

Új, expressziós szabályzó szekvenciák és
expressziós termékek fonalas gombákban

Kivonat

A találmány tárgyát képezik új, fonalas gombákból, pontosabban *Chrysosporium* nemzetséghez tartozó törzsekből származó enzimek, konkrétan: (1) 7. családba tartozó glikozil hidroláz (cellobio-hidroláz, CBH1), amely legalább 75%-ban azonos a 2. azonosítószámú aminosav-szekvenciával; (2) 10. családba tartozó glikozil hidroláz (endoxilanáz, XYL1), amely legalább 70%-ban azonos a 4. azonosítószámú aminosav-szekvenciával; és (3) glicerinaldehid-foszfát dehidrogenáz (GPD1), amely legalább 86%-ban azonos a 6. azonosítószámú aminosav-szekvenciával. A találmány tárgyát képezik továbbá az ilyen enzimeket kódoló nukleinsavszekvenciák, az enzimek expresszióját szabályzó szekvenciák, különösen promóter-szekvenciák. Ilyen gének expressziójára előnyösen alkalmazott gazdaszervezet gomba, különösen *Chrysosporium* törzs.

6-2-2011

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

A 2

**Új, expressziós szabályzó szekvenciák és
expressziós termékek fonalas gombákban**

A találmány tárgyát képezik új, fonalas gombákból, konkrétan *Chrysosporium* nemzetséghez tartozó törzsekből származó enzimek, és ezeket az enzimeket kódoló szekvenciák és az enzimek expresszióját szabályozó szekvenciák. A találmány a WO 00/20555.számú nemzetközi közzétételi iratban (PCT/NL99/00618, benyújtva 1999. október 6.) leírtak továbbfejlesztése, amely nem került közlésre az elsőbbség időpontja előtt. Ez utóbbi szabadalmi irat a kitanítás részét képezi.

Génexpresszióra szolgáló számos gazdaszervezetet és transzformációs eljárást leírtak már a szakirodalomban. Baktériumokat gyakran említenek, például *Escherichia coli*. Az *Escherichia coli* azonban olyan organizmus, amely nem képes számos fehérje vagy polipeptid szekréciójára, és mint ilyen, nem-kívánt gazdasejt fehérjék és polipeptidek ipari méretű termelésére. Az *E. coli* további előnytelen tulajdonsága, amely baktériumokra általánosságban érvényes, hogy a prokarióták nem biztosítják azokat a további módosításokat,

amelyek számos eukarióta fehérje vagy polipeptid aktív formában történő termeltetéséhez szükségesek. Például a fehérjék glikozilálása vagy megfelelő konformációjuk kialakulása olyan folyamatok, amelyek aktív fehérjék vagy polipeptidek előállításához szükségesek. Ilyen folyamatokhoz néha emlősszervezetből származó sejteket lehet alkalmazni; azonban az ilyen sejtek alkalmazása hátrányos bonyolult fenntartásuk és a költséges tápközeg miatt. Ezért az ilyen transzformációs rendszerek nem praktikusak fehérjék és polipeptidek ipari szintű termeltetésére. Elképzelhető, hogy alkalmazásuk olyan drága gyógyszerek esetén gazdaságos, amelyekből kis mennyiségekre van szükség, de bizonyosan nem ipari enzimek termelésére.

Számos, gombában működőképes expressziós rendszert fejlesztettek ki, például *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma reesei* törzsekben. Sok más rendszert javasoltak, de ezeket különféle okokból mégsem fogadták el, illetve alkalmazták széleskörűen. Általánosan megfogalmazva, az ideális gazdaszervezetnek számos követelménynek kell eleget tennie:

- Az ideális gazdaszervezetnek könnyen fermentálhatónak kell lennie, olcsó táptalaj alkalmazásával.

- Az ideális gazdaszervezetnek a tápközeget hatékonyan fel kell használnia.

- Az ideális gazdaszervezetnek nagy mennyiségben kell a polipeptideket vagy a fehérjéket termelnie, azaz magas fehérje/biomassza-arányt kell mutatnia.

- Az ideális gazdaszervezetnek képesnek kell lennie a fehérje vagy a polipeptid hatékony szekréciójára.

- Az ideális gazdaszervezetnek lehetővé kell tennie a kívánt fehérje vagy polipeptid könnyű izolálását és tisztítását.

- Az ideális gazdaszervezetnek a kívánt fehérjét vagy polipeptidet úgy kell posztranszlációsan módosítania (processzálnia), hogy azok aktív formában termelődjenek, és ne legyen szükség további aktiváló vagy módosító lépésekre.

- Az ideális gazdaszervezetnek könnyen transzformálhatónak kell lennie.

- Az ideális gazdaszervezetnek lehetővé kell tennie igen sokféle expressziós szabályozó elem alkalmazását, így biztosítva könnyű és sokoldalú alkalmazhatóságot.

- Az ideális gazdaszervezetnek lehetővé kell tennie szelektálható markerek könnyű alkalmazhatóságát, amelyeket olcsón alkalmazni.

