replikasjonsorigo som avledet fra Simian virus (SV40) eller annen viral kilde, eller fra vertens cellekromosomale mekanismer.

En hybrid vektor ifølge oppfinnelsen, inkludert en ekspresjonsvektor, kan også inneholde selektive markører avhengig av verten som skal bli transformert, selektert og klonet. Et hvilket som helst markørgen kan bli anvendt som letter seleksjon av transformantene forårsaket av den fenotypiske ekspresjonen til markøren. Egnede markører er spesielt de som uttrykker antibiotisk resistens, for

eksempel mot tetracyklin eller ampicillin, eller når det gjelder autotrofe soppmutanter, gener som komplementerer vertslesjoner. Tilsvarende gener gir for eksempel motstand mot antibiotisk cykloheksimid, eller tilveiebringer prototrofi en auxotrof vert, fortrinnsvis *S. cerevisiae*, mutant, for eksempel *ura3*, *leu2*, *his3* eller *trp1* genet. Det er også mulig å anvende som markører strukturelle gener som er assosiert med et autonomt replikerende segment forutsatt at verten som skal bli transformert er auxotrof for produktet uttrykt av markøren.

Av spesiell viktighet i sammenheng med hybridvektorer, spesielt ekspresjonsvektorer, for *A. niger* er markørgener som komplementerer *A. niger* vertslesjoner, så som *argB* genet kodende for ornithin karbamoyl transferase, for eksempel avledet fra *A. niger* eller *A. nidulans* (EP 184 438) eller *A. nidulans* DNA fragmenter homologe med *B. crassa pyr4* genet. Andre egnede markørgener er beskrevet nedenfor i sammenheng med beskrivelsen av transformerte verter ifølge oppfinnelsen.

En hybridvektor ifølge oppfinnelsen egnet for formering av DNA kodende for Aspergillus-asparagin proteinase i *E. coli* er for eksempel plasmid pPEPE beskrevet nedenfor i ledsagende eksempler.

Betegnelsen "eksprsjonskassett" i sammenheng med en ekspresjonsvektor betyr en DNA sekvens som kan uttrykke Aspergillus-asparagin proteinase og omfatter en promoter som var operabelt koblet til en Aspergillus-asparagin proteinase kodende region og eventuelt en eller flere ytterligere regulatoriske elementer til gruppen bestående av en signalsekvens, en transkripsjonell terminator, en transkripsjonell enhancer, et ribosomalt bindingssete, en sekvens for effektiv RNA prosessering, en sekvens kodende for effektiv proteinprosessering og en sekvens kodende for riktig protein lokalisering. I en ekspresjonskassett kan en

Aspergillus-asparagin proteinase kodende region bli kombinert med homologe regulatoriske elementer, dvs. som er naturlig koblet dertil, eller med heterologe regulatoriske elementer, dvs. som er avledet fra andre gener.

5

Mange forskjellige promotersekvenser kan bli anvendt avhengig av naturen til vertscellen. Promotere som er sterke og på samme tid effektivt regulerte er de mest nyttige.

10

Eksempler på promotere er prokaryotisk λ_{PL} , λ_{PR} , E. coli lac, trp eller tac promotere. Promotere egnede for ekspresjon i gjær, fortrinnsvis S. cerevisiae, er TRP1-, ADHI-, ADHII-, PHO3-, PHO5-, GAL10- eller glykolytiske

15

promotere som som promoteren til enolase, glycerinaldehyd-3-fosfatdehydrogenase, 3-fosfoglyceratkinase (PGK),

heksokinase, pyruvat dekarboksylase, fosfofruktokinase, glukose-6-fosfat isomerase, 3-fosfolycerat mutase, pyruvat kinase, triosefosfat isomerase, fosfoglukoseisomerase og

20

glukokinasegener, eller PHO5-GAPDH hybrid promoteren (EP søknad nr. EP-A-213 593). Andre eksempler på eukaryote

promotere er promotere avledet fra eukaryote viruser, for eksempel SV40, Rous sarcoma virus, adenovirus 2, bovint papilloma virus, papovavirus, cytomegalovirus avledede

25

promotere eller pattedyrscelle avledede promotere, for eksempel av actin, collagen, myosin eller β -globin genet.

Eukaryote promotere kan bli kombinert med forsterkende sekvenser så som gjær, fortrinnsvis S. cerevisiae, oppstrøms aktiverende sekvenser (UAS) eller virale eller

30

cellulære enhancere så som cytomegalovirus IE enhancere, SV40 enhancer, immunoglobulin genenhancer eller andre.

Enhancere er transkripsjons-stimulerende DNA sekvenser, for eksempel avledet fra viruser så som Simian virus, polyoma virus, bovint papilloma virus eller Moloney sarcoma virus eller med genomisk opprinnelse. En enhancer sekvens kan også bli avledet fra ekstrakromosomalt ribosomalt DNA til

35

Physarum polycephalum (PCT/EP 8500278). Egnede enhancere utgjør for eksempel også oppstrøms aktiveringssteder avledet fra gjæresyre fosfatase PHO5 genet.

- 5 Signalsekvenser kan for eksempel være en presekvens eller sekretorisk ledersekvens som leder sekresjonen av polypeptidet, eller lignende. En signalsekvens er for eksempel et signal- eller lederpeptid av *Aspergillus-asparaginproteinase*, for eksempel signalsekvensen vist i SEQ
- 10 ID NO. 1. Ytterligere signalsekvenser er kjent for litteraturen kan for eksempel de som er beskrevet i von Heijne, G., *Nucleic Acids Res.* 14, 4683 (1986).

- 15 Sekvenser nødvendige for initiering og terminering av transkripsjonen og for stabilisering av mRNA er vanligvis tilgjengelig fra ikke kodende 5'-regioner og 3'-regioner fra viralt eller eukaryot cDNA, for eksempel fra ekspresjonsverten.

- 20 I en utførelsesform ifølge oppfinnelsen er en ekspresjonsvektor som omfatter en intron-manglende kodende region bestående av tre eksoner av den kodende regionen vist i SEQ ID NO. 1 for ekspresjon av *Aspergillus-asparagin proteinase* i prokaryoter, for eksempel i *E. coli*, eller fortrinnsvis i
- 25 gjær, mer foretrukket i *S. cerevisiae* under kontroll av GAL10 promoteren, for eksempel som i plasmid, pGALPEPE.

- Oppfinnelsen omfatter fortrinnsvis en ekspresjonsvektor egnet for ekspresjon av en DNA sekvens kodende for en
- 30 *Aspergillus-asparagin proteinase* i en *Aspergillus* vert.

- En type ekspresjonsvektor omfatter en DNA sekvens kodende for en *Aspergillus-asparagin proteinase*, fortrinnsvis fra *A. niger*, under kontroll av en promoter som er naturlig
- 35 koblet til nevnte DNA sekvens, dvs. homolog promoter derav. Mer foretrukket er en ekspresjonsvektor omfattende en DNA sekvens kodende for PEPE med SEQ ID NO. 1, mest foretrukket

er DNA sekvensen vist i SEQ ID NO. 1, under kontroll av promoterregionen vist i SEQ ID NO. 1.

5 Dersom en slik ekspresjonsvektor blir anvendt for ekspresjonen av Aspergillus-asparagin proteinase i en vertsstamme til artene er Aspergillus-asparagin proteinase genet opprinnelig avledet fra blir Aspergillus-asparagin proteinasen overuttrykt på grunn av at både rekombinante og opprinnelige Aspergillus-asparagin proteinase gener er 10 aktive under de samme ekspresjonsbetingelsene.

En annen type ekspresjonsvektor omfatter en DNA sekvens kodende for Aspergillus-asparagin proteinase under kontroll av en promoter som er funksjonell i Aspergillus som ikke er 15 naturlig koblet til nevnte DNA sekvens. En promoter egnet for ekspresjon av Aspergillus-asparagin proteinase i Aspergillus spec., spesielt i A. niger, er for eksempel en promoter av et Aspergillus spec. pectin lyasegen, fortrinnsvis promoteren til A. niger PLI (se EP-A- 20 0.278.355), PLA, PLB, PLC, PLE eller PLF (se EP-A-0.353.188) genet, en promoter av et Aspergillus spec. polygalacturonase gen, fortrinnsvis promoteren til A. niger PGI eller PGII genet (se EP-A-søknad EP-A-421919), en promoter til et Aspergillus spec. pyruvat kinase gen, 25 fortrinnsvis promoteren til A. niger pki genet (EP-søknad EP-A-439997).

I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen er for eksempel i plasmidet pPKIPEPE pyruvat kinase promoteren til 30 A. niger funksjonelt koblet til den kodende regionen vist i SEQ ID NO. 1, kodende for Aspergillus-asparagin proteinase koblet til dets homologe signalsekvens.

Fremgangsmåte for fremstilling av et Aspergillus-asparagin proteinase gen. 35

Oppfinnelsen vedrører også en fremgangsmåte for

fremstilling av et DNA molekyl ifølge oppfinnelsen dvs. som koder for en *Aspergillus*-asparagin proteinase ifølge oppfinnelsen, fortrinnsvis et som koder for en foretrukket form av en *Aspergillus*-asparagin proteinase ifølge oppfinnelsen, eller for fremstilling av en hybrid vektor omfattende et slikt DNA molekyl, i det nevnte fremgangsmåte 5 omfatter dyrking av en vert transformert med et nevnt DNA molekyl eller hybridvektor ifølge oppfinnelsen. I en alternativ utførelsesform ifølge oppfinnelsen kan et DNA 10 molekyl ifølge oppfinnelsen bli dannet ved kjemisk syntese ved nukleotid kondensasjon.

Dyrking av vertene blir utført i en konvensjonelt næringsmedium som kan bli supplementert med eller tappet for 15 kjemiske forbindelser som muliggjør negativ eller positiv seleksjon av transformantene, dvs. verter som inneholder ønsket DNA molekyl sammen med en seleksjonsmarkør, fra ikke-transformanter, dvs. verter som mangler ønsket DNA molekyl.

20 Hvilke som helst transformerbare verter som er nyttige innenfor fagområdet kan bli anvendt, for eksempel bakterier, så som *E. coli*, sopp, så som *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, høyere eukaryote celler 25 så som insektsceller eller pattedyrceller, for eksempel CHO celler, eller spesielt filamentøse sopp, så som *Aspergillus* for eksempel *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. carbonarius*, *A. awamori*, *A. japonicus* og spesielt *A. niger*. Transformasjon av vertene blir utført ved hjelp av konvensjonelle metoder.

30 En DNA sekvens kodende for *Aspergillus*-asparagin proteinase kan bli oppnådd ut fra genomet til en *Aspergillus* vert som kan uttrykke *Aspergillus*-asparagin proteinase eller som for eksempel kan bli fremstilt ved dyrking av en vert som er 35 transformert med et rekombinant DNA molekyl omfattende en DNA sekvens kodende for en *Aspergillus*-asparagin proteinase og, når nødvendig, isolering av den ønskede DNA sekvensen

derfra.

Et DNA kan spesielt bli fremstilt ifølge en fremgangsmåte som omfatter et trinn valgt fra

- 5 a) isolering av genomisk DNA fra egnede *Aspergillus* celler og selektering av ønsket DNA, for eksempel ved anvendelse av en DNA probe eller ved anvendelse av et egnet ekspresjonssystem og screening for ekspresjon av ønsket polypeptid,
- 10 b) isolering av mRNA fra egnede *Aspergillus* celler, selektering av ønsket mRNA, for eksempel ved hybridisering med en DNA probe eller ved ekspresjon i et egnet ekspresjonssystem og screening for ekspresjon av ønsket polypeptid, preparering av enkelt-trådet cDNA som er komplementær med mRNA, deretter dobbelt-trådet cDNA derfra,
- 15 c) isolering av cDNA fra et cDNA bibliotek og selektering av ønsket cDNA, for eksempel ved anvendelse av en DNA probe eller ved anvendelse av et egnet ekspresjonssystem og screening for ekspresjon av ønsket polypeptid,
- 20 d) syntetisering av dobbelt-trådet DNA in vitro ved PCR teknologi av totalt *Aspergillus* DNA ved anvendelse av oligonukleotidprimere konstruert fra genet kodende for *A. niger* pepE, eller
- 25 e) inkorporering av et dobbelt-trådet DNA oppnåelig ifølge trinn a), b), c) eller d) inn i en hensiktsmessig vektor, transformering av en egnet vert, formering av verten og isolering av DNA.
- 30

Genomisk DNA kan bli isolert og screenet for ønsket DNA
35 (trinn a). Genomisk DNA blir isolert fra en *Aspergillus* stamme som kan uttrykke en *Aspergillus*-asparagin proteinase. Et genomisk DNA bibliotek blir dannet derfra

ved spaltning med egnede restriksjonsendonukleaser og innkorporering inn i egnede vektorer ifølge kjente prosedyrer. Genomisk DNA bibliotek blir screenet med en DNA probe som beskrevet nedenfor, eller uttrykt i et egnet ekspresjonssystem og oppnådde polypeptider blir screenet på konvensjonell måte.

Et genomisk bibliotek kan bli dannet for eksempel ved delvis spaltning av genomisk DNA til en *A. niger* stamme, for eksempel NW756 eller N400, med for eksempel *Sau3AI* eller *MboI* og kloning av DNA fragmenter med høy molekylvekt i en egnet vertsvektor, for eksempel *E. coli* plasmid pUN121 eller en *lambda*vektor, for eksempel EMBL4.

Andre soppstammer som produserer en ønsket *Aspergillus*-asparagin proteinase, for eksempel *A. japonicus*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. niger*, kan virke som kilde for det genomiske biblioteket og andre egnede vektorer, for eksempel de som er nevnt ovenfor, kan bli anvendt som mottagere for fragmentene.

For å på vellykket måte screene det genomiske biblioteket for DNA sekvenser kodende for *Aspergillus*-asparagin proteinase er en hybridiserende DNA probe nødvendig. Dette kan være en syntetisk DNA probe dersom aminosyresekvensen eller del derav av en ønsket *Aspergillus*-asparagin proteinase er kjent, eller et annet asparagin proteainase gen, for eksempel fra *Neurospora crassa*, eller en del derav, som hybridiserer til et *Aspergillus*-asparagin proteinase gen.

Polyadenylerte messenger RNA (trinn b) blir isolert fra egnede celler ved hjelp av kjente metoder. Isoleringemetodene involverer for eksempel homogenisering i nærvar av en detergent og en ribonuklease inhibitor, for eksempel heparin, guanidiniumisothiocyanat eller merkaptoetanol, ekstrahering av mRNA med egnede kloroform

fenol blandinger, eventuelt i nærvær av salt og bufferopløsninger, detergenter og/eller kationchelaterende midler, og presipitering av mRNA fra gjenværende vandige, salt-inneholdende fase med etanol, isopropanol eller lignende. Isolert mRNA kan bli ytterligere rensset ved sentrifugering i en cesiumkloridgradient etterfulgt av etanolpresipitering og/eller ved kromatografiske metoder, for eksempel affinitetskromatografi, for eksempel kromatografi på oligo (dT) cellulose eller på oligo(U) sepharose. Dette rensede totale mRNA blir fortrinnsvis separert i henhold til størrelse ved gradientsentrifugering, for eksempel i en lineær sukrosegradient eller kromatografi på egnede størrelsesfraksjoneringskolonner, for eksempel på agarose geler.