- Az ideális gazdaszervezetnek stabil transzformánsokat kell termelnie.

- Az ideális gazdaszervezetnek lehetővé kell tennie tenyésztést olyan körülmények között, amely nem káros a fehérje- vagy polipeptid-termékre nézve, például alacsony viszkozitás, kismértékű nyírófeszültség mellett.

A Novo Nordisk cég által benyújtott, WO 96/02563. számú nemzetközi közzétételi iratban, valamint az 5,602004., 5,604,129. és 5,695,985. számú USA-beli szabadalmi leírásokban ismertetik az *Aspergillus* és *Trichoderma* rendszerek hátrányait, és feltételezik, hogy más gombafajok esetén al-

alkalmazott tenyésztési körülmények jobban megfelelhetnek felhasználásuk nagy mennyiségben történő termeltetésére. Valamilyen módon transzformált tenyészet például csak *Myceliophthora thermophila*, *Acremonium alabamense*, *Thielavia terrestris* és *Sporotrichum cellulophilum* törzsekre írtak le. A *Sporotrichum* törzsről leírták, hogy lizál és zöld pigmentet termel olyan fermentációs körülmények között, amely más törzseknél nem vezetett ilyen eredményre. *Thielavia terrestris* nem-spóráképző mutánsáról leírták, hogy morfológiai tulajdonságai alapján alkalmazott organizmus. Azonban azt is megállapították, hogy a *Thielavia* és *Acremonium* törzs (ahol az alkalmazott *Acremonium* törzs a *Thielavia* törzs tökéletlen változata volt) protoplaszt-képző hatékonysága alacsony, és azt, hogy higromicin szelektálható markerként nem alkalmazható. Sok más törzs morfológiai tulajdonságai alapján potenciálisan alkalmas lehetne, de transzformálásukat nem írták le. Javasolt törzsek: *Corynascus*, *Thermoascus*, *Chaetomium*, *Ctenomyces*, *Scytalidium* és *Talaromyces*. A transzformált gazdaszervezetekről megemlítik, hogy csak kis mennyiségű, bevitt, *Humicola*-eredetű xilanázt termelnek, amelyek közül a *Thielvia* termelt a legkisebb mennyiségben; azonban az információ nem egyértelmű, és tulajdonképpen azt is bizonyíthatja, hogy *Thielvia* a legelőnyösebben alkalmazható mikroorganizmus. A hivatkozásokban szereplő nomenklatura az ipari gombák 1994. évi ATCC-neveire alapult. Tehát úgy tűnik, hogy nem értek el nagymértékű heterológ expressziót, és tulajdonképpen nem lehetett közvetlen, pozitív összefüggést levezetni az ala-



pul tekintett morfológia és az expresszió mértéke között. Ha fel is lehetett állítani bármilyen összefüggést, az sokkal inkább negatív volt. Gombák 1996. évi osztályozása szerint, *Sprotrichum thermophilum* ATCC 20493 megfelel egy *Myceliophthora thermiphila* törzsnek. Jelenleg a törzset még *Myceliophthora thermophilaként* azonosítják. A közelmúltban megjelent közlemények alapján a technika fejlődési iránya előre nem látható.

A Novo Nordisk által közölt, WO 97/26330. számú nemzetközi közzétételi iratban leírt eljárás szerint, előállítanak javított tulajdonságokkal rendelkező mutánsokat fonalas gomba szülői sejtjeiből, heterológ polipeptidek termelése céljából. Az eljárásban először specifikusan megváltoztatják a morfológiát, majd meghatározzák, hogy vajon a transzformáns több heterológ polipeptidet termel-e, mint a szülői törzs. Az eljárást csak *Fusarium* A3/5 és *Aspergillus oryzae* törzsekkel szemléltetik. Feltételezik, hogy az eljárás alkalmazható *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Thielavia*, *Fusarium*, *Neurospora*, *Acremonium*, *Tolypocladium*, *Humicola*, *Scytalidium*, *Myceliophthora* vagy *Mucor* törzsekkel is. A fentebb leírtak szerint, a technika fejlődési irányának kiszámíthatatlansága, és továbbá az idézett bejelentésekben leírt eljárások kiszámíthatatlansága miatt nem rendelkezünk egy olyan általánosan alkalmazható kitanítással, amely alapján indokoltan számíthatnák sikerekre.

A WO 00/20555. számú nemzetközi közzétételi iratban leírunk egy alternatív, gombában működőképes, expressziós rendszert, amelyben egyszerűen a fentebb említett



Aspregillit és *Trichodermát* alkalmazzuk, és kielégíti fenti követelményeket. Az új rendszer további előnyökkel rendelkezik: a transzformációs hatékonyság jobb, mint a gyakran alkalmazott *Trichoderma reesei* rendszeré. Továbbá a tenyésztési körülmények olyan további előnyt biztosítanak, amely előnyös a polipeptid-termékre nézve.

Számos, ipari szempontból érdekes, *Chrysosporium* törzsekből származó enzimet leírunk most teljes szekvenciainformációkkal együtt. Leírunk új, *Chrysosporium* törzsekből származó promóterrendszereket is, amelyek homológ és heterológ gének expressziójára alkalmazhatók.