Ønsket mRNA blir valgt ved screening av mRNA direkte med en DNA probe eller ved translasjon i egnde celler eller celle-frie systemer og screening av de oppnådde polypeptidene.

Seleksjon av ønsket mRNA blir fortrinnsvis oppnådd ved anvendelse av en DNA hybridiseringsprobe som beskrevet nedenfor for derved å unngå det ytterligere translasjonstrinnet. Egnede DNA probe er DNA med kjent nukleotidsekvens, for eksempel syntetiske DNA, cDNA avledet fra mRNA kodende for ønskede polypeptider eller genomiske DNA fragmenter omfattende for eksempel ved siden av liggende DNA sekvenser som blir isolert fra en naturlig kilde eller fra en genetisk omkonstruert mikroorganisme.

Separert mRNA kan bli translatert i celler, for eksempler froskeoocytter, eller i celle-frie systemer, for eksempel i retikulocyt lysater eller hvetekimekstrakter. De oppnådde polypeptidene blir screenet for enzymatisk aktivitet eller for reaksjon med antistoffer dannet mot det native polypeptidet, for eksempel i en immunanalyse, for eksempel radioimmunanalyse, enzymimmunanalyse eller immunanalyse med

fluorescensmarkører. Slike immunanalyser og preparering av polyklonale og monoklonale antistoffer er velkjent innenfor fagområdet og blir dermed anvendt.

- 5 Preparering av et enkelt-trådet komplementært DNA (cDNA) fra selektert mRNA templat er velkjent innenfor fagområdet og det er også fremstilling av et dobbelt-trådet DNA fra et enkelt-trådet DNA. mRNA templatet blir inkubert med en blanding av deoksynukleosidtrifosfater, eventuelt
10 radioaktivt merkede deoksynukleosidtrifosfater (for å kunne screene resultatet fra reaksjonen), en primersekvens så som et oligo-dT residie hybridiserende med poly(A) halen til mRNA og et egnet enzym så som en revers transkriptase for eksempel fra avian myeloblastosis virus (AMV). Etter
15 degradering av templat mRNA for eksempel ved alkalisk hydrolyse blir cDNA inkubert med en blanding av deoksynukleosid trifosfater og et egnet enzym for å tilveiebringe et dobbelt-trådet DNA. Egnede enzymer utgjør blant andre en revers transkriptase, Klenow fragmentet til
20 E. coli DNA polymerase I eller T4 DNA polymerase. Vanligvis virker en hårnål løkkestruktur dannet spontant av enkelt-trådet cDNA som en primer for syntese av den andre tråden. Denne hårnålsstrukturen blir fjernet ved spaltning med S1 nuklease. Alternativt blir 3'-enden til enkelt-
25 trådet DNA først utvidet med homopolymere deoksynukleotidhaler før hydrolyse av mRNA templatet og deretter syntese av den andre cDNA tråden.

- I alternativer blir dobbelt-trådet cDNA isolert fra cDNA
30 bibliotek og screenet for ønsket cDNA (trinn C). cDNA biblioteket blir konstruert ved isolering av mRNA fra egnede celler, og preparering av enkelt-trådet og dobbelt-trådet cDNA derfra som beskrevet ovenfor. Dette cDNA blir spaltet med egnede restriksjonsendonukleaser og
35 innkorporert inn i λ fag, for eksempel λ charon 4A eller λ gt 11 ifølge etablerte prosedyrer. cDNA biblioteket replikert på egnede membraner, for eksempel nitrocellulose

membraner, belastede nylonmembraner, så som Hybond, Immobilon eller GeneScreen blir screenet ved anvendelse av en DNA probe som beskrevet ovenfor, eller uttrykt i et egnet ekspressjonssystem og oppnådde polypeptider blir
5 screenet for reaksjon med et antistoff som er spesifikt for de ønskede forbindelsene.

En annen fremgangsmåte for fremstilling av dobbel-trådet DNA er PCR teknologi (trinn d). Denne fremgangsmåten kan
10 spesielt bli anvendt for fremstilling av en stor mengde dobbelt-trådet DNA begynnende fra en liten mengde DNA eller RNA med i det minste delvis kjente sekvenser. Et DNA innskudd med ukjent sekvens som er flankert av kjente vektorsekvenser kan derimot bli anvendt som
15 utgangsmateriale. I PCR teknologi blir DNA molekyler, for eksempel oligonukleotider, anvendt som primer for enzymatisk templat-avhengig syntese av DNA. Store mengder kan bli dannet på grunn av at denaturering av dobbelt-trådet DNA, hybridisering med primere og enzymatisk syntese
20 kan bli gjentatt sekvensielt. Antall syntetiserte DNA molekyler øker eksponensielt på grunn av at det dobles i hver runde. PCR teknologi hører inn under teknikkens stand og kan bli konvensjonelt anvendt i foreliggende oppfinnelse. Oligonukleotid primeren kan bli konstruert for
25 å hybridisere til DNA som vil kode for konserverte asparagin protease proteinsekvenser basert på sammenligning mellom kjente asparagin proteaser. PCR teknologi er velkjent innenfor fagområdet og konvensjonelle PCR teknikker kan bli anvendt i foreliggende oppfinnelse, for
30 eksempel de som er beskrevet i M.A. Innis et al. (eds.), PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego (1990).

Forskjellige metoder er kjent innenfor fagområdet for
35 inkorporering av dobbelt-trådet cDNA eller genomisk DNA inn i en hensiktsmessig vektor (trinn e). Komplementære homopolymerdeler kan for eksempel bli tilsatt til dobbelt-

trådet DNA og vektor DNA ved inkubering i nærvær av tilsvarende deoksynukleosid trifosfater og et enzym så som terminal deoksynukleotidyltransferase. Vektoren og dobbelt-trådet DNA blir deretter koblet ved baseparring mellom 5 komplementære homopolymere haler og til slutt ligert ved spesifikk kobling av enzymer så som ligase. Andre muligheter er tilsetning av syntetiske linkere til termini av dobbelt-trådet DNA, eller innkorporering av dobbelt-trådet DNA inn i vektoren ved butt-eller overhengende- 10 endeligering. Hensiktsmessige vektorer vil bli diskutert i detalj nedenfor.

Transformeringsprosedyrer for transformering av hensiktsmessige vertsceller med oppnådd hybridvektor og seleksjon 15 og formering av transformerte vertsceller er velkjent innenfor fagområdet. Eksempler for slike metoder er gitt nedenfor.

Isolering av ønsket DNA, mutanter og fragmenter derav 20 ifølge oppfinnelsen blir oppnådd ifølge fremgangsmåter kjent innenfor fagområdet, for eksempel ekstrahering med fenol og/eller kloroform. Eventuelt kan DNA bli ytterligere manipulert, for eksempel ved behandling med mutagene midler for å oppnå mutanter eller ved spaltning med reistriksjons- 25 enzymer for å oppnå fragmenter, modifisere en eller begge termini for å lette innkorporering inn i vektoren, fjerne mellomliggende sekvenser og lignende.

Nukelotidsekvensen til et DNA ifølge oppfinnelsen kan bli 30 bestemt ifølge fremgangsmåter som i seg selv er kjente, for eksempel ved Maxam-Gilbert metoden ved anvendelse av ende-merket DNA eller ved dideoksoxykjedetermineringsmetoden til Sanger.

35 Aspergillus-asparagin proteinase gensekvenser ifølge foreliggende oppfinnelse kan også bli dannet ifølge en in vitro syntese ifølge konvensjonelle metoder. In vitro

syntesen er spesielt anvendbar for preparering av mindre fragmenter av et *Aspergillus*-asparagin proteinasegen kodende for fragmenter av *Aspergillus*-asparagin proteinase med asparagin proteaseaktivitet. In vitro syntese er også
5 spesielt anvendbar for syntese av DNA kodende for en promoter eller et signalpeptid. In vitro syntese blir fortrinnsvis anvendt for *Aspergillus*-asparagin proteinase genet avledet fra *A. niger* eller fragmenter derav, fortrinnsvis til *pepE* genet vist i SEQ ID NO. 1 eller
10 promoter eller signalsekvensen derav.

Ved utførelse av foreliggende oppfinnelse kan et asparagin proteinasegen fra en annen art, for eksempel *N. crasse*, eller et fragment derav bli anvendt som probe for
15 identifisering av en *Aspergillus* spec., for eksempel en *A. niger*, asparagin proteinase mRNA i en RNA fraksjon eller et asparagin proteinase DNA i et genomisk eller cDNA bibliotek. Fra den primære sekvensen til *A. niger* genet og sammenligning med andre proteaser kan den kodende regionen
20 til proteasen bli utledet og forholdet til genet og asparagin proteinase genfamilien kan bli bekreftet. Det oppnådde genet kan bli anvendt for preparering av rekombinant protease som beskrevet i detalj nedenfor.

25 Syntetiske DNA prober kan bli ordnet eller syntetisert ifølge kjente metoder. Blandinger av ønskede oligonukleotider kan bli oppnådd ved anvendelse av blandinger av 2, 3 eller 4 nukleotider dA, dC, dG og/eller dT i beskyttet form eller tilsvarende dinukleotidkoblingsenheter i
30 hensiktsmessige kondensasjonstrinn som beskrevet av Y. Ike et al. (*Nucleic Acids Research* 11, 477, 1983).

For hybridisering blir DNA prober merket, for eksempel radioaktivt merket ved kinasereaksjon. Hybridisering av
35 størrelses-separert mRNA med DNA prober inneholdende en markør blir utført ifølge kjente prosedyrer, dvs. i buffer og saltoppløsninger inneholdende adjuvants, for eksempel

kalsiumchelatorer, viskositetsregulerende forbindelser, proteiner, ikke homologe DNA og lignende, ved temperaturer som favoriserer selektiv hybridisering, for eksempel mellom 0°C og 80°C, for eksempel mellom 25°C og 50°C eller rundt 5 65°C, fortrinnsvis rundt 20°C lavere enn hybrid dobbelt-trådet DNA smeltetemperatur.

Transformerte verter og preparering derav

Oppfinnelsen vedrører videre vertsceller transformert med 10 en hybrid- eller ekspresjonsvektor ifølge oppfinnelsen, fortrinnsvis en som koder for de foretrukne formene av *Aspergillus-asparagin* proteinase ifølge oppfinnelsen.

Eksempler på egnde verter, spesielt for formering av 15 rekombinante DNA molekyler ifølge oppfinnelsen, er mikroorganismer som mangler eller har dårlige restriksjonsenzymmer eller modifikasjonsenzymmer, så som bakterier, spesielt stammer av *Escherichia coli*, for eksempel *E. coli* X1776, *E. coli* Y1090, *E. coli* W3110, *E.* 20 *coli* HB101/LM1035, *E. coli* JA 221, *E. coli* DH5α eller fortrinnsvis *E. coli* DH5αF', JM109, MH1 eller HB101 eller *E. coli* K12 stamme. Egnede verter er også andre prokaryote celler for eksempel *Bacillus subtilis*, *Bacillus* 25 *stearothermophilus*, *Pseudomonas*, *heamophilus*, *Streptococcus* og andre, og gjær, for eksempel *Saccharomyces cerevisiae* så som *S. cerevisiae* GRF 18. Ytterligere egnede vertsceller er celler fra høyere organismer, spesielt etablerte 30 kontinuerlige humane eller dyrecellelinjer, for eksempel humane embryoniske lungefibroblaster L132, humane maligne melanoma Bowes celler, HeLa celler, SV40 virus transformerte nyreceller fra afrikansk grønn ape COS-7 eller kinesisk hamsterovarie (CHO) celler.

Eksempler på egnde celler for ekspresjon av et 35 *Aspergillus-asparagin* proteinase gen ifølge oppfinnelsen er cellene nevnt ovenfor transformert med en hensiktsmessig ekspresjonsvektor og ytterligere egnede insektsceller

transformert med en hensiktsmessig Baculovirus ekspresjonsvektor og spesielt filamnetøse sopp, for eksempel *Penicillium*, *Cephalosporium* eller fortrinnsvis *Aspergillus spec.*, for eksempel *A. carbonarius*, *A. awamori*, *A. nidulans*, *A. oryzae* eller mer foretrukket er *A. niger*,
5 transformert med en hensiktsmessig ekspresjonsvektor.

Oppfinnelsen vedrører også en fremgangsmåte for fremstilling av slike transformanter omfattende behandling
10 av en egnet vertscelle under transformerend betingelser med et DNA molekyl eller hybrid vektor ifølge oppfinnelsen, eventuelt sammen med en selekterbar markør gen og eventuelt selektering av transformantene. *Aspergillus-asparigin* proteinasegenet kan også bli integrert inn i vertsgenomet
15 etter transformasjon, spesielt dersom eukaryote celler, for eksempel *Aspergillus spec.* blir anvendt som vert.

Transformasjon av mikroorganismer blir utført ifølge konvensjonelle metoder som beskrevet i litteraturen, for
20 eksempel for *S. cerevisiae* (A. Hinnen et al., Proc. natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929, 1978), for *B. subtilis* (Anagnostopoulos et al., J. Bacteriol. 81, 741, 1961), for *E. coli* (M. Mandel et al., J. Mol. Biol. 53, 159, 1970) og for *Aspergillus* [F. Buxton et al., Gene 37:207-14(1985),
25 D.J. Balance et al., biochem. Biophys. Res. Commun. 112:284-9(1983)].

Transformeringsprosedyren til *E. coli* celler innbefatter dermed for eksempel Ca^{2+} forbehandling av cellen for
30 å muliggjøre DNA opptak, og inkubasjon med den hybride vektoren. Påfølgende seleksjon av transformerte celler kan for eksempel bli oppnådd ved overføring av cellene til et selektivt vekstmedium som muliggjør separasjon av de transformerte cellene fra opphavscellene avhengig av
35 naturen til markørsekvensen til vektor DNA. Fortrinnsvis blir et vekstmedium anvendt som ikke muliggjør vekst av celler som ikke inneholder den hybride vektoren.

Transformasjon av sopp så som gjær eller *Aspergillus spec.* omfatter for eksempel trinnene med enzymatisk fjerning av celleveggen ved hjelp av glukosidaser, behandling av
5 oppnådde spheroplaster med hybridvektoren i nærvær av polyetylen glykol og Ca^{2+} ioner, og regenerering av celleveggen ved nedsenking av spheroplastene i agar. Regenereringsagaren blir fortrinnsvis dannet på en måte som muliggjør regenerering og seleksjon av transformerte celler
10 som beskrevet ovenfor på samme tid.