A találmány tárgyát különösen glikozil hidrolázok 7. családja (például cellobio-hidrolázok) és 10. családja (például xilanázok) és glicerinaldehid-foszfát dehidrogenázok képezik, aminosav-szekvenciáik alapján azonosítva, valamint az említett enzim-fehérjékből származó peptidek, és az említett peptideket és fehérjéket kódoló nukleinsavszekvenciák, valamint különösen a génekkel kapcsolatos szabályzó szekvenciák.

A találmány tárgyát képezik különösen a fentebb említett három osztályból származó, izolált vagy rekombináns enzim-fehérjék vagy aktív részeik, beleértve olyan mutánsait, amelyek legalább egy bizonyos mértékben azonos szekvenciával rendelkeznek, a lentebb leírtak és a szabadalmi igénypontokban ismertetettek szerint, valamint ezeket a fehérjéket vagy részeiket kódoló nukleinsavszekvenciák és/vagy expressziójukat szabályzó nukleinsavszekvenciák. Ezek az enzimek konkrétan: (1) 7. családba tartozó glikozil

hidroláz (cellobio-hidroláz, CBH1), amely legalább 75%-ban, előnyösen legalább 80%-ban, sőt, legalább 85%-ban azonos a 2. azonosítószámú aminosav-szekvenciával; (2) 10. családba tartozó glikozil hidroláz (endoxilanáz, XYL1), amely legalább 70%-ban, előnyösen legalább 75%-ban, sőt, legalább 80%-ban azonos a 4. azonosítószámú aminosav-szekvenciával; és (3) glicerinaldehid-foszfát dehidrogenáz (GPD1), amely legalább 86%-ban, előnyösen legalább 90%-ban, sőt, legalább 93%-ban azonos a 6. azonosítószámú aminosav-szekvenciával. Szintén a találmány tárgyát képezik előnyösen olyan polipeptidek és ezeket a polipeptideket kódoló nukleinsavszekvenciák, amely polipeptidek legalább 20, előnyösen legalább 30 folyamatosan egymáshoz kapcsolódó aminosavat tartalmaznak a 2., 4. vagy 6. azonosítószámú aminosav-szekvenciákból. A megfelelő nukleotidszekvenciákat bemutatjuk 1. (cbh1), 3. (xyl1) és 5. (gpd1) azonosítószámú szekvenciaként, sorrendben.

A rekombináns enzimek tartalmazhatják lényegében a teljes fehérjét, vagy rövidített fehérjét, amely az enzimaktivitás legalább egy részével rendelkezik. Az ilyen rövidített rész lehet katalitikus domén, vagy az általuk tartalmazott aminosavak legalább körülbelül 75%-a. Például a találmány szerinti CBH1 katalitikus doménje a 2. azonosítószámú aminosav-szekvencia 20-495. aminosavait tartalmazza, a találmány szerinti XYL1 katalitikus doménje a 4. azonosítószámú aminosav-szekvencia 54-384. aminosavait tartalmazza. A katalitikus domén kombinálva lehet, vagy nem lehet kombinálva másik fehérjéből származó szignálszekvenciával



és/vagy másik enzim-fehérjéből származó szénhidrátkötő doménnel. Ezzel alternatív módon, a találmány szerinti enzimek (CBH1 és XYL1) cellulózkötő doménje fuzionálva lehet más enzim-fehérje katalitikus doménjéhez.

A találmány szerinti nukleinsavszekvenciák lehetnek teljes fehérjekódoló régiók vagy oligonukleotidok, vagy előnyösen expressziós szabályzó szekvenciák. Oligonukleotidokat próbaként is lehet alkalmazni az 1., 3., és 5. azonosítószámú szekvenciával rendelkező géneknek megfelelő, de azokkal nem azonos gének azonosítására; ezek a gének, ha megfelelnek a leírásban meghatározott százalékos azonossági követelményeknek, valamint kódoló és nem kódoló részeik és expressziós termékeik szintén a találmány tárgyát képezik. Az oligonukleotidok előnyösen 15-75, legelőnyösebben 20-50 nukleotid hosszúságúak.

Szintén a találmány tárgyát képezik expressziós rendszerek (kazetták), amelyben a három fehérjeosztály bármelyikéből származó expressziós szabályzó régió (beleértve promótert) fuzionálva van egy másik, kérdéses fehérjét kódoló génhez; vagy az említett fehérjék bármelyikét kódoló régió fuzionálva van egy másik expressziós szabályzó régióhoz; vagy az említett, új fehérjéknek megfelelő expressziós szabályzó régiót és fehérjekódoló régiót egyaránt tartalmazza. Az expressziót szabályzó régió legalább 60%-ot, előnyösen legalább 70%-ot, még előnyösebben legalább 75%-ot, sőt, akár 80%-ot is tartalmaz az 1., 3. vagy 5. azonosítószámú szekvencia 5'-végi nem-kódoló régiójából, és/vagy legalább 20, speciális esetben legalább 40 folyamatosan egy-



máshoz kapcsolódó nukleotidot tartalmaz az említett, 5'-végi nem-kódoló régiókból. A találmány szerinti gének 3'-végi nem-kódoló régióiból hasonlóképpen származó terminációs szekvenciák szintén alkalmazhatók az expressziós kazettákban, akár homológ vagy heterológ génekkel kombinációban is.

A találmány szerinti polinukleotidok és oligonukleotidok rendelkezhetnek egy minimális szekvenciaazonossággal a megfelelő 1., 3. vagy 5. azonosítószámú szekvenciához képest, vagy ezzel alternatív módon, sztringens körülmények között képesek hibridizálódni az adott szekvenciákkal. Sztringens hibridizációs körülményeken szakember által ismert körülményeket értünk, például hibridizációt 6 x SSC-t (20 x SSC elkészítése: 1000 ml oldat 175,3 g nátrium-kloridot, 107,1 g nátrium-citrát x 5 H₂O-t tartalmaz, pH 7,0-re állítva) 0,1% SDS-t, 0,05% nátrium-pirofoszfátot, 5 * Denhardt-féle oldatot és 20 µg/ml denaturált heringsperma-DNS-t tartalmazó oldatban, 56°C-on, 18-24 óra hosszáig, melyet két 30 perces mosás követ 5 x SSC-t és 0,1% SDS-t tartalmazó oldatban, 56°C-on, és két 30 perces mosás követ 2 x SSC-t és 0,01% SDS-t tartalmazó oldatban 56°C-on.

Az expressziós rendszereket tartalmazhatja *Chrysosporium* gazdaszervezet, például *Chrysosporium lucknowense* gazdaszervezet, vagy más nem-gomba, előnyösen gomba-gazdaszervezet. Más gomba-gazdaszervezetek lehetnek például *Chrysosporium*-fajok és törzsek, *Fusarium*-fajok, *Aspergillus*-fajok, stb. Ezek a gazdaszervezetek előnyösen olyan gazdaszervezetek lehetnek, amelyek maguktól, lényegi



tulajdonságuknál fogva vagy tenyésztési körülmények eredményeként nem képesek termelni a kérdéses fehérjének megfelelő fehérjét, így egyszerűsíthető a kérdéses fehérje kinyelése.

A leírásban és a csatolt szabadalmi igénypontokban a „polipeptidek” vagy „peptidek” vagy „kérdéses polipeptidek” vagy „kérdéses peptidek” kifejezéseken, a találmány szerinti rendszer expressziós termékeként olyan fehérjét, azaz polipeptideket értünk, amelyeknek adott funkciójuk és/vagy szekunder és/vagy terciér struktúrájuk van. Ahol százalékos aminosav-azonosságra hivatkozunk, az ilyen azonosság a teljes fehérjére, vagy egy olyan konkrét részére vonatkozik, melyet kezdő és befejező aminosav-helyzet határoz meg, általánosan alkalmazott BLAST-algoritmussal meghatározva.

A WO 00/20555. számú nemzetközi közzétételi iratban leírt, gombában működőképes expressziós rendszerben, a tenyésztet táptalajának pH-ja semleges vagy lúgos lehet, így a termelt fehérje vagy polipeptid nincs kitéve tovább agresszív és potenciálisan inaktiváló savas pH-nak. Savas pH-n is lehetséges a tenyésztés, például pH 4-en olyan esetekben, ha a fehérjének vagy polipeptidnek kedvezőbb a savas közeg. A tenyésztés előnyösen 4,0 és 10,0 közötti pH-n történhet. Azonban előnyösen semleges és lúgos pH-t alkalmazunk, mivel a gazda-törzs jobban növekszik ilyen pH-n, például 6 és 9 közötti pH-n. Lúgos pH-n való növesztés, amely 8-nál magasabb, sőt, akár 10-es pH is történhet, néhány esetben szintén jelenthet jó alternatív megoldást. A tenyésztés hőmérséklete ilyen gazda-törzsek esetén szintén



előnyös lehet bizonyos típusú, termelt polipeptidek stabilitása szempontjából. A tenyésztés hőmérséklete előnyösen 23-43°C közötti. Nyilvánvaló, hogy az említett körülmények különösen érdekesek emlősszervezetből származó polipeptidek esetén. A kiválasztott hőmérséklet függ a tenyésztés gazdaságosságától, és a polipeptid vagy a tenyésztett törzs érzékenységétől.