Transformerer av cellene av høyere eukaryotisk opprinnelse, så som pattedyrcellelinjer, blir fortrinnsvis oppnådd ved transfeksjon. Transfeksjon blir utført ved
15 hjelp av konvensjonelle teknikker, så som kalsiumfosfat presipitering, mikroinjeksjon, protoplastfusjon, elektroporasjon, dvs. innføring av DNA ved hjelp av en kort elektrisk puls med transient økende permeabilitet til cellemembranen, eller i nærvær av hjelperformerbindelser så
20 som dietyl aminoetyldekan, dimetylsulfoksid, glycerol eller polyetylen glykol, og lignende. Etter transfeksjonsprosedyren blir transfekterte celler identifisert og selektert for eksempel ved dyrking i et selektivt medium valgt avhengig av naturen til seleksjonsmarkøren, for
25 eksempel standard dyrkningsmedium så som Dulbeccos modifiserte Eagle medium (DMEM), minimum essensielt medium, RPMI 1640 medium og lignende, inneholdende for eksempel tilsvarende antibiotika.

30 Transformerte vertsceller blir dyrket ved hjelp av fremgangsmåter kjent innenfor fagområdet i et flytende medium inneholdende assimilerbare karbonkilder, for eksempel karbohydrater så som glukose eller laktose, nitrogen for eksempel aminosyrer, peptider, proteiner eller
35 degraderingsprodukter derav så som peptoner, ammoniumsalter eller lignende, og uorganiske salter, for eksempel sulfater, fosfater og/eller karbonater av natrium, kalium,

magnesium og kalsium. Mediet inneholder videre for eksempel vekst-fremmende forbindelser, så som sporelementer, for eksempel jern, sink, mangan og lignende.

- 5 Mediet blir fortrinnsvis valgt for å utvise et seleksjons-trykk og forhindre veksten av cellene som ikke er blitt transformert eller som har mistet hybridvektoren. Et antibiotika blir derfor for eksempel tilsatt til mediet dersom den hybride vektoren inneholder et antibiotika
- 10 resistens gen som markør. Dersom en vertscelle blir anvendt som er auxotrof i en essensiell aminosyre, mens den hybride vektoren inneholder et gen kodende for et enzym som komplementerer vertens defekt, blir et minimalmedium som mangler nevnte aminosyrer anvendt for å dyrke de transformerte
- 15 cellene.

- Celler av høyere eukaryotisk opprinnelse så som pattedyr-celler blir dyrket under vevskulturbetingelser ved anvendelse av kommersielt tilgjengelig medium, for eksempel
- 20 Dulbeccos modifiserte Eagle medium (DMEM), minimalt essensielt medium, RPMO 1640 medium og lignende som nevnt ovenfor, eventuelt supplementert med vekst-fremmende forbindelser og/eller pattedyr sera. Teknikker for celledyrking under vevskulturbetingelser er velkjent
- 25 innenfor fagområdet og innbefatter homogent suspensjonskultur, for eksempel i en "airlift" reaktor eller i en kontinuerlig omrørende reaktor, eller immobilisert eller innesluttet cellekultur, for eksempel i hule fibre, mikrokapsler, på agarosemikrokuler, porøse
- 30 glasskuler, kjeramiske beholdere eller andre mikro-beholdere.

- Dyrking blir oppnådd ved fremgangsmåter som er kjent innenfor fagområdet. Dyrkningsbetingelser, så som
- 35 temperatur, pH verdi til mediet og fermenteringstid, blir valgt slik at et maksimalt titer av polypeptidet eller derivatet ifølge oppfinnelsen blir oppnådd. En E. coli

eller gjærstamme blir fortrinnsvis dyrket under aerobe betingelser ved nedsenket kultur med risting eller omrøring ved en temperatur på omtrent 20°C til 40°C, fortrinnsvis ved omtrent 30°C, og en pH verdi fra 4 til 8, fortrinnsvis ved omtrent pH 7, i omtrent 4 til 30 timer, fortrinnsvis helt til maksimale utbytter av polypeptidet eller derivatet ifølge oppfinnelsen blir oppnådd.

For å muliggjøre seleksjon av transformert fra uttransformerte celler inneholder DNA molekylene ifølge oppfinnelsen en seleksjonsmarkør eller, alternativt, blir cellene kotransformert med en andre vektor inneholdende en slik markør. Som i andre systemer er en slik seleksjonsmarkør et uttrykkbart, strukturelt gen hvor det uttrykte polypeptidet (et enzym) tilveiebringer motstand mot forbindelser som er toksiske for mottagerorganismen eller som fullfører enzymsystemet til en mutant som mangler et slikt essensielt polypeptid. Slike markørgener egnede for seleksjon av transformerte filamentøse soppceller utgjør for eksempel de kjente *qa-2*, *pyrG*, *pyr4*, *trpC*, *amdS* eller *argB* genene.

Som beskrevet i EP-A-0 278 355 ble et markør gen, betegnet *pyrA*, isolert fra det genomiske biblioteket til *A. niger*, som er relatert til og som har lignende funksjon som *pyrG* til *A. nidulans* og *pyr4* til *N. crassa*, det vil si som produserer enzymet orotidin 5'-fosfat dekarboksylase. Dette enzymet katalyserer dekarboksylering av orotidin 5'-fosfat til uridylsyre (uridin 5'-fosfatet) og også fluor-orotisk syre til toksisk fluor-uridin. DNA fra hvilke som helst andre *pyr* gener kodende for orotidin-5'-fosfa-dekarboksylase kan bli anvendt. Fra en positiv klon betegnet *E. coli* BJ5183/pCG59D7 (DSM 3968), ble plasmidet pCG59D7, omfattende *pyrA* genet, isolert og anvendt for kotransformasjon av en *A. niger pyrA* mutant. En slik *pyrA*-mutant er defekt i orotidin 5'-fosfat dekarboksylase genet og kan derfor ikke produsere det tilsvarende enzymet. En

slik mutant ble dannet ved behandling av conidiosporene til A. niger N756 under muterende UV-bestråling og kolonier som overlever i nærvær av fluor-orotinsyre og uridin blir selektert. Kolonier som overlever i nærvær av fluor-orotinsyre og fravær av uridin blir eliminert. Gjenstående uridin-krevende mutanter, ifølge deres evne til å være transformerbare, hører til to komplementeringsgrupper pyrA og pyrB, representert ved A. niger mutantene An8 og An10. De blir behandlet i form av protoplaster derav under transformerende betingelser med pyrA inneholdende plasmid pCG59D7 (DSM 3968). Bare A. niger An 8 (DSM 3917) koloniene ble funnet å bli transformert og å inneholde pyrA genet som vist ved hybridiseringsevnen til spaltet DNA derav med DNA til pUN 121.

15

Fremgangsmåte for fremstilling av Aspergillus-asparagin proteinase

Oppfinnelsen vedrører også en fremgangsmåte for fremstilling av en Aspergillus-asparagin proteinase ifølge oppfinnelsen, fortrinnsvis foretrukne former derav, omfattende dyrking av en vert transformert med en ekspresjonsvektor ifølge oppfinnelsen under betingelser egnede for ekspresjon av Aspergillus-asparagin proteinase genet. Når nødvendig polypeptidet isolert på konvensjonell måte. Avhengig av konstruksjonen til ekspresjonsvektoren blir Aspergillus-asparagin proteinase enten produsert eller, dersom en signal sekvens er til stede, produsert og utskilt fra cytoplasma inn i mediet eller andre cellulære rom.

30

Om en selektert vert er egnet for ekspresjon eller ikke avhenger hovedsakelig av de regulatoriske sekvensene valgt for konstruering av ekspresjonsvektoren, spesielt av promoteren.

35

For eksempel dersom en promoter avledet fra et Aspergillus, fortrinnsvis A. niger gen blir anvendt for ekspresjon av et

Aspergillus-asparagin proteinase gen ifølge oppfinnelsen er en Aspergillus stamme, fortrinnsvis A. niger en egnet vert. Dersom en promoter som ikke er avledet fra et Aspergillus gen blir anvendt for konstruksjon av en ekspresjonsvektor ifølge oppfinnelsen er andre verter egnede for ekspresjon, for eksempel bakterier så som E. coli eller gjær, så som S. cerevisiae. Egnede verter og promotere for fremstilling av polypeptider ifølge oppfinnelsen er også de som er egnede for transformeringen angitt ovenfor.

10

Oppfinnelsen vedrører spesielt en fremgangsmåte hvor en transformert Aspergillus vert uttrykker det eksogene Aspergillus-asparagin proteinasegenet under betingelser hvor endogen Aspergillus-asparagin proteinase gener er aktive og dermed uttrykker mer enn den naturlige mengden av Aspergillus-asparagin proteinase på grunn av den økte gendosen. For dette formålet blir Aspergillus verten, spesielt A. niger, transformert med en ekspresjonsvektor omfattende et Aspergillus-asparagin proteinasegen under kontroll av homologen derav, dvs. naturlig koblet, ekspresjonskontrollsekvenser, spesielt , promoter og signalsekvensen.

20

Oppfinnelsen vedrører også spesielt en fremgangsmåte hvor en transformert Aspergillus vert uttrykker det eksogene Aspergillus-Asparagin proteinase gen i høyere nivå eller under andre betingelser enn det endogene genet på grunn av at det er koblet til en annen promoter.

25

Betingelsene for maksimal ekspresjon av det eksogene genet eller genene avhenger av det valgte ekspresjonssystemet. Hvis for eksempel en promoter til en pectin lyase (PL) eller et polygalakturonase (PG) gen til A. niger blir anvendt er ekspresjonen av Aspergillus-asparagin proteinase genet koblet dertil induserbart i en A. niger celle ved tilsetning av pectin eller pectin degraderingsprodukter til kulturmediet. I nærvær av tilstrekkelig glukose er

30

35

promoteren derimot ikke induserbar dersom en *A. niger* stamme, for eksempel An8 (DSM 3917), blir anvendt som vert. Dette betyr at et *Aspergillus*-asparagin proteinasegen under kontroll av en *A. niger* PL eller PG promoter blir

5 "katabolit repressert" i *A. niger*. Dersom derimot en annen *Aspergillus* stamme blir anvendt, fortrinnsvis *A. oryzae* eller mest foretrukket *A. nidulans* blir et *Aspergillus*-asparagin proteinasegen under kontroll av en *A. niger* PL eller PG promoter uttrykt konstitutivt, dvs. også i fravær

10 av pectin og/eller i nærvær av glukose. Det kan derfor være fordelaktig å uttrykke et *Aspergillus*-asparagin proteinase gen under kontroll av en *A. niger* PL eller PG promoter i en *Aspergillus* vert forskjellig fra *A. niger*, fortrinnsvis *A. oryzae* eller mest foretrukket *A. nidulans*, på grunn av at

15 for eksempel glukose istedenfor pectin kan bli tilsatt til næringsmediet som energi- og karbonkilde i løpet av ekspresjonen av genet.

Dersom en *Aspergillus*, fortrinnsvis *A. niger*, pyruvat

20 kinase promoter blir anvendt for ekspresjon av et *Aspergillus*-asparagin proteinase gen blir genet uttrykt dersom et minimalt medium med glukose som karbon- og energikilde ble anvendt.

25 Det er nå mulig å overuttrykke *Aspergillus*-asparagin proteinase og forskjellige metoder kan bli anvendt. En rensset enkel *Aspergillus*-asparagin proteinase kan bli dannet ifølge en fremgangsmåte hvor en egnet vert som ikke kan uttrykke *Aspergillus*-asparagin proteinase eller som

30 uttrykker *Aspergillus*-asparagin proteinase i lave mengder eller som ikke uttrykker *Aspergillus*-asparagin proteinase under induksjonsbetingelsene anvendt for ekspresjon av eksogent *Aspergillus*-asparagin proteinase gen, blir transformert med en hybrid vektor omfattende et strukturelt

35 gen kodende for en *Aspergillus*-asparagin proteinase, fortrinnsvis fra *A. niger*, mest foretrukket PEPE vist i SEQ ID No. 1, eller et fragment av en *Aspergillus*-asparagin

proteinase asparagin proteinase aktivitet, og nevnte strukturelle gen blir uttrykt. Dersom en vert som ikke har evne til å uttrykke andre asparagin proteinaser blir anvendt kan den respektive enkelte Aspergillus-asparagin proteinasen bli oppnådd i ren form, dvs. ikke kontaminert av noen annen Aspergillus-asparagin proteinase.

En vert som ikke kan uttrykke noen Aspergillus-asparagin proteinase i hverken en mikroorganisme som ikke har noe tilsvarende gen eller en Aspergillus stamme hvor ekspresjonen av endogene Aspergillus-asparagin proteinase gener er undertrykt i et hensiktsmessig kondisjonert vekstmedium, mens den eksogene Aspergillus-asparagin proteinase promoteren operabelt koblet med det ønskede Aspergillus-asparagin proteinase strukturelle genet, for eksempel en A. niger avledet promoter er aktiv under disse betingelsene eller hvor Aspergillus-asparagin proteinase genet er koblet til en annen promoter.

Andre promotere og stammer egnede for preparering av Aspergillus-asparagin proteinase er gitt ovenfor i beskrivelsen av ekspresjonsvektorene ifølge oppfinnelsen.

Aspergillus-asparagin proteinase og anvendelse derav

Oppfinnelsen vedrører også en ren Aspergillus-asparagin proteinase i seg selv, heri betegnet "Aspergillus-asparagin proteinase". En slik protease forstås som (a) å være avledet fra Aspergillus spec., (b) utviser proteaseaktivitet på grunn av et katalytisk asparaginsyreresidie ved det aktive setet og (c) med tilstrekkelig aminosyresekvens homologi med kjente asparagin proteaser for å bli gruppert i asparagin proteinase familien. Innbefattet innenfor betegnelsen Aspergillus-asparagin proteinase er også fragmenter av et slikt enzym som har beholdt asparagin proteinase aktiviteten.

Oppfinnelsen vedrører fortrinnsvis en ren Aspergillus-asparagin proteinase av Aspergillus niger, fortrinnsvis asparagin proteasen PEPE som har aminosyresekvensen vist i sekvenslisten under SEQ ID NO. 1, og
5 fragmenter og mutanter derav som har beholdt asparagin protease aktiviteten.

Videre kan det frembringes enzymatiske sammensetninger som omfatter en eller flere av en Aspergillus asparagin
10 proteinase og/eller et derivat derav med asparagin protease aktivitet og/eller biologiske akseptable salter derav eventuelt i en forutbestemt kombinasjon med en eller flere egnede enzymer som har annen en Aspergillus-asparagin proteinase aktivitet.

15 Aspergillus stamme med mangler i Aspergillus-asparagin proteinase.

Oppfinnelsen vedrører også en mutert Aspergillus stamme, fortrinnsvis en mutert A. niger stamme, uten et endogent
20 Aspergillus-asparagin proteinase gen. Foretrukket er en A. niger stamme med mangel i pepE genet vist i SEQ ID NO. 1. Foretrukket er også en A. niger stamme med mangel i pepE genet og også i andre proteasegener så som pepA, pepB, pepC eller pepD.