Azt is meghatároztuk, hogy a biomassza/viszkozitás-arány és a termelődött fehérje mennyisége kimagaslóan kedvezőbb *Chrysosporium* gazdaszervezetre. Összehasonlításokat végeztünk *Trichoderma longibrachiatum*mal (amely régebben *Trichoderma reesei*ként is ismeretes volt) és *Aspergillus niger*el. *Trichoderma longibrachiatum* 2,5-5 g/l biomasszát termelt, *Aspergillus niger* 5-10 g/l biomasszát és *Chrysosporium* 0,5-1 g/l biomasszát termelt az adott törzsekre külön-külön optimalizált körülmények között. Ez így 5-10-szeres javulást eredményez az ipari törzsekhez viszonyítva. A találmány tárgyát képezik expressziós rendszerek, amelyek heterológ fehérjét vagy polipeptidet kódoló nukleinsavszekvenciát tartalmaznak, működőképesen kapcsolva expressziós szabályozó régióhoz, melyet lentebb leírunk, és adott esetben szekréción szignálszekvenciát kódoló szekvenciához és/vagy hordozó fehérjét kódoló szekvenciához. A találmány szerinti rekombináns törzs előnyösen szekretálja a kérdéses polipeptidet. Így nem szükséges a sejt feltárása a kérdéses polipeptid izolálása céljából, és minimalizálja annak a kockázatát is, hogy a gazdasejt többi komponense az expresszált terméket degradálja.



*Chrysosporium*ot morfológia alapján lehet meghatározni, Barnett és Hunter által leírtak szerint [„Illustrated Genera of Imperfect Fungi”, 3. kiadás, Burgess Publishing Company (1972)]. További, a *Chrysosporium* nemzetséghez tartozó gombák osztályozására vonatkozó, további részletek is ismertek, például a „Sutton Classification” [Van Oorschot, C.A.N. „A revision of *Chrysosporium* and allied genera” a „Studies in Mycology No. 20. of the CBS in Baarn” c. könyvben, Hollandia, 1-36. old. (1980)]. A CBS a Budapesti Szerződéssel összhangban működő törzsgyűjtemény. Az említett közlemények kitanításai szerint a *Chrysosporium* nemzetség a *Hyphomycetales* rendbe tartozó, *Moniliaceae* család tagja. Az alábbi törzseket *Chrysosporium*ként határozták meg, de a *Chrysosporium*-definíció nem korlátozódik az alábbi törzsekre: *C. botryoides*, *C. carmichaelii*, *C. crassitunicatum*, *C. europae*, *C. evolceannui*, *C. farinicola*, *C. fastidium*, *C. filiforme*, *C. gorgiae*, *C. globiferum*, *C. globiferum* var. *articulatum*, *C. globiferum* var. *niveum*, *C. hirundo*, *C. hispanicum*, *C. holmii*, *C. indicum*, *C. inops*, *C. keratinophilum*, *C. kreiselii*, *C. kuzurovianum*, *C. lignorum*, *C. lobatum*, *C. lucknowense*, *C. lucknowense* Garg 27K, *C. medium*, *C. medium* var. *spissescens*, *C. mephiticum*, *C. merdarium*, *C. merdarium* var. *roseum*, *C. minor*, *C. pannicola*, *C. parvum*, *C. parvum* var. *crescens*, *C. pilosum*, *C. pseudomerdarium*, *C. pyriformis*, *C. queenslandicum*, *C. sigleri*, *C. sulfureum*, *C. synchronum*, *C. tropicum*, *C. undulatum*, *C. vallenarense*, *C. vespertilium*, *C. zonatum*.



A *C. lucknowense* az egyik olyan *Chrysosporium*-faj, amelyre különös érdeklődés irányult, mivel nagy mennyiségben termelt természetes módon celluláz-fehérjéket (lásd a WO 98/15633. számú nemzetközi közzétételi iratot és az ehhez kapcsolódó 5,811,381. számú USA-beli szabadalmi leírást). Az említett *Chrysosporium lucknowense* az alábbi tulajdonságokkal rendelkezik:

A kolóniák körülbelül 55 mm átmérőt értek el 14 nap alatt Sabouraud-féle glükóz-agaron; fehér-krémszínűek, filcszerűek, bolyhosak; sűrűek és 3-5 mm magasak; a szélek határozottak, szabályosak és rojtosak; a hátoldal halvány-sárga és krémszín közötti. A hifák átlátszóak, sima és vékony falúak, kis elágazásokkal. A táptalaj feletti részen a gombafonalak többnyire termékenyek, szorosan válaszfalask, körülbelül 1-3,5 μm kiterjedésűek. A táptalajban lévő hifák terméketlenek, körülbelül 1-4,5 μm kiterjedésűek, a vékonyabb hifák gyakran deformáltak. A konídiumok terminálisak és laterálisak; többnyire szár nélküliek vagy rövid, gyakran kúp alakú nyúlványokon vagy rövid oldalágakon ülnek. A konídiumok magányosak, de szorosan egymás mellett helyezkednek el, 1-4 konídium fejlődik egy hifasejten, majdnem átlátszóak, jól kivehetően vékony és sima falúak, többnyire mandula alakúak, buzogányosak vagy fordított tojás alakúak is, egysejtesek, 2,5-11 x 1,5-6 μm , széles, bazális hegedésekkel (1-2 μm). Intercalaris konídiumok nincsenek. Chlamydospórák nincsenek. *Chrysosporium lucknowense* törzsek például: ATCC 44006, CBS 251.72, CBS 143.77 és CBS 272.77, további példákat leírtak a WO 98/15633. számú nemzetközi



közzétételi iratban (5,811,381. számú USA-beli szabadalmi leírásban).

Ebből a fajból egy további törzset izoláltunk, amely még nagyobb mértékű celluláz-termelésre volt képes. Belső használatra ezt a törzset C1-ként jelöltük, és az Orosz Tudományos Akadémia „International Depository of All Russian Collection” törzsgyűjteményében deponáltunk (Moszkva, Bakrushina utca 8., Oroszország 113184) 1996. augusztus 29-én, a Budapesti Egyezmény szerint, és amelynek nyilvántartási száma: „VKM F-3500D”. Jelölése: *Chrysosporium lucknowense* Garg 27K. A C1-törzs tulajdonságai az alábbiak:

A kolóniák körülbelül 55-66 mm átmérőig növekedtek körülbelül 7 nap alatt burgonya-dextróz agaron; fehér-krémszínűek, filcszerűek, közepén 2-3 μ m magasak; a szélek határozottak, szabályosak, rojtosak; a hátoldal halvány krémszínű. A hifák átlátszóak, sima és vékony falúak, kis elágazásokkal. A táptalaj feletti részen a gombafonalak termékenyek, válaszfalaskák, 2-3 mm kiterjedésűek. A táptalajban lévő hifák terméketlenek. A konídiumok terminálisak és laterálisak; szár nélküliek vagy rövid oldalágakon ülnek; hiányoznak; magányosak, de szorosan egymás mellett helyezkednek el, átlátszóak, vékony és sima falúak, mandula alakúak, buzogányosak vagy fordított tojás alakúak, egysejtűek, 4-10 μ m méretűek. Chlamydospórák nincsenek. Intercalaris konídiumok nincsenek.

A C1-törzs izolálására szolgáló eljárás megtalálható a WO 98/15633. számú nemzetközi szabadalmi iratban, az 5,811,381. számú és a 6,015,707. számú USA-beli szabadalmi



leírásokban. *Chrysosporium* definíción értünk olyan törzseket is, amelyek a *Chrysosporium* szülői törzseiből származnak, például olyanokat, amelyek mutáción mentek keresztül, akár természetes módon, akár indukált mutagenézissel. *Chrysosporium* mutánsokat előállíthatunk indukált mutagenézissel, különösen besugárzás és kémiai mutagenézis kombinációjával.

Például a C1-törzset UV-besugárzással mutagenizáltuk, az UV13-6-törzs előállításához. Ezt a törzset további mutációnak vetettük alá N-metil-N'-nitro-N-nitrozo-guanidin alkalmazásával, így jutottunk a NG7C-19-törzshöz. Ez utóbbi törzset UV-besugárzással mutációnak vetettük alá, amelynek eredményeként jutottunk az UV18-25-törzshöz. A mutációs eljárás alatt a morfológiai jellemzők bizonyos mértékű variációt mutattak folyékony tenyészetben vagy tenyésztő tálcákon vagy mikroszkóp alatt vizsgálva. Az egymást követő mutagenézis-eljárásokban a tenyészetek a tálcákon egyre kevésbé voltak pelyhes és filcszerű megjelenésűek ahhoz képest, mint ami a szakirodalomban leírtak alapján jellemző *Chrysosporiumra*, míg a kolóniák sima és matt megjelenésűekké váltak. A vad típusú törzseken megfigyelt barna pigment bizonyos tápközegekben szintén kevésbé volt szembetűnő mutáns törzsek esetén. Folyékony tenyészetben az UV18-25-mutáns érzékelhetően kevésbé volt viszkózus, mint a vad típusú C1-törzs, és az UV13-6- és NG7C-19-mutáns. Míg valamennyi törzs megtartotta a *Chrysosporiumra* jellemző, mikroszkópikus tulajdonságokat, a micélium az egymás követő mutációkban egyre vékonyabb lett, és az UV18-25 micéliumá-



nak jól látható fragmentálódását lehetett megfigyelni. Valószínűleg a micélium említett fragmentálódása okozza az UV18-25-tenyészetek alacsony viszkozitását. A törzsek spórás szaporodási képessége az egyes mutagenesis-lépések után fokozatosan csökken. A fentebb leírtakkal szemléltetjük, hogy *Chrysosporium* nemzetségbe tartozó törzs bizonyos mértékben eltér a fentebb leírt morfológiai definíciótól. Az egyes mutációs lépéseket követően továbbá a celluláz és extracelluláris fehérjék termelése szintén növekedett, míg néhány mutáció a proteáz-expresszió mértékének csökkenését eredményezte. Gombák rendszertani besorolását meghatározó kritériumok rendelkezésre állnak például a CBS-nél, VKMF-nél vagy ATCC-nél. A törzsek jelölése belső használatra: *Chrysosporium* C1-törzs, UV13-6-törzs, NG7C-19-törzs és UV18-25-törzs, melyeket az „All Russian Collection” (VKM) moszkvai intézetében deponáltuk, a Budapesti Szerződés szerint. A vad típusú C1-törzs nyilvántartási száma „VKM F-3500 D”, 1996. augusztus 29-én deponáltuk, a C1 UV13-mutáns nyilvántartási száma: „VKM F-3632 D”, (1998. szeptember 2-án deponáltuk), a C1 NG7c-19-mutáns nyilvántartási száma: „VKM F-3633 D” (1998. szeptember 2-án deponáltuk) és a C1 UV118-25-mutáns nyilvántartási száma: „VKM F-3631 D” (1998. szeptember 2-án deponáltuk).