25 En mutert Aspergillus stamme ifølge oppfinnelsen som har et defekt Aspergillus-asparagin proteinase gen kan i en foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen bli dannet ved genødeleggelse, det vil si en DNA sekvens som tilsvarer
30 det endogene Aspergillus genet som er ønskelig å ødelegge blir in vitro mutert til et defekt gen og transformert inn i Aspergillus vertscellen. På grunn av en homolog rekombinasjonshendelse i cellen blir det intakte endogene genet erstattet med det defekte eksogenet. Vanligvis blir det
35 eksogene genet ødelagt ved innskudd av et markør gen inn i den kodende regionen. Dette fører til et defekt gen som lett kan bli registrert og anvendt for selektering av

transformanter i det det tilsvarende endogene genet er ødelagt. Også andre metoder for mutagenese kan bli anvendt for preparering av en mutert *Aspergillus* stamme, fortrinnsvis en mutert *A. niger* stamme, hvor et endogent *Aspergillus*-asparagin proteinasegen er mutert på en slik måte at ingen funksjonell *Aspergillus*-asparagin proteinaser kan bli uttrykt.

I en mest foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen blir en *A. niger* stamme transformert med en hybridvektor omfattende en defekt mutant av *pepE* genet vist i SEQ ID NO. 1, for eksempel et ødelagt *pepE* gen hvor et seleksjonsmarkør gen er skutt inn, for eksempel som omfatter i plasmid pPEPEPYRA beskrevet i vedlagte eksempler, og transformanter blir selektert.

En mutant *Aspergillus* stamme ifølge oppfinnelsen som har et defekt *Aspergillus* asparagin proteinase gen er nyttig for ekspresjon av en forbedret produksjon av heterologe eller homologe proteiner enten intra- eller ekstracellulært.

Ekspresjon av heterologe eller homologe proteiner i *Aspergillus spec.* kan bli oppnådd i konvensjonelle metoder. Vanligvis blir en ekspresjonsvektor konstruert omfattende et homologt eller heterologt gen operabelt koblet med en homolog eller heterolog promoter som er funksjonell i *Aspergillus* og eventuelt med andre ekspresjonskontrollsekvenser som er funksjonelle i *Aspergillus*, for eksempel de som er definert ovenfor. Når nødvendig blir polypeptidet isolert på konvensjonell måte. Avhengig av konstruksjonen av ekspresjonsvektoren blir produktene enten produsert i vertscellen eller, dersom en signalsekvens er til stede produsert i cellen og utskilt.

Strukturelle gener i denne sammenheng utgjør for eksempel strukturelle gener med opprinnelse fra virus, prokaryote celler eller eukaryote celler og som kan bli avledet fra

genomisk DNA eller fra cDNA dannet via mRNA veien eller kan bli syntetisert kjemisk, kodende for mange forskjellige nyttige polypeptider, inkludert glykosylerte polypeptider, spesielt høyere eukaryoter, spesielt pattedyr, så som med opprinnelse fra dyr eller mennesker, så som enzymer som kan bli anvendt for eksempel for produksjon av næringsmidler og for å utføre enzymatiske reaksjoner i kjemi, eller polypeptider, som er nyttige og verdifulle for behandling av sykdommer i mennesker og dyr eller for forhindring derav, for eksempel hormoner, polypeptider med immunmodulatoriske, anti-virale og anti-tumor egenskaper, antistoffer, virale antigener, vaksiner, koaguleringsfaktorer, matvarer og lignende.

15 Eksempler på slike strukturelle gener er for eksempel de som koder for *Aspergillus* polygalakturonase, for eksempel PGI eller PGII, eller *Aspergillus* pectin lyase, for eksempel OLI, PLA, PLB, PLC, PLE eller PLF eller hormoner så som secretin, thymosin, relaxin, calcitonin, luteiniserende hormon, parathyroid hormon, adrenocorticotropin, melanocyt-stimulerende hormon, β -lipotropin, urogastron eller insulin, vekstfaktorer, så som epidermal vekstfaktor, insulin-lignende vekstfaktor (IGF), for eksempel IGF-I og IGF-II, mastcellevekstfaktor, nervevekstfaktor, glia avledet nervecellevekstfaktor eller transformerende vekstfaktor (TGF), så som TGF β , veksthormoner, så som humane eller bovine veksthormoner, interleukin, så som interleukin-1 eller -2, human makrofag migreringsinhibitorisk faktor (MIF), interferoner, så som human α -interferon, for eksempel interferon - α A, α B, α D eller α F, β -interferon, λ -interferon eller et hybrid interferon, for eksempel et α A- α D- eller et α B- α D hybrid interferon, spesielt hybridinterferon BDBB, proteinase inhibitorer så som α_1 -antitrypsin, SLPI og lignende,

35 hepatit virusantigener, så som hepatit virus overflate eller kjerneantigen eller hepatit A virusantigen, eller hepatit ikke ikkeA-ikkeB antigen, plasminogen aktivatorer,

så som vevsplasminogenaktivator eller urokinase, tumornekrosefaktor, somatostatin, renin, β -endorfin, immunoglobuliner, så som lett og/eller tunge kjeder av immunoglobulin D, E eller G, eller humane-muse hybrid immunoglobuliner, immunoglobulin bindende faktorer, så som 5 immunoglobulin E bindende faktor, kalsitonin, human kalsitonin-relatert peptid, blodkoaguleringsfaktorer, så som faktor IX eller VIIIC, erythropoietin, eglin, så som eglin C, hirudin, desulfatohirudin, så som desulfatohirudin 10 variant HV1, HV2 eller PA, human superoksid dismutase, viral thymidin kinase, β -kaktamase, glukose isomerase. Foretrukne gener er de som koder for et humant α -interferon eller hybridinterferon, spesielt hybrid interferon BDBB, human vevsplasminogenaktivator (t-PA), hepatit B virus 15 overflateantigen (HBVsAg), insulin-lignende vekstfaktor I og II, eglin C og desulfatohirudin, for eksempel variant HV1.

De mest foretrukne utførelsesformene er de som er beskrevet 20 i eksemplene nedenfor.

Eksempler

Følgende eksempler skal illustrere oppfinnelsen.

25 Forkortelsene har følgende betydninger:

BSA	bovint serumalbumin
DTT	1,4-dithiothreitol
EDTA	etylendiamintetraeddiksyre, dinatriumsalt
30 IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kbp	kilo basepar
PEG	polyetylen glykol
SDS	natriumdodecylsulfat
Tris	tris(hydroksymetyl)aminometan
35 X-gal	5-brom-4-klor-3-indolyl- β -galaktosid

Buffere, medier, reagenser

	SM	100 mM NaCl, 8.1 mM MgSO_3 , 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.01 % gelatin
5	LB	1% trypticase peptin (BBL). 0.5% gjærekstrakt (BBL), 1% NaCl og 0.5 mM Tris-HCl pH 7.5
	LM	1% trypticase pepton (BBL), 0.5% gjærekstrakt (BBL), 10 mM NaCl og 10 mM MgCl_2
10	SSC	0.15 M NaCl, 0.015 M tri-natriumcitrat
	PSB	10 mM tris-HCl, pH 7.6, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 .
15	TE	10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA pH 8.0
	Minimalt medium	1 liter inneholder 1.5 g KH_2PO_4 , 0.5 g KCl, 0.5 g $\text{MgSO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.9 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.06 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.06 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.29 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, nitrogen og karbonkilder, som spesifisert i teksten eller 6 g NaNO_3 og 10 g glukose pr. liter dersom disse kildene ikke er nevnt eksplisitt, justert til pH 6.0 med NaOH
20		
25	Fullstendig medium	minimalmedium med 6 g NaNO_3 og 10 g glukose pr liter, pluss pr. liter 2 g trypicase peptone (BBL), 1 g casaminsyrer (Difco), 1 g gjær-ekstrakt (BBL), 0.5 g ribonukleinsyrenatriumsalt fra gjør (1CN, Cleveland, USA), 2 ml vitamin-oppløsning, justert til pH 6.0 med NaOH
30		
	vitamin oppløsning	pr. 100 ml 10 mg thiamin, 100 mg riboflavin, 10 mg panthothensyre, 2 mg biotin, 10 mg p-aminobenzosyre, 100 mg nikotinamid, 50 mg pyridoxin-HCl
35		

	TBE	1 liter inneholdende 4 ml av en 0.5 M EDTA pH 8.0 oppløsning, 10.8 g Tris og 5,5 g H_3BO_3
5	Fenol	fenol behandlet som beskrevet av maniatitis et al., Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982 (s438)
10	prøvebuffer	10% (v/v) glycerol, 100 mM EDTA pH 8.0 og 0.01% bromfenol blå
	RNase A	RNase A behandlet som beskrevet av Maniatitis et al., Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory 1982(s451)

15 Følgende stammer og vektorer blir anvendt:

	<u>A.niger</u> N400	vill type
20	<u>A. niger</u> An8	uridinauxotrofisk mutant av pectinase kompleks sterkt produserende stamme A. niger N756, beskrevet i EP-A-0 278 355, deponert som DSM 3917.
25	<u>E. coli</u> LE392	F^- , hsdR514(r_k^- , m_k^+), supE44, supF58, lacY1 eller (lac1ZY) ₆ , galK2, galT22, metB1, trpR55, λ^- .
30	<u>E. coli</u> DH5 α F'	F' , endA1, hsdR17, (r_k^- , m_k^+), supE44, thi-1, recA1, gyrA, relA1,) 800lac Z M15, Δ (lac ZYA-argF)U169, λ^- .

35

EMBL4

EMBL4 er en lambda erstatningsvektor med en kloningskapasitet på 9-23 kbp (Frischauf et al., J. Mol. Biol. 170:827-842, 1983). Det inneholder en multippel kloningsregion mellom lambda armene og de ikke-essensielle innskuddsregionene. Dette muliggjør at mange restriksjonsenzymspaltninger kan bli utført på en måte slik at religering av innskuddet til vektor-armene blir redusert når fremmed DNA av interesse blir satt inn. Vektoren anvender også Spi fenotypen for å tilveiebringe en direkte seleksjon for rekombinanter (Zissler et al., i A.D. Hershey (ed.) The BACTERIOPHAGE lambda, Cold Spring Harbor Laboratory, 1971).

I eksemplene blir en serie oligonukleotider anvendt i PCR teknologi. Nedenfor følger en kort karakterisering av oligoene. Sekvensene er vist i sekvenslisten.

Oligonukleotid 1: Konstruert for å prime like før BamHI setet i pki promoteren.

Oligonukleotid 2: Konstruert for å innsette et PstI sete like før ATG til pyruvat kinase.

Oligonukleotid 3: Konstruert for å innsette et PstI sete like før ATG til pepE.

Oligonukleotid 4: Konstruert for å innsette et XhoI sete like etter stoppkodonet til pepE.

Oligonukleotid 5: Konstruert for å innsette et SallI sete like etter stoppkodonet til pyruvatkinase.

Oligonukleotid 6: Konstruert for å innsette et BamHI sete i enden av pyruvat kinase terminatoren.

5 Oligonukleotid 7: Konstruert for å "løkke ut" det første intronet i pepE.

! Oligonukleotid 8: Konstruert for å "løkke ut" det andre intronet i pepE.

10 Oligonukleotid 9: Konstruert for å "løkke ut" det tredje intronet i pepE.

Oligonukleotid A: Konstruert for å prime "run off" transkript fra pepE RNA.

15 Oligonukleotid B: Konstruert som PCR primer for å amplifisere deler av første og tredje og alt av andre eksoner til pepE.

20 Oligonukleotid C: Konstruert for å prime cDNA syntese fra pepE RNA for å amplifisere deler av første og tredje og alt av andre eksoner til pepE.

25 Oligonukleotid D: Konstruert som PCR primer for å amplifisere deler av tredje og fjerde eksoner til pepE.

30 Oligonukleotid E: Konstruert for å prime cDNA syntesen fra pepE RNA og amplifisere deler av tredje og fjerde eksoner av pepE.

Eksempel 1: Konstruksjon av genomisk bibliotek til Aspergillus niger

Eksempel 1.1: Isolering av DNA med høy molekylvekt fra *A. niger* N400

Conidiosporer til *Aspergillus niger* stamme N400 blir inokulert i 200 ml minimal medium til en final sporetetthet på 10^6 sporer/ml og ristet i 1 l Erlenmeyer i 24 timer ved 28°C ved 300 rpm. Mycelet blir høstet ved filtrering gjennom Myra cloth og en Buchner trakt, vasket med kaldt sterilt saltvann, frosset i flytende nitrogen og enten lagret ved -60°C eller anvendt direkte. Fremgangsmåten anvendt for isolering av DNA for å danne det genomiske biblioteket er basert på prosedyren beskrevet av Yelton et al. [Proc, natl. Acad. Sci. USA 81:1470-1474 (1984)].

For bibliotek konstruksjon blir 10 g mycel malt i flytende nitrogen i 1 g porsjoner i en Braun mikro-dismembrator. Malt mycel blir overført til en 1l steril erlenmeyer, inneholdende 200 ml ekstraheringsbuffer (50 mM EDTA pH 8.5, 0.2% SDS) og 200 µl dietylpyrokarbonat. Blandingen blir sakte oppvarmet til romtemperatur og deretter oppvarmet i 20 min. til 68°C med risting av og til. Suspensjonen blir avkjølt til romtemperatur og sentrifugert i 15 min. ved 12.000 x g. 1/16 volum av en 8 M kaliumacetatopløsning pH 4.2 blir tilsatt til supernatanten og blandingen blir oppbevart på is i 1 time. Presipitatet blir fjernet ved sentrifugering (20 min.; 16.000 x g; 4°C). Nukleinsyrene blir presipitert fra supernatanten ved inkubasjon med 0.6 volum isopropanol på is i 15 min. Presipitert nukleinsyre blir samlet ved sentrifugering (10 min.; 6000 x g; 4°C), vasket med 70% etanol og tørket. Pelleten blir suspendert i 10 ml TE inneholdende 2+ µg/ml RNase A, (Boehringer, Mannheim) og inkubert i 15 min. ved 37°C. DNA blir behandlet med nukleasefri pronase (1 mg/ml sluttkonsentrasjon) (Kochlight, Coinbrook) i 1 time ved 37°C.

35

8.5 g CsCl blir løst opp i 9 ml DNA oppløsning som er oppnådd og 0,2 ml 10 mg/ml ethidiumbromid blir tilsatt og

denne oppløsningen blir enten sentrifugert i en Beckman SW41 rotor i 60 timer ved 33.000 rpm, eller i en Beckman 50 Ti rotor i 40 timer ved 45.000 rpm. DNA båndet blir samlet og ethidiumbromid blir fjernet ved flere ekstraheringer med isopropanol ekvilibrert med en mettet oppløsning av NaCl i vann. 5 volum TE blir tilsatt og DNA oppløsningen blir sekvensielt behandlet med TE mettet fenol, fenol/kloroform/isoamylalkohol 25:24:1 og kloroform-(isoamylalkohol 24:1. DNA blir presipitert ved tilsetning av 0.1 volum 3 M natriumacetat pH 5.2, 2.5 volum etanol og inkubasjon over natt ved -20°C. Presipitatet blir samlet ved sentrifugering (1 t, 30.000 x g; 4°C), vasket med 70% etanol, tørket og oppløst i 40 µl TE.