Előnyösen nem-toxikus *Chrysosporium* törzseket alkalmazunk, amelyekből számos ismert szakember számára, ugyanis csökkenti a környezetet veszélyeztető kockázatot nagy mennyiségben végzett termelés esetén, és egyszerűsíti a termelési eljárásokat az ezzel járó költségcsökkenés miatt.

Az expressziós szabályzó régió olyan DNS-szekvencia, melyet gazdaszervezetként alkalmazott *Chrysosporium* törzs expresszió céljából képes felismerni. Tartalmaz egy promóterszekvenciát, amely működőképesen van kapcsolva az expresszálandó polipeptidet kódoló nukleinsavszekvenciához. A promóter úgy kapcsolódik, hogy az iniciációs kódonhoz viszonyított elhelyezkedése lehetővé teszi az expresszálandó szekvencia expresszióját. A promóterszekvencia lehet konstitutív vagy indukálható. A találmány tárgyát képezi minden olyan expressziós szabályzó szekvencia vagy ezek kombinációja, amely képes *Chrysosporium* törzsből polipeptidek expresszióját lehetővé tenni. Az expressziós szabályzó szekvencia előnyösen gombában működőképes, expressziós szabályzó régió, például ascomycetesből származó, szabályzó régió. Gombában működőképes, alkalmas expressziós szabályzó régió lehet az alábbi gombanemzetségek bármelyikéből származó szabályzó régió: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chrysosporium*, *Hansenula*, *Mucor*, *Pichia*, *Neurospora*, *Tolypocladium*, *Rhizomucor*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Saccharomyces*, *Talaromyces* vagy ezek alternatív szexuális formái, például *Emericella*, *Hypocrea*, például *Trichoderma*-ból származó cellobio-hidroláz promótere, *Aspergillus*-ból származó glükoamiláz promótere, *Aspergillus*-ból származó glicerinaldehid-foszfát dehidrogenáz promóter, *Aspergillus*-ból származó alkohol dehidrogenáz-A és alkohol dehidrogenáz-R promótere, *Aspergillus*-ból származó TAKA-amiláz promótere, *Neurospora*-ból származó foszfoglicerát és kereszt-folyamatsort vezérlő promóter,



Rhizomucor mieheiből származó aszpartát-proteáz promótere, *Rhizomucor mieheiből* származó lipáz promótere és *Penicillium canescensből* származó béta-galaktozidáz promótere. Az expressziós szabályzó szekvencia különösen olyan nemzetséghez tartozó törzsből származik, mint amelyhez a gazdaszervezet tartozik, mivel így lehet specifikusan adaptálni a konkrét gazdaszervezethez. Ezért az expressziós szabályzó szekvencia előnyösen *Chrysosporium* törzsből származik.

Az expressziós szabályzó régió előnyösen nagymértékű expressziót tesz lehetővé a kiválasztott gazdaszervezetben. Ez előnyösen a találmány szerinti *Chrysosporiumból* származó expressziót szabályzó régió. Alkalmazhatunk heterológ gazdaszervezetből származó, nagymértékű expressziót szabályzó régiót is, például olyanokat, amelyek szakember által jól ismertek. Nagy mennyiségben expresszálandó fehérjék, és ezért alkalmas expressziós szabályzó szekvenciáikat biztosítanak a találmány szerinti megoldásra, például: hidrofofin, proteáz, amiláz, xilanáz, pektináz, eszteráz, béta-galaktozidáz, celluláz (például endoglükánáz, cellobiohidroláz) és poligalakturonáz. Nagymértékű termelést lehet elérni szilárd táptalajon, és folyékony tápközegben végzett fermentációs körülmények között egyaránt. Ilyen fehérjék jelenlétének és termelődésük mennyiségének meghatározására szolgáló vizsgálati eljárások szakember számára jól ismertek. A Sigma és Megazyme cég katalógusai például számos példát közölnek. Megazyme elérhetősége: Business Park, Bray, Country Wicklow, Írország. A Sigma Aldrich cégnek sok



telephelye van világszerte, például: USA, P.O.Box 14508, St. Louis, Missouri. Cellulázra kereskedelembe rendelkezésre álló vizsgálati eljárásokat alkalmazunk, ilyenek például: CMCáz vizsgálati eljárások, endoviszkometrikus vizsgálati eljárások, Aviceláz vizsgálati eljárások, béta-glükanáz vizsgálati eljárások, RBBCMCáz vizsgálati eljárások, Cellazyme-C vizsgálati eljárások. Xilanázra szintén rendelkezésre állnak vizsgálati eljárások kereskedelmi forgalomban (például DNS és Megazyme cégnél). Alternatív megoldások szakember számára jól ismertek, és megtalálhatók a tárgyra vonatkozó szakirodalomban, és az ilyen információkat a kitanítás részének tekintjük. Például hivatkozunk a „Method of Enzymology” sorozatra az 1. kötettől (1955) a 297-299. kötetig (1998). Előnyösen *Chrysosporium*-ból származó promóterszekvenciát alkalmazunk, hogy a gazdaszervezet képes legyen azt megfelelő mértékben felismerni.