15

Eksempel 1.2: Delvis spaltning av A. niger N400 DNA med MboI og isolering av fragmenter

For å teste MboI konsentrasjonen som gir størst mengde av DNA fragmenter mellom 13.6 og 23 kbp blir 1 µg deler av A. niger N400 DNA spaltet i hensiktsmessig buffer som er anbefalt av forhandleren med reduserende mengder MboI (0.5-0.001 U) i 1 time ved 37°C i et volum på 10 µl. Reaksjonen blir stoppet ved tilsetning av 1 µl 0.25 M EDTA og prøvene blir applisert på en 0.6% agarosegel i TBE buffer, inneholdende 1 µg/ml ethidiumbromid. MboI konsentrasjonen som er nødvendig for å tilveiebringe et høyt utbytte av ønskede 13.6-23 kbp fragmenter er omtrent 0.02 U/µg DNA. 200 µg DNA i et totalvolum på 2 ml blir spaltet. Etter 1 time ved 37°C blir EDTA tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 25 mM, enzymet blir varme-innaktivert ved 65°C i 10 minutter og DNA blir presipitert vasket, tørket og oppløst i 400 µl TE. Fragmentert DNA blir separert på en 0.4% preparativ agarosegel ved 4°C og 40 V (3 V/cm). Fragmenter med korrekt størrelse blir spaltet ut av gelen og DNA blir elektroeluert fra gelen i et sterilt dialyserør i 2 ml TBE i 2-3 timer ved 100 V. Strømmen blir reversert i 30 s og buffer inneholdende DNA blir samlet. Fragmentene blir

deretter konsentrert ved etanolpresipitering og oppløst i 100 μ l TE.

Eksempel 1.3: Preparering av vektor DNA

- 5 Det genomiske biblioteket til A. niger stamme N400 blir konstruert i lambda vektor EMBL4. Vektoren som har en kloningskapasitet på 9-23 kbp, er beskrevet av Frischauf et al. (J. Mol. Biol. 170:827-842 (1983)) og Karn et al. [Proc. natl. Acad. Sci. USA 77:5172-76(1980)] og kan bli
- 10 oppnådd fra Promega Biotechnology Inc. For å unngå at to innskudd som har opphav fra forskjellige deler av genomet blir klonet inn i et fag blir en minimal fragmentlengde på 13.6 kbp anvendt for kloningen.
- 15 10 μ g lambda EMBL4 DNA blir spaltet fullstendig med 50 enheter BamHI i bufferen anbefalt av forhandleren i et volum på 100 μ l i 2 timer ved 37°C. Enzymet blir inaktivert i 10 minutter ved 65°C. NaCl konsentrasjonen blir øket til 150 mM og 50 enheter SalI blir tilsatt og
- 20 inkubasjonen ved 37°C fortsetter i ytterligere 2 timer. Etter tilsetning av EDTA til 25 mM og inaktivering av enzymet ved oppvarming 5 min. ved 65°C. Oppløsningen blir ekstrahert med like volumer fenol (TE mettet), fenol/kloroform/isoamylalkohol 25:24:1, og kloroform/isoamylalkohol (24:1). For å eliminere små BamHI/SalI
- 25 polylinkerfragmenter blir DNA presipitert med 0.6 volum isopropanol etter tilsetning av 0.1 vol 3M natriumacetat pH 5.2. Etter 15 min. på is og 15 min. sentrifugering ved 12.000 x g ved 4°C blir presipitatet grundig vasket med 70%
- 30 etanol, tørket og oppløst i 40 μ l TE.

Eksempel 1.4: Ligering og in vitro pakking av genomisk A. niger N400 DNA fragmenter

- Det er essensielt at cos setene til vektoren dannet ifølge
- 35 eksempel 2.3 blir sammensmeltet før ligeringsreaksjonen. Vektoren i 100 mM Tris-HCl pH 7.5 og 10 mM MgCl₂ blir oppvarmet i 10 minutter ved 65°C og deretter sammensmeltet

i 1 time ved 42°C. Fra testligeringsene oppnås et forhold mellom vektor og fragmenter på omtrent 1:1 (i vekt) for å tilveiebringe flest rekombinanter. Ligeringsen ble utført i 50 mM Tris HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT og 1 mM ATP ved anvendelse av 9.5 µg vektor og 10 µg DNA fragmenter i et totalvolum på 100 µl. DNA ligase (BRL) blir tilsatt i en konsentrasjon på 0.5 U/µg DNA og ligeringsblandingen inkubert over natt ved 14°C. For å teste for ligering ble en prøve av ligert DNA kjørt på en agarose gel. Som en kontroll ble 0.5 µg vektor ligert uten tilsetning av fragmenter i et 5 µl volum.

Ligeringsblandingen blir konsentrert ved etanolpresipitering og oppløst i 20 µl TE før in vitro pakkingen. In vitro pakking blir utført med Promega Packagene ekstrakter ifølge forhandlerens instruksjoner ved anvendelse av 10 µl porsjoner for å pakke en 1 µg DNA. 1 µg kontroll fag lambda cI857 Sam7, med høy molekylvekt tilført med ekstraktene blir separat pakket som en kontroll. Etter pakking blir 500 µl fagopløsningsbuffer (PSB) og 5 µl kloroform tilsatt. Rekombinante fag stokker kan bli lagret ved 4°C.

Eksempel 1.5: Titrering og amplifisering av A. niger stamme N400 genomisk bibliotek

Celler av E. coli NM539 blir dyrket på LB medium inneholdende 0.2% maltose, 10 mM MgSO₄ og 1 mM CaCl₂ til en optisk tetthet (600 nm) av 1.0-0.2 ml alikvoter av denne kulturen blir tilsatt til 0.1 ml av en hensiktsmessig fagfortynning i PSB. Etter adsorpsjon av fagene i 20 min. ved 37°C blir 3 ml 0.6% LB topp-agar tilsatt ved 45°C, blandingen blir utsådd på LB agar-skåler og disse blir inkubert over natt ved 37°C. Antall plaquedannende enheter (pfu) pr. ml fagsuspensjon er på 12x10⁵ og 4.2x10⁵ pfu/ml for to fagstammer preparert ifølge eksempel 1.4. Etter subtrahering av bakgrunnen som blir beregnet ut fra kontrollligeringsene uten fragmenter (henholdsvis 17% og

40%) er det absolutte antallet rekombinanter 6×10^5 . DNA innbefattet i rekombinantene er ekvivalent med mer enn 200 av *Aspergillus niger* genomene.

- 5 For å amplifisere biblioteket blir 80 μ l alikvoter av begge fagstokkene anvendt for å infisere *E. coli* NM539 celler som blir sådd ut på LB topp-agar på LB-agar skåler og deretter inkubert over natt ved 37°C. Fagene blir eluert fra agarose ved forsiktig risting av skålene med 5 ml PSB pr. skål i 1
10 time ved romtemperatur. PSB blir samlet, sentrifugert (10 min. ved 6000 x g) for å fjerne bakterier og kloroform blir tilsatt (0.5% sluttkonsentrasjon). Begge fagstokkene som blir amplifisert omtrent i samme grad blir deretter blandet (40 μ l stamopløsning), titrert (8×10^9 pfu/ml) og lagret
15 ved 4°C.

Eksempel 2: Preparering av en *N. crassa* pep4 probe

Eksempel 2.1: Preparering av *N. crassa* probe.

- Plasmid pNCPEP4 inneholder et 3.8 kb fragment av *N. crassa*
20 DNA som koder for *N. crassa* peptidgenet. Deler av den kodende regionen kan hensiktsmessig bli spaltet ut med SallI. Plasmid pNCPEP4 blir derfor spaltet med SallI og fragmentene separert på en 1,2% agarosegel. 0.6 kb fragmenter blir spaltet ut og DNA blir elektroeluert. 100ng
25 av dette fragmentet blir nick translatert med 32 P-dATP som merket nukleotid og anvendt øyeblikkelig for enten Southern eller plaque løfteprobing.

Eksempel 2.2: Southern av *A. niger* DNA

- 30 2 μ g alikvoter av *A. niger* DNA, preparert som beskrevet ovenfor blir spaltet med enten BamHI eller HindIII og separert på en 0.8% agarosegel. Etter fotografering av ethidiumbromid farvet gel blir DNA overført til nitrocellulosefiltre ved kapillær blotting (Southern, E.M., J.
35 Mol. Biol. 98:503-517(1975)) og hybridisert som beskrevet i eksempel 3 med merket gjær PRB probe. Separate strimler av nitrocellulose inneholdende begge spaltninger blir utsatt

for forskjellige vaskeregimer for å bestemme betingelsene som ga sterkest signal/bakgrunnsstøyforhold. Det ble oppdaget at en vask i 2xSSC i 30 minutter ved romtemperatur etterfulgt av to 30 minutters vaskinger ved 56°C i 2xSSC gir de beste resultatene.

Eksempel 3: Screening av A. niger N400 biblioteket med N. crassa pep4 probe

Deler av det genomiske biblioteket til *Aspergillus niger* stamme N400 beskrevet ovenfor (eksempel 1) blir fortynnet u SM og 0,1 ml deler hver inneholdende omtrent 2000 pfu blir sådd ut. Vertscellene blir dannet ved inokulering av 50 ml LB-medium supplementert med 0.2% maltose med 0,5 ml av en over natt kultur av *E. coli* NM539 i LB-medium, risting i 4 timer ved 250 rpm ved 37°C, etterfulgt av tilsetning av 0.5 ml 1 M MgSO₄ og 0.5 ml 0.5 CaCl₂. 0.2 ml alikvoter av disse cellene blir hver blandet med en 0,1 ml del av fagsuspensjonen og inkubert ved romtemperatur i 1/2 time. Deretter blir 3 ml 0,7% agarose i LB-medium ved 47°C tilsatt, kort omrørt og øyeblikkelig sådd ut på LM agar skåler. Skålene blir inkubert over natt ved 37°C og avkjølt i 2 timer ved 4°C.

Fra hver skål blir to replikar dannet ifølge Benton og Davis plaquehybridiseringsmetode (Benton, W.D. og Davis, R.W., Science 196:180-182(1977)). Det første filteret (Schleicher and Schuell BA85) blir plassert på toppen av skålen i et minutt, andre replika i to min. og posisjonen til replikaene blir markert ved anvendelse av India blekk. Etter fjerning av filtrene blir de plassert i en skål inneholde 100 ml av en denaturerende oppløsning (1 M NaCl, 0.5 M NaOH) i 0.5 min, og deretter i 1 min, i 100 ml nøytraliseringsoppløsning (0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl). Filtrene blir overført til en skål inneholdende 3xSSC, blir forsiktig skrubbet med en behansket hånd for å fjerne bakterielt debris og blir skylt med 3xSSC. Filtrene blir blottet, tørket i 10 min. ved romtemperatur og bakt på

Whatman 3 MM papir i en ovn ved 80°C i 2 timer.

De bakte filtrene blir fuktet i 3xSSC, vasket i denne oppløsningen i 1 time ved romtemperatur og deretter
5 overført til en skål inneholdende 250 ml forvarmet (56°C) prehybridiseringsblanding (6xSSC, 10xDenhardts (0.2% BSA, Boehringer fraksjon V; 0.2% Ficoll 400, Pharmacia; 0.2% polyvinylpyrrolidon-10, Sigma), 0.1% SDS og 0,1 mg/ml snittet og frisk denaturert laksesperm DNA). Etter 1 time
10 prehybridisering ved 56°C i et listevannbad ble filtrene vasket en gang i 1/2 time i 250 ml forvarmet (56°C) hybridiseringsblanding som er den samme som prehybridiseringsblandingen med unntagelse av at den mangler laksesperm DNA. Deretter blir filtrene overført til
15 en skål inneholdende 150 ml forvarmet (56°C) hybridiseringsblanding hvor det tidligere var blitt tilsatt merket probe.

Etter hybridisering i 14 timer ved 65°C ble filtrene vasket
20 en gang i 250 ml etterfulgt av vasking ved romtemperatur og deretter ved 56°C i 250 ml 2xSSC, hver i 30 min. Filtrene blir tørket og eksponert for Kodak XAR5 film i en 1 til 3 dager ved -70°C ved anvendelse av en intensiverende skjerm.

25 På denne måten blir 3 positive signaler oppnådd fra de tre screenede platene. Positive plaque blir plukket ut med en steril Pasteur pipette ved forsiktig å posisjonere skålene på autoradiogrammet ved anvendelse av blekkmarkører. Biter av agar inneholdende positive plaque blir tilsatt til 1 ml
30 SM og 2.5 µl kloroform blir tilsatt. Fagene blir latt diffundere ut av agaren i 1 time ved romtemperatur, forsiktig vortex behandlet og deretter inkubert over natt ved 4°C. Agaren og celledetritus blir fjernet sentrifugering i 5 min., 2.5 µl kloroform blir tilsatt og fagstokkene blir
35 lagret ved 4°C.

De positive klonene blir betegnet λ_1 , λ_2 , λ_4 . På grunn av

at fagene blir sådd ut ved høy tetthet blir positive plaque
renset tre ganger ved utsåing av disse ved en lav tetthet
og ved å gjenta den fullstendige prosedyren med
replikaplating, hybridisering og plukking av positive
5 plaque.

Eksempel 4: Karakterisering av lambda kloner

Eksempel 4.1: Isolering av lambda DNA

For å isolere DNA fra rekombinante kloner blir fag først
10 amplifisert. For dette formålet blir E. coli LE392 vertsceller
dyrket til en optisk tetthet (600 nm) 1.0 i LB-medium
supplementert med 10 mM MgSO₄ og 0.2% maltose.
Deretter blir 50 µl av stamopløsningene av rensede fag
separat sådd ut som beskrevet ovenfor. Etter over natt
15 inkubering ved 37°C blir fagene eluert fra ikke-konfluente
skåler ved spredning av 5 ml SM over skålene og inkubering
i 2 timer ved forsiktig risting. Eluerte fag blir høstet og
0.1 ml kloroform tilsatt. Blandingen blir kort ristet og
cellulært debris fjernet ved sentrifugering. Supernatantene
20 blir isolert, kloroform tilsatt til 0.3% og det
resulterende skållysatet blir lagret ved 4°C.

For å oppnå nærmest konfluente skåler som utgangsmateriale
for isolering av fag DNA blir 10 ml porsjoner av
25 skållysatene sådd ut med E. coli LE392 vertsceller. Etter
over natt inkubasjon ved 37°C blir agarose topplaget
skrapet av tre nesten konfluente skåler. Disse lagene blir
kombinert, 20 ml SM og 0.4 ml kloroform blir tilsatt og den
resulterende blandingen blir ristet ved 37°C i 30 min.
30 Cellulært debris og agarose blir fjernet ved
sentrifugering, supernatanten isolert og volumet justert
til 18 ml med SM. Et likt volum 2M NaCl, 20% PEG6000 (BDH,
Poole, GB) i SM blir tilsatt og oppløsningene blir blandet
og plassert på is. Etter 75 min. blir fagene pelletert
35 ved sentrifugering i 20 min. ved 1200 x g ved 4°C.
Supernatanten blir dekantert og gjenværende fluid fjernet
med et Kleenex papir. Pelleten blir resuspendert i 3 ml SM

og deretter ekstrahert med 3 ml kloroform. Den vandige fasen blir behandlet med RNase A (67 µg/ml) og DNase I (33 µg/ml) i 20 min. ved 37°C. Deretter blir denne blandingen ekstrahert ved tilsetning av 2 ml fenol, ristet, tilsatt 1 ml kloroform, ristet på ny og deretter ble de to fasene separert ved sentrifugering. Den vandige fasen blir ekstrahert to ytterligere ganger med 3 ml fenol/kloroform (1:1) og 3 ml kloroform. Deretter blir DNA presipitert fra den vandige fasen ved sekvensiell tilsetning av 0.3 ml 3M natriumacetatbuffer (pH 5.2) og 6 ml etanol. Denne blandingen blir latt stå ved 4°C i 16 timer og deretter blir DNA isolert ved sentrifugering (10 min. 12000 x g, 4°C). Pelleten blir løst opp i 0.4 ml TE buffer, RNase A blir tilsatt til 200 µg/ml og inkubert ved 37°C i 1 time. DNA blir presipitert, ved tilsetning av 38 µl 3M acetatbuffer (pH 5.2) og 0.8 ml etanol ved 4°C i 1 time. DNA blir isolert ved sentrifugering og deretter løst opp i 100 µl TE.

20

Eksempel 4.2.: Restriksjonsanalyse av A. niger N400 pepE kloner

Det blir bestemt ved restriksjonsanalyse at alle tre fagene inneholder innskudd som er avledet fra den samme regionen av A. niger genomet og et delvis restriksjonskart av λ1 blir konstruert.

2 µg fag DNA blir spaltet med 20 enheter BamHI i et volum på 20 µl 1 time ved 37°C i bufferen anbefalt av forhandleren (BRL) og deretter oppvarmet ved 65°C i 10 minutter. Prøvene blir kjørt på en 0.7% agarosegel og fotografert. DNA blir overført til nitrocellulose membran og hybridisert med merket N. crasse pep4 probe. Det fremgår klart fra disse spaltingene at alle tre fagene er identiske og at et 5.8 kb fragment er det eneste fragmentet som hybridiserer til pep4 proben og dermed inneholder det meste om ikke det hele av det tilsvarende A. niger genet.

En av tre identiske fag blir betegnet $\lambda 1$ og blir valgt for ytterligere eksperimenter.

5 Eksempel 5: Kloning av PEPE inn i et plasmid og
sekvensering derav og karakterisering Eksempel 5.1:
Konstruksjon av PEPE

10 $\lambda 1$ DNA blir inkubert med restriksjonsenzymet BamHI, vesentlig som beskrevet ovenfor. Etter ekstrahering med kloroform blir DNA presipitert, pelletert ved sentrifugering, oppløst i prøvebuffer og utsatt for elektroforese på en 0.6% agarosegel i 11 x TBE buffer. En gelbir inneholdende 5.8 kbp BamHI fragment blir isolert og DNA elektroeluert. Dette blir deretter ekstrahert med 100 μ l kloroform og etanolpresipitert og på ny oppløst i 40 μ l
15 TE buffer. DNA konsentrasjonen blir vurdert ved agarose gelelektroforese etterfulgt av visualisering av båndet under UV lys.

20 pTZ18R vektoren blir dannet ved spaltning med BamHI under betingelser som er anbefalt av forhandleren (BRL). DNA blir ekstrahert med fenol, fenol/kloroform (1:1) og kloroform og DNA etanolpresipitert.

25 100 ng hver av ovennevnte fragmenter blir ligert sammen i et reaksjonsvolum på 25 μ l inneholdende bufferen anbefalt av BRL pluss ATP (1 mM), 1.5U av T4 DNA ligase (BRL). Reaksjonsblandingen blir inkubert i 16 timer ved 16°C og deretter anvendt for å transformere E. coli DH5aF'. Cellene blir sådd ut på LB agar skåler inneholdende 25 μ g/ml
30 ampicillin, 0.005% Xgal, 0.05mM IPTG og inkubert over natt ved 37°C.

35 Flere enkelte hvite kolonier blir anvendt for å danne over natt kulturer i LB medium supplementert med 0.1% glukose og 25 mg/ml ampicillin. Disse kulturrene blir anvendt for å isolere plasmid ved anvendelse av miniprep metoden til Holmes og Quigley [Holmes, D.S. og Quigley, M., Anal.

Biochem. 114:193(1981)]. Plasmidene blir spaltet med flere restriksjonsenzymmer ifølge anbefalninger til forhandleren (BRL) og i nærvær av RNase A (0.5 mg/ml), og produktene blir analysert på en agarosegel. Plasmidene som gir opphav
 5 til BamHI fragmentene med ventet størrelse blir selektert og E. coli celler inneholdende disse blir oppbevart på glycerol ved -20°C. Dette plasmidet blir betegnet pPEPE (deponert til DSM).

10 Eksempel 5.2: Nukleotidsekvensen til pepE

pepE subklonen, et 5.8 kbp BamHI fragment i pTZ18R vektoren blir delvis sekvensert ifølge dideoxy-kjede termineringsmetoden [Sanger et al., Proc. natl. Acad. Sci. USA 74:5463-67(1977)] ved anvendelse av syntetiske oligo-
 15 nukleotidprimere og sekvenase (United States Bicochemical Corp).

Den fullstendige nukleotidsekvensen er til stede i sekvenslisten. Den åpne leserammen blir identifisert ved sammen-
 20 ligning med andre kjente asparagin proteaser og dette blir bekreftet ved transkripsjonskartlegging.

Eksempel 5.3: RNA kartlegging av PEPE

Totalt RNA blir dannet ut fra malt frysetørket mycel som
 25 blir dyrket på minimalmedium med glukose som karbonkilde og ammoniakk som nitrogenkilde ifølge metoden til Frederick og Kinsey [Curr. Genet. 18:53-58(1990)]. 5'-enden til messenger RNA blir identifisert ved hybridisering av totalt RNA med 32-P endemerket oligonukleotid A (SEQ ID NO. 12) og
 30 størrelsesbestemming av "runoff" transkriptet produsert ved revers transkriptase på en sekvenseringsgel ved sammenligning med sekvenseringsreaksjoner produsert ved dideoxysekvensering med samme oligonukleotid (Maniatis et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring
 35 Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982). De nøyaktige spleisesetene til intronene blir identifisert ved kloning og sekvensering av del cDNA kopiene til pepE

message. Første trådsyntese blir utført ifølge standardmetoder (Maniatis et al., op. cit.) med unntagelse av at primingsoligonukleotidet er enten oligonukleotid C (SEQ ID NO. 14) eller oligonukleotid E (SEQ ID NO. 16).
5 Disse cDNA blir utsatt for PCR ved anvendelse av oligonukleotidene B (SEQ ID NO. 13) og C eller oligonukleotidene D (SEQ ID NO. 15) og E klonet inn i pTZ18R. Begge stammer av to uavhengige kloner av hver blir fullstendig sekvensert. Den totale lengden til mRNA produsert
10 av pepE genet blir bestemt ved Northern analyse ved anvendelse av 2.8 kb BamHI-BglIII fragment som probe (Maniatis et al., op cit) og blir bestemt å være mellom 1.3 og 1.5 kb som tilsvarer det som er ventet ut fra størrelsen til den åpne leserammen og posisjonen til transkripsjonsstartsetet.
15

Eksempel 6: Genomisk ødeleggelse av PEPE

Eksempel 6.1: Konstruksjon av pTZ18REE

pTZ18R blir spaltet ved det unike HindIII setet som blir
20 ifyllt med T4 polymerase og ligert i nærvær av et overskudd ufosforylert EcoRI linkere som har sekvensen 5'GGAATTC. Ved transformering inn i E. coli blir et plasmid pTZ18REE dannet som har to EcoRI seter, et i hver ende av polylinker sekvensen. Det korrekte plasmidet blir identifisert ved
25 sekvensering.

Eksempel 6.2: Konstruksjon av pPEPEPYRA

4 kb XbaI fragmentet inneholdende pyrA genet blir spaltet ut fra pAXI og renset fra vektorsekvensene. Fragmenter blir
30 behandlet med T4 polymerase for å fylle de klebrige endene, fenolekstrahert og etanolpresipitert.

pPEPE blir spaltet med EcoRI, defosforylert med bakteriell alkalisk fosfatase, behandlet med T4 polymerase for å
35 ifylle 5' overheng og deretter spaltet med BamHI. Fragmentene blir separert på en agarosegel og 3.4 kb EcoRI (butt)-BamHI fragment blir renset.

pPEPE blir spaltet med HindIII, defosforylert med bakteriell alkalisk fosfatase, behandlet med T4 polymerase for å ifylle 5' overheng og deretter spaltet med BamHI. 5 Fragmentene blir separert på en agarosegel og 1.4 kb HindIII(butt)-BamHI fragment blir rensset.

10 pTZ18R blir spaltet med BamHI og defosforylert med bakteriell alkalisk fosfatase.

Fire ovennevnte fragmenter blir ligert sammen. Etter transformering av *E. coli* blir kolonier inneholdende korrekte plasmider identifisert ved restriksjonsspaltning av mini-plasmid preparatene.

15 pPEPEPYRA bestpr av pTZ18R vektor inneholdende på EcoRI fragmentet som bærer PEPE genet, som har det sentrale EcoRI-HindIII og EcoRI-EcoRI fragmenter, som innbefatter det meste av moden protease åpen leseramme, erstattet med 20 et XbaI DNA fragment kodende for orotidin monofosfat dekarboksylase.

Eksempel 6.4: Transformasjon av *A. niger*

25 10 µg plasmid pPEPEPYRA blir spaltet fullstendig med EcoRI. Fullstendig spaltning ble undersøkt ved å kjøre en alikvot på en gel og gjenværende DNA blir fenolekstrahert, etanolpresipitert og resuspendert i 20 µl sterilt vann.

30 Conoidal sporer av auxotrofisk *A. niger* An8 (DSM 3917) blir dyrket i 4 dager ved 28°C på fullstendig medium helt til fullstendig sporulert. 2×10^8 conidiosporer blir anvendt for åinokulere 200 ml minimalmedium supplementert med 1 g/l arginin og uridin.

35 Etter 20 timers vekst ved 28°C ved 180 rpm blir mycelet høstet ved filtrering gjennom Micracloth, vasket to ganger

med 10 ml 0.8 M KCl, 50 mM CaCl₂ og resuspendert i 20 ml 0.8 M KCl, 50 mM CaCl₂, 0.5 mg/ml Novozym 234 (Novo Industries). Blandingen blir inkubert i et ristevannbad (30°C, 05 rpm) helt til tilstrekkelige protoplaster blir frigjort (detektert mikroskopisk etter 90-120 min.).
 5 Protoplastsuspensjonen blir filtrert gjennom en glassullplugg i en trakt for å fjerne myceldebris. Protoplastene blir pelletert ved forsiktig sentrifugering (10 min, 2000 rpm) ved romtemperatur og vasket to ganger
 10 med 10 ml 0.8 M KCl, 50 mM CaCl₂. Protoplastene blir til slutt resuspendert i 200-500 µl 0.8 M KCl, 50 mM CaCl₂ for å tilveiebringe en konsentrasjon på 1x10⁸ spheroplaster pr. ml.

15 For transformasjon blir en 200 µl alikvot av protoplastsuspensjonen inkubert med 5 µg EcoRI spaltet pPEPEPYRA 50 µl PCT (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 05 mM CaCl₂, 25% PEG 6000). Inkubasjonsblandingen blir oppbevart på is i 20 min., ytterligere 2 ml PCT ble tilsatt og blandingen inkubert i
 20 ytterligere 5 min. ved romtemperatur. 4 ml 0.8 M KCl, 50 mM CaCl₂ blir tilsatt og 1 ml alikvoter av den endelige transformasjonsoppløsningen blir blandet med flytende minimal agarmedium (minimalmedium + 1g/l arginin + 10g/l Bacto-Agar (Difco)), stabilisert med 0.8 M KCl. Blandingen
 25 blir øyeblikkelig helt på agarskåler av samme medium og inkubert ved 30°C.

Etter 2-3 dagers vekst ved 28°C fremkommer stabile transformanter som sterkt voksende og sporulerende kolonier
 30 på en bakgrunnsvekst av mange hundre små, tilsynelatende aborterende, transformanter.

Eksempel 6.5: Identifikasjon av genødeleggelse

Ut fra stabile kolonier blir individuelle sporesuspensjoner
 35 dannet og overført på frisk minimal pluss arginin skåler. Enkeltkolonier blir selektert og på utstrøket for å gi rene kulturer. Disse blir anvendt for å inokulere 200 ml

flytende minimal medium supplementert med 1 g/l arginin. Etter 24 timer ved 30°C risting ved 180 rpm blir mycelet høstet på filterpapir og papiret frysetørket. Etter tørking blir DNA dannet ut fra individuelle stykker ved maling av stykkene til et fint pulver med et stempel og morter. 60 mg av dette pulveret blir resuspendert i 3 ml 1% natriumdodecylsulfat, 0.1% Tween 80, 1 M ammoniumacetat ved omrøring. Dette blir oppvarmet ved 65°C i 20 min. med blanding av og til. Celledetritus blir separert fra DNA oppløsningen ved sentrifugering ved 15.000 rpm i 5 min. Supernatanten blir ekstrahert to ganger med fenol, to ganger med kloroform og etanolpresipitert. DNA pelleten blir reoppløst i 100 µl sterilt TE.

20 µl av hvert DNA blir spaltet med EcoRI i nærvær av 1 µg RNaseA i 1 time. Dette blir separert på en agarosegel og overført til nitrocellulosemembran og bakt. BgLII-HindIII fragmentet fra pPEPE inneholdende PEPE genet blir renset, merket ved nick translasjon og anvendt for å probe filtrene. Stammer som inneholder en ødeleggelse i pepE genet blir lett oppdaget ved at det mangler 0.5 kb EcoRI hybridiseringsfragment samt at det har endret bevegelighet i de andre to flankerende fragmentene.

En av disse stammene blir sådd ut på medium inneholdende uridin og 5-fluor-orotinsyre. Mutanter for pyrimidin auxotrofi blir identifisert ved sterkere vekst på dette mediet og blir plukket og renset ved utstryking av enkeltkolonier.

30

Eksempel 6.6: Produksjon av interferon i pepE⁻ A. niger stamme

En av pepE⁻ A. niger An8 stammene isolert i eksempel 6.5 blir anvendt som en vert for påfølgende transformasjon med PyrA⁺ inneholdende plasmider og ekspresjonskassetter inneholdende et heterologt gen for interferon.

35

Conidila sporer av uridin auxotrofisk pepE⁻ mutant av A. niger An8 blir dyrket i 4 dager ved 28°C i fullstendig medium helt til det var fullstendig sporulert. 2x10⁸ conidiosporer blir anvendt for å inokulere 200 ml minimal medium supplementert med 1 g/l arginin og uridin.

Etter 20 timers vekst ved 28°C og 180 rpm blir mycelet høstet ved filtrering gjennom Miracloth, vasket to ganger med 10 ml 0.8 M KCl, 05 mM CaCl₂ og resuspendert i 20 ml 0.8 M KCl, 50 mM CaCl₂, 0.5 mg/ml Novozym 234 (Novo Industries). Blandingen blir inkubert i et ristevannbad (30°C, 50 rpm) helt til tilstrekkelig protoplaster blir frigjort (detektert mikroskopisk etter 90-120 min.). Protoplastsuspensjonen blir filtrert gjennom en glassullplugg i en trakt for å fjerne myceliedebris. Protoplastene blir pelletert ved svak sentrifugering (10 min, 2000 rpm) ved romtemperatur og vasket to ganger med 10 ml 0.8 M KCl, 50 mM CaCl₂. Protoplastene blir til slutt resuspendert i 200-500 µl 0.8 M KCl, 50 mM CaCl₂ for å tilveiebringe en konsentrasjon på 1x10⁸/ml.

For transformasjon blir en 200 µl alikvot av protoplastsuspensjonen inkubert med 5 µg pAXI (DSM 7017) og 50 µg pGIIss-IFN AM119 eller pGII-IFN AM119 DNA (begge plasmider er fullstendig beskrevet i EP-søknad 0.421.919), 05 µl PCT (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM CaCl₂, 25% PEG 6000). Inkubasjonsblandingen blir oppbevart på is i 20 min., ytterligere 2 ml PCT blir tilsatt og blandingen inkubert i ytterligere 5 min. ved romtemperatur. 4 ml 0.8 M KCl, 50 mM CaCl₂ blir tilsatt og 1 ml alikvoter av den endelige transformasjonsoppløsningen blir blandet med flytende minimal agar medium (Minimal medium + 1 g/l arginin + 10 g/l Bacto-Agar (Difco)), stabilisert med 0.8 M KCl. Blandingene blir øyeblikkelig helt på agarskåler av samme medium og inkubert ved 30°C.

Etter 2-3 dagers vekst ved 28°C fremkommer stabile

transformanter som sterkt voksende og sporulerende kolonier på en bakgrunnsvekst av mange hundre små, antagelig vis aborterende, transformanter.

5 Transformanter blir plukket og analyser for interferon-ekspressjon. Interferonaktiviteten blir bestemt ifølge fremgangsmåten til Armstrong (J.A. Armstrong, Appl. Microbiol. 21, 732 (1971) ved anvendelse av humane CCL-23 celler og vesikulær stomatitis virus (VSV) som utfordrende virus.

10

Conidial sporer fra transformantene blir individuelt fordyrket i 50 ml av et forkulturmedium (Pectin Slow Set L (Unipectin, SA, Redon, France) 3 g/l, NH_2Cl_2 g/l, KH_2PO_4 , 0.5 g/l, NaCl 0.5 g/l, $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l, $\text{Ca}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5

15 g/l, pH 7.0, 1% arginin). Forkulturen blir inkubert i 72 timer ved 250 rpm og 28°C. 10% av forkulturen blir anvendt for åinokulere 50 ml av hovedkulturmediet (soyabønnemel 20 g/l, pectin Slow Set 5 g/l, 1% arginin). Kulturen blir dyrket i 72-96 timer ved 250 rpm og 28°C.

20

Ved forskjellige tidspunkter (hver 20 time) ble prøver tatt ut, cellene pelletert ved sentrifugering og oppbrutt ved frysetørring og tørkemaling. Supernatanter og celleekstrakter blir begge testet for interferonaktivitet

25 som beskrevet ovenfor. Hovedmengden av interferonaktiviteten blir funnet utskilt i mediet i transformanter inneholdende pGIIss-IFN AM119, mens i transformanter inneholdende pGII-IFN AM119 er det hovedsakelig i celleekstraktet.

30

Eksempel 7: Overekspressjon av pepE i A. niger

Eksempel 7.1: Overekspressjon av flere kopier

A, niger An8 blir transformert med 1 μg pAXI pluss 10 μg pPEPE for å tilveiebringe uridinprototrofer. Kolonier blir

35 rensset og DNA preparert som beskrevet ovenfor. Southern blot ved anvendelse av BglII-HindIII fragmentet til pPEPE viste at noen transformanter har en enkel kopi av pPEPE

integrert inn i deres genom, mens andre har opp til og over 10 ekstra kopier i deres genom. Deres stammer produserer derfor mer proteolytisk aktivitet og er mitototisk stabile.

5

Eksempel 7.2: Overekspressjon av pepE fra genfusjoner

Promoteren til *A. niger* pyruvat kinase blir amplifisert fra pGW1100 (DSM 5747) ved PCR teknologi ved anvendelse av nukleotid 1 (SEQ ID NO. 3) og oligonukleotid 2 (SEQ ID NO. 4). Fragmentet blir spaltet med BamHI og PstI og renset fra en agarosegel. Aspergillus-asparagin proteainase kodende region blir amplifisert fra pPEPE ved PCR teknologi ved anvendelse av oligonukleotid 3 (SEQ ID NO. 5) og oligonukleotid 4 (SEQ ID NO. 6). Fragmentet blir spaltet med PstI og XhoI og renset fra en agarosegel.

Terminatoren til *A. niger* pyruvatkinase blir amplifisert fra pGW1100 (DSM 5747) ved PCR teknologi ved anvendelse av oligonukleotid 5 (SEQ ID NO. 7) og oligonukleotid 6 (SEQ ID NO. 8). Fragmentet blir spaltet med BamHI og PstI og renset fra en agarosegel.

pTZ18R blir spaltet med BamHI og defosforylert med bakteriell alkalisk fosfatase.

25

Ligering av de fire fragmentene ovenfor og transformering av *E. coli* fører til dannelsen av plasmid pPKIPEPE hvor den korrekte strukturen blir bekreftet ved restriksjonsspaltning og sekvensering. pPKIPEPE inneholder et BamHI fragment skutt inn i pTZ18R, i det fragmentet inneholder en ekspresjonskassett bestående av pyruvat kinasepromoter til *A. niger* koblet til ATG startkodonet av pepE gen til *A. niger*, som blir terminert med pyruvat kinase terminator. pPKIPEPE blir anvendt med pAXI for å kotransformere *A. niger* An8 til uridin prototrofi.

30
35

Tilstedeværelse av pki-pepE fusjon blir bekreftet ved å

danne DNA fra individuelt rensede transformanter og anvendelse derav for Southern analyse ved anvendelse av prober fra pki og pepE. Stammer med en eller flere kopier av denne genfusjonen integrert inn i deres genom er vist å
 5 produsere mer proteolytisk aktivitet når cellene blir dyrket hurtig på glukose som C kilde.

Eksempel 8: Ekspresjon av pepE i andre organismer:

Ekspresjon i gjær

10 Plasmid pPEPE blir in vitro mutagenisert med tre syntetiske oligonukleotider vist i sekvenslisten som oligonukleotid 7, 8 og 9 under henholdsvis SEQ ID NO. 9, 10 og 11, som "løkker ut" alle tre intronene. Dette danner et plasmid pPEPEI hvor sekvensen blir bekreftet ved å fullføre
 15 sekvensering av den åpne leserammen.

pFBY129 (deponert som DSM 7016) blir spaltet med EcoRI og behandlet med S1 nuklease for å fjerne klebrige ender. Dette buttendede molekylet blir ligert med et overskudd
 20 ufosforylerte linkere av sekvensen 5'CCTGCAGG og transformert inn i E. coli. Det korrekte plasmidet med et PstI sete som erstatter EcoRI setet blir identifisert ved sekvensering og blir betegnet pFBY129P.

25 pFBY25 (DSM 7020) blir spaltet med SnaBI og behandlet med T4 polymerase for å fylle i endene. Dette buttendede molekylet blir religert med et overskudd av ufosforylerte linkere av sekvensen 5'GAGATCTC og transformert inn i E. coli. Det korrekte plasmidet med et BglII sete som
 30 erstatter SnaBI setet blir identifisert ved restriksjonsanalyse av plasmid minipreparatene og blir bekreftet ved sekvensering. Dette plasmidet blir betegnet pFBY25Bg. pFBY25Bg blir spaltet med BglII og defosforylert med bakteriell alkalisk fosfatase.

35

Et fragment blir amplifisert ved PCR fra pPEPEI ved anvendelse av oligonukleotidene 3 og 4. Dette fragmentet som

inneholder hele pepE åpen leseramme uten introner blir spaltet med PstI og XhoI og rensset fra en agarosegel.

5 Terminatoren til *A. niger* purryvat kinasegenet blir amplifisert pGW1100 (DSM 5747) ved PCR ved anvendelse av oligonukleotidene 5 og 6. Fragmenter blir spaltet med SalI og BamHI og rensset fra agarosegel.

10 Gal 10 gjærpromoterer blir spaltet fra pFBY129P BamHI og PstI og fragmentet blir rensset fra en agarosegel.

15 De tre fragmentene oppnådd ovenfor blir ligert sammen med BglII-spaltet og defosforylert pFBY25Bg for å tilveiebringe plasmid pGALPEPE. Den korrekte strukturen blir bekreftet ved restriksjonsanalyse. Plasmid pGALPEPE blir transformert inn i gjær og transformantene blir vist å produsere PEPE protein etter induksjon av ekspresjonen til det rekombinante genet med galaktose.

20 Deponering av mikroorganismer

Følgende mikroorganismer er deponert ifølge Budapest avtalen til Deutsche Sammlung von Mikroorganismen og Zellkulturen, Mascheroder Weg 1b, D-38124 braunschweig:

25	<u>Mikroorganisme/plasmid</u>	<u>Deponeringsdato</u>	<u>Deponeringsnr.</u>
	<u>E. coli</u> DH5_F'/pGW1100	januar 18, 1990	DSM 5747
	<u>A. niger</u> An8	desember 11, 1986	DSM 3917
	<u>E. coli</u> DH5_F'/pFBY129	mars 30, 1992	DSM 7016
	<u>E. coli</u> DH5_F'/pAXI	mars 30, 1992	DSM 7017
30	<u>E. coli</u> DH5_F'/pFBY25	mars 30, 1992	DSM 7020
	<u>E. coli</u> DH5_F'/pPEPE	oktober 7, 1993	DSM 8613
	<u>E. coli</u> BB4/pNCPEP4	oktober 7, 1993	DSM 8612

SEKVENSLISTE

(1) GENERELL INFORMASJON:

5

(i) APPLICANT:

- (A) NAME: CIBA-GEIGY AG
- (B) STREET: Klybeckstr. 141
- (C) CITY: Basel
- (E) COUNTRY: SCHWEIZ
- (F) POSTAL CODE (ZIP): 4002
- (G) TELEPHONE: +41 61 69 11 11
- (H) TELEFAX: + 41 61 696 79 76
- (I) TELEX: 962 991

10

15

(ii) TITLE OF INVENTION: Fungal Protease

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 16

20

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

25

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEKVENNS KARAKTERTREKK

30

- (A) LENGDE: 2875 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅDTYPE: dobbel
- (D) TOPOLOGI: lineær

35

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

(iii) HYPOTETISK: NEI

(iii) ANTI-SENS: NEI

(vi) OPPRINNELIG KILDE:

(A) ORGANISME: pepE

5 (B) STAMME: Aspergillus niger N400

(ix) TREKK:

(A) NAME/KEY: CDS

10 (B) LOCATION: join(1269..1370, 1462..1612, 1669..-
2323, 2382..2667)

(D) OTHER INFORMATION: /function= "Aspartic Protease"
/product= "PEPE"
/ gene= "pepE"

15 (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: intron

(B) LOCATION: order(1371..1461, 1613..1668,
2324..2381)

20 (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: exon

(B) LOCATION: join(1269..1370, 1462..1612,
1669..2323, 2382..2667)

25 (xi) SEKVENNS BESKRIVELSE: SEQ ID NO: 1:

```

GGATCCGGCC TTGCTACGTC CGGGTCGTTT GGACCGGAAG ATCGAGTTTC CGTCTTTGCG      60
CGACCGGCGT GAGCGCCGGT TGATTTTCTC TACGATAGCA TCCAAGATGT CGCTTTTCGCC      120
GGAAGTTGAC CTGGACTCGC TGATTGTGCG CAATGAGCCC CTCTCGGGTG CGGTCATTGC      180
CGCGATCATG CAAGAGCCGG GTCTCCGTGC TGTCCGGAAG AACCGTTACA ACATCATCCC      240
TAGGTCTGAT CTCGAGGATG CTTACGCCGC CCAGGTGAAG ACCGGACAGG AAGCGGATAG      300

```


	TCT ATC GCT TGC TAC CTC CAC AAC AAG TAT GAT TCG TCT GCC TCC AGT	1814
	Ser Ile Ala Cys Tyr Leu His Asn Lys Tyr Asp Ser Ser Ala Ser Ser	
	120 125 130	
5	ACG TAT CAC AAG AAT GGC AGT GAA TTC GCC ATC AAG TAC GGC TCT GGC	1862
	Thr Tyr His Lys Asn Gly Ser Glu Phe Ala Ile Lys Tyr Gly Ser Gly	
	135 140 145	
10	AGC CTT AGC GGA TTC GTT TCT CAG GAC ACC CTG AAG ATT GGC GAC CTG	1910
	Ser Leu Ser Gly Phe Val Ser Gln Asp Thr Leu Lys Ile Gly Asp Leu	
	150 155 160 165	
	AAG GTC AAG GGA CAG GAC TTC GCT GAG GCG ACC AAT GAG CCT GGC CTT	1958
15	Lys Val Lys Gly Gln Asp Phe Ala Glu Ala Thr Asn Glu Pro Gly Leu	
	170 175 180	
	GCC TTT GCC TTC GGC CGG TTC GAT GGC ATT CTC GGC TTG GGT TAT GAC	2006
	Ala Phe Ala Phe Gly Arg Phe Asp Gly Ile Leu Gly Leu Gly Tyr Asp	
20	185 190 195	
	ACC ATC TCC GTG AAC AAG ATT GTT CCT CCC TTC TAC AAC ATG CTT GAC	2054
	Thr Ile Ser Val Asn Lys Ile Val Pro Pro Phe Tyr Asn Met Leu Asp	
	200 205 210	
25	CAG GGG CTC CTC GAC GAG CCG GTC TTT GCC TTC TAC CTT GGA GAC ACC	2102
	Gln Gly Leu Leu Asp Glu Pro Val Phe Ala Phe Tyr Leu Gly Asp Thr	
	215 220 225	
	AAC AAG GAG GGT GAC GAG TCC GTG GCG ACC TTC GGT GGT GTC GAC AAG	2150
30	Asn Lys Glu Gly Asp Glu Ser Val Ala Thr Phe Gly Gly Val Asp Lys	
	230 235 240 245	
	GAC CAC TAC ACC GGC GAG CTG ATC AAG ATC CCC CTC CGG CGC AAG GCT	2198
35	Asp His Tyr Thr Gly Glu Leu Ile Lys Ile Pro Leu Arg Arg Lys Ala	
	250 255 260	

	TAC TGG GAG GTT GAG CTT GAC GCC ATT GCT CTT GGC GAT GAT GTT GCT	2246
	Tyr Trp Glu Val Glu Leu Asp Ala Ile Ala Leu Gly Asp Asp Val Ala	
5	265 270 275	
	GAG ATG GAG AAC ACC GGT GTC ATT CTG GAC ACT GGT ACC TCC CTG ATT	2294
	Glu Met Glu Asn Thr Gly Val Ile Leu Asp Thr Gly Thr Ser Leu Ile	
	280 285 290	
10	GCT CTG CCT GCT GAC CTG GCT GAG ATG AT GTAAGTCGAA TTCCTCGGAT	2343
	Ala Leu Pro Ala Asp Leu Ala Glu Met Ile	
	295 300	
15	TCCTGGGTTG AAAAGAAATG CTGCTAACAA CCTTCTAG C AAT GCT CAG ATC GGT	2397
	Asn Ala Gln Ile Gly	
	305	
	GCT AAG AAG GGC TGG ACC GGC CAG TAC ACC GTT GAC TGC GAC AAG CGC	2445
20	Ala Lys Lys Gly Trp Thr Gly Gln Tyr Thr Val Asp Cys Asp Lys Arg	
	310 315 320	
	TCG TCC CTG CCC GAT GTF ACT TTC ACC CTT GCC GGC CAC AAC TTC ACC	2493
	Ser Ser Leu Pro Asp Val Thr Phe Thr Leu Ala Gly His Asn Phe Thr	
25	325 330 335 340	
	ATC TCA TCG TAT GAC TAC ACC TTG GAG GTG CAG GGC TCT TGC GTC AGT	2541
	Ile Ser Ser Tyr Asp Tyr Thr Leu Glu Val Gln Gly Ser Cys Val Ser	
	345 350 355	
30	GCC TTC ATG GGC ATG GAC TTC CCT GAG CCG GTT GGT CCC TTG GCC ATT	2589
	Ala Phe Met Gly Met Asp Phe Pro Glu Pro Val Gly Pro Leu Ala Ile	
	360 365 370	
35	TTG GGC GAT GCG TTC CTG CGC AAG TGG TAC AGC GTG TAT GAC CTG GGC	2637
	Leu Gly Asp Ala Phe Leu Arg Lys Trp Tyr Ser Val Tyr Asp Leu Gly	
	375 380 385	

AAC AGC GCT GTT GGT CTG GCC AAG GCC AAG TAAATTAGTT CTGCGGGTTG 2687
 Asn Ser Ala Val Gly Leu Ala Lys Ala Lys
 390 395

ATGTGGTATC TATGATGCAG CTGTTGCTGT CATTATTGCT TCTTGTAGCT TGATCTATGA 2747

TTTTTCAGA CGAACACACG TGATGTTGTG AATGGTCTCA TGTTCGAGC GGTTCGCGGA 2807

TAGATTCTAG GGATCTTCAA TGGAAAGCCG GTGATATTAT TTGACATTA TTTGGGCACT 2867

GAAGATCT 2875

15

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEKVENNS KARAKTERTREKK:

20 (A) LENGDE: 398 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (C) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPPE: protein

25

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Ser Ala Ser Leu Leu Thr Ala Ser Val Leu Leu Gly Cys Ala
 1 5 10 15

30 Ser Ala Glu Val His Lys Leu Lys Leu Asn Lys Val Pro Leu Glu Glu
 20 25 30

Gln Leu Tyr Thr His Asn Ile Asp Ala His Val Arg Ala Leu Gly Gln
 35 40 45

Lys Tyr Met Gly Ile Arg Pro Ser Ile His Lys Glu Leu Val Glu Glu
 50 55 60

Asn Pro Ile Asn Asp Met Ser Arg His Asp Val Leu Val Asp Asn Phe
 65 70 75 80

5 Leu Asn Ala Gln Tyr Phe Ser Glu Ile Glu Leu Gly Thr Pro Pro Gln
 85 90 95

Lys Phe Lys Val Val Leu Asp Thr Gly Ser Ser Asn Leu Trp Val Pro
 100 105 110

10 Ser Ser Glu Cys Ser Ser Ile Ala Cys Tyr Leu His Asn Lys Tyr Asp
 115 120 125

Ser Ser Ala Ser Ser Thr Tyr His Lys Asn Gly Ser Glu Phe Ala Ile
 15 130 135 140

Lys Tyr Gly Ser Gly Ser Leu Ser Gly Phe Val Ser Gln Asp Thr Leu
 145 150 155 160

20 Lys Ile Gly Asp Leu Lys Val Lys Gly Gln Asp Phe Ala Glu Ala Thr
 165 170 175

Asn Glu Pro Gly Leu Ala Phe Ala Phe Gly Arg Phe Asp Gly Ile Leu
 180 185 190

25 Gly Leu Gly Tyr Asp Thr Ile Ser Val Asn Lys Ile Val Pro Pro Phe
 195 200 205

Tyr Asn Met Leu Asp Gln Gly Leu Leu Asp Glu Pro Val Phe Ala Phe
 30 210 215 220

Tyr Leu Gly Asp Thr Asn Lys Gln Gly Asp Glu Ser Val Ala Thr Phe
 225 230 235 240

35 Gly Gly Val Asp Lys Asp His Tyr Thr Gly Glu Leu Ile Lys Ile Pro
 245 250 255

Leu Arg Arg Lys Ala Tyr Trp Glu Val Glu Leu Asp Ala Ile Ala Leu
 260 265 270

5 Gly Asp Asp Val Ala Glu Met Glu Asn Thr Gly Val Ile Leu Asp Thr
 275 280 285

Gly Thr Ser Leu Ile Ala Leu Pro Ala Asp Leu Ala Glu Met Ile Asn
 290 295 300

10 Ala Gln Ile Gly Ala Lys Lys Gly Trp Thr Gly Gln Tyr Thr Val Asp
 305 310 315 320

Cys Asp Lys Arg Ser Ser Leu Pro Asp Val Thr Phe Thr Leu Ala Gly
 15 325 330 335

His Asn Phe Thr Ile Ser Ser Tyr Asp Tyr Thr Leu Glu Val Gln Gly
 340 345 350

20 Ser Cys Val Ser Ala Phe Met Gly Met Asp Phe Pro Glu Pro Val Gly
 355 360 365

Pro Leu Ala Ile Leu Gly Asp Ala Phe Leu Arg Lys Trp Tyr Ser Val
 370 375 380

25 Tyr Asp Leu Gly Asn Ser Ala Val Gly Leu Ala Lys Ala Lys
 385 390 395

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 3:

30

(1) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 18 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅDTYPE: enkel

35

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION; 1..18
- (D) OTHER INFORMATION: /standard_name "oligo-nucleotide 1"

5

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 3:

GGGACCTCGC TAGGAGAG

18

10

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 4:

(1) SEKVENSKARAKTERTREKK:

- (A) LENGDE: 30 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅDTYPE: enkel
- (D) TOPOLOGI: lineær

15

(11) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

20

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION; 1..30
- (D) OTHER INFORMATION: /standard_name "oligo-nucleotide 2"

25

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 4:

GCAGCTGCAG TGATTGATCT CTACTIONGAACC

30

30

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 5

(1) SEKVENSKARAKTERTREKK:

35

- (A) LENGDE: 30 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅDTYPE: enkel
- (D) TOPOLOGI: lineær

5

(11) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

(1x) TREKK:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION; 1..30
- (D) OTHER INFORMATION: /standard_name "oligo-nucleotide 3"

10

(x1) SEKVENNS BESKRIVELSE: SEQ ID NO: 5:

15

CCGCCTGCAG CCATCATGAA ATCAGCCTCC 30

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 6:

(1) SEKVENNS KARAKTERTREKK:

- (A) LENGDE: 30 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅDTYPE: enkel
- (D) TOPOLOGI: lineær

20

25

(11) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

(1x) TREKK:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION; 1..30
- (D) OTHER INFORMATION: /standard_name "oligo-nucleotide 4"

30

(x1) SEKVENNS BESKRIVELSE: SEQ ID NO: 6:

35

CAGACTCGAG TTACTTGGCC TTGGCCAGAC

30

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 7:

5 (1) SEKVENNS KARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 28 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅDTYPE: enkel

(D) TOPOLOGI: lineær

10

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

(ix) TREKK:

(A) NAME/KEY: misc_feature

15

(B) LOCATION: 1..28

(D) OTHER INFORMATION: /standard_name "oligo-
nucleotide 5"

(xi) SEKVENNS BESKRIVELSE: SEQ ID NO: 7:

20

GCTAGTCGAC ATGCAAAAGC AGTCTGGC

28

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 8:

25 (1) SEKVENNS KARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 28 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅDTYPE: enkel

(D) TOPOLOGI: lineær

30

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

(ix) TREKK:

35

(A) NAME/KEY: misc_feature
 (B) LOCATION; 1..28
 (D) OTHER INFORMATION: /standard_name "oligo-
 nucleotide 6"

5

(x1) SEKVENNS BESKRIVELSE: SEQ ID NO: 8:

CGATGGATCC TGATCCTCAA GGGATTCC 28

10 (2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 9:

(i) SEKVENNS KARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 36 basepar
 (B) TYPE: nukleinsyre
 15 (C) TRÅDTYPE: enkel
 (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

20 (ix) TREKK:

(A) NAME/KEY: misc_feature
 (B) LOCATION; 1..36
 (D) OTHER INFORMATION: /standard_name "oligo-
 nucleotide 7"

25

(x1) SEKVENNS BESKRIVELSE: SEQ ID NO: 9:

CCTCTGGAAG AGCAGCTTTA CACGCATAAC ATCGAC 36

30 (2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 10:

(i) SEKVENNS KARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 38 basepar
 (B) TYPE: nukleinsyre
 35 (C) TRÅDTYPE: enkel

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

5

(ix) TREKK:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION; 1..38

(D) OTHER INFORMATION: /standard_name "oligo-
nucleotide 8"

10

(xi) SEKVENS BESKRIVELSE: SEQ ID NO: 10:

CAACTTCCTG AACGCACAGT ACTTTTCTGA GATCGAGC

38

15

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 11:

(i) SEKVENS KARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 38 basepar

20

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅDTYPE: enkel

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

25

(ix) TREKK:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION; 1..38

(D) OTHER INFORMATION: /standard_name "oligo-
nucleotide 9"

30

(xi) SEKVENS BESKRIVELSE: SEQ ID NO: 11:

GCTGACCTGG CTGAGATGAT CAATGCTCAG ATCGGTGC

38

35

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 12:

(i) SEKVENNS KARAKTERTREKK:

- (A) LENGDE: 30 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅDTYPE: enkel
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

(ix) TREKK:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
(B) LOCATION; 1..30
(D) OTHER INFORMATION: /standard_name "oligo-
nucleotide A"

(xi) SEKVENNS BESKRIVELSE: SEQ ID NO: 12:

CAACAGCACG GATGCTGTGA GCAAGGAGGC 30

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 13:

(i) SEKVENNS KARAKTERTREKK:

- (A) LENGDE: 20 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅDTYPE: enkel
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

(ix) TREKK:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
(B) LOCATION; 1..20
(D) OTHER INFORMATION: /standard_name "oligo-
nucleotide B"

(x1) SEKVENNS BESKRIVELSE: SEQ ID NO: 13:

GGGCTGTGCC TCCGCCGAGG

20

5 (2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 14:

(1) SEKVENNS KARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 20 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

10 (C) TRÅDTYPE: enkel

(D) TOPOLOGI: lineær

(11) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

15 (ix) TREKK:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION: 1..20

(D) OTHER INFORMATION: /standard_name "oligo-
nucleotide C"

20

(x1) SEKVENNS BESKRIVELSE: SEQ ID NO: 14:

TAAGGCTGCC AGAGCCGTAC

20

25

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 15:

(1) SEKVENNS KARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 20 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅDTYPE: enkel

(D) TOPOLOGI: lineær

30

35

(11) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

(1x) TREKK:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION; 1..20

(D) OTHER INFORMATION: /standard_name "oligo-
nucleotide D"

5

(x1) SEKVENS BESKRIVELSE: SEQ ID NO: 15:

10 CGGTGTCATT CTGGACACTG

20

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 16:

(i) SEKVENS KARAKTERTREKK:

15

(A) LENGDE: 20 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅDTYPE: enkel

(D) TOPOLOGI: linear

20

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

(1x) TREKK:

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) LOCATION; 1..20

25

(D) OTHER INFORMATION: /standard_name "oligo-
nucleotide E"

(x1) SEKVENS BESKRIVELSE: SEQ ID NO: 16:

30

AGTAACATCG GGCAGGGACG

20

35

P a t e n t k r a v

1.

Isolert DNA molekyl, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
5 det omfatter en DNA-sekvens kodende for en A. niger
asparagin protease med aminosyresekvensen SEQ ID NO. 2.

2.

Hybridvektor, k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e n
10 omfatter en DNA-sekvens ifølge krav 1.

3.

Hybridvektor ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t
v e d a t e n DNA-sekvens kodende for en Aspergillus
15 niger asparagin protease er funksjonelt koblet til
regulatoriske regioner egnede for ekspresjon av et
Aspergillus niger asparagin protease gen i en egnet
vertscelle.

20 4.

Fremgangsmåte for fremstilling av en DNA-sekvens ifølge
krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d å dyrke en
vertscelle transformert med nevnte DNA-sekvens og isolering
av nevnte DNA-sekvens fra vertsceller.

25

5.

Aspergillus stamme defisient i et Aspergillus niger
asparagin proteasegen, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
genet er pepE-genet som har sekvensen ifølge SEQ ID NO. 1.

30

6.

Fremgangsmåte for fremstilling av en Aspergillus stamme
ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e n
omfatter (i) in vitro mutagenese av et Aspergillus niger
35 asparagin proteasegen, (ii) transformering av en
Aspergillus vert inneholdende et korresponderende endogent
kromosomalt Aspergillus niger asparagin proteasegen med

mutert eksogent gen, og (iii) isolering av mutanter hvori det endogene genet er erstattet med det muterte eksogene genet.

5 7.

Fremgangsmåte for fremstilling av et ønsket polypeptid, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter (i) transformering av en *Aspergillus* stamme ifølge krav 5 med en ekspresjonsvektor som inneholder en ekspresjonskassett
10 egnet for ekspresjon av det ønskede polypeptidet, (ii) dyrking av den transformerte *Aspergillus* verten under betingelser som muliggjør ekspresjon av det ønskede polypeptidet og (iii) isolering av det ønskede polypeptidet.

15

8.

A. niger asparagin protease, k a r a k t e r i s e r t v e d at den har aminosyresekvensen vist i SEQ ID NO. 2, og fragmenter derav som har asparagin protease aktivitet.

20

9.,

Fremgangsmåte for fremstilling av en *Aspergillus niger* asparagin protease, k a r a k t e r i s e r t v e d å dyrke en egnet vert som er transformert med en hybrid
25 ekspresjonsvektor ifølge krav 2 eller 3.

10.

Vert, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transformert med en hybrid ekspresjonsvektor ifølge krav 2 eller
30 3.

11.

Transformert vert ifølge krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er en *Aspergillus* stamme.

35

12.

Fremgangsmåte for fremstilling av en transformert vert

ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d å transformere en egnet vert ved en hybrid ekspresjonsvektor ifølge krav 2 eller 3.

5

10

15