Azt találtuk, hogy a heterológ expressziós szabályzó szekvenciák ugyanolyan hatékonyan működnek *Chrysosporium*-ban, mint a natív *Chrysosporium* szekvenciák. Ez lehetővé teszi jól ismert konstrukciók és vektorok alkalmazását *Chrysosporium* transzformációjára, valamint számos más lehetőséget nyújt olyan vektorok előállítására, amelyek nagymértékű expressziót biztosítanak ebben az új expressziós és szekréciós gazdaszervezetben. Például standard, *Aspergillus*-transzformációs technikákat lehet alkalmazni például Christiansen és munkatársai [Bio/Technol. 6, 1419-1422 (1988)] által leírtak szerint. Más közleményekben részletesen ismertetnek *Aspergillus*-transzformációs vektor-



rokat, például a 4,816,405., 5,198,345., 5,503,991. 5,364,770. és 5,578,463. számú USA-beli szabadalmi leírásban, az EP-B-215.594. számú európai közzétételi iratban (*Trichoderma* szintén vonatkozik), amelyek tartalmát a kitanítás részének tekintjük. Mivel celluláz különösen nagymértékű expresszióját értük el *Chrysosporium* törzsekben, ilyen fehérjék expressziós szabályzó régiói különösen előnyösek. Konkrét példákban a fentebb említett, deponált *Chrysosporium* törzsekre hivatkozunk.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint alkalmazott nukleinsavkonstrukció *Chrysosporium*ból, előnyösen *Chrysosporium lucknowense*ből vagy származékából származó nukleinsav-expressziós szabályzó régiót tartalmaz, valamint az ilyen mutáns *Chrysosporium* törzsben a nukleinsavkonstrukció az expresszálandó polipeptidet kódoló génhez működőképesen van kapcsolva. Ilyen nukleinsavkonstrukció *Chrysosporium*ból származó, celluláz- vagy xilanáz-expresszióval, előnyösen cellobio-hidroláz expresszióval, vagy glicerinaldehid-foszfát dehidrogenáz expresszióval asszociált expressziós szabályzó régió, melyet lentebb részletesen ismertetünk. A találmány szerinti nukleinsavszekvencia előnyösen *Chrysosporium* törzsből származik, amely törzset a leírásban máshol definiálunk. Promóterszekvenciát számos, szakember által jól ismert módon meg lehet határozni. Az adott gén kezdeténél, az ATG-kódotól szintézisiránnyal szemben elhelyezkedő régióban végzett nukleáz-deléciós kísérletekkel juthatunk ilyen szekvenciákhoz. Például konszenzus szekvenciák elemzése is a kérdéses génhez vezethet.



Hibridizációs és amplifikációs technikák alkalmazásával szakember könnyen hozzájuthat a megfelelő promóterszekvenciákhoz.

Ezzel a módszerrel azonosítottuk a Cl-endoglukanázok promóterszekvenciáit, a megfelelő gének klónozásával. A találmány szerinti megoldásban előnyösen alkalmazott promóter az 55 kDa méretű cellobio-hidroláz (CBH1) promótere, a 30 kDa méretű xilanáz (Yyl1) promótere és a glicerinaldehid-foszfát dehidrogenáz promótere, mivel az enzimek nagymértékben expresszálódnak saját promótereik vezérletével. A megfelelő promóterszekvenciákat egyszerű módszerrel azonosítjuk a WO 00/20555. számú nemzetközi közzétételi iratban leírt klónozással, az 1. (CBH1-re) illetve 3. azonosítószámú (Xyl1-re) szekvenciában lévő információik felhasználásával. *Chrysosporium*ból származó szénhidrát-lebontó enzimek promótereit, különösen Cl-promótereket előnyösen lehet alkalmazni kívánt polipeptideknek gazda-organizmusban való expressziójára, különösen akkor, ha gazda-organizmusként gombát vagy más mikroorganizmust alkalmazunk. A találmány tárgyát képezik olyan promóterszekvenciák, amelyeknek legalább 65%-ban, előnyösen legalább 70%-ban, legelőnyösebben legalább 75%-ban azonosak az 1., 3. vagy 5. azonosítószámú szekvenciákkal, vagy más *Chrysosporium*-génekre talált szekvenciákkal.

A találmány konkrét előnyös megvalósítási módja szerint alkalmazott, találmány szerinti rekombináns törzsre és nukleinsavszekvenciákra a példákban hivatkozunk. Hivatkozunk korábban leírt olyan rekombináns törzsekre is, amelyek

nagymértékű expressziót biztosító promóterszekvenciákat tartalmaznak, különösen olyanokat, amelyek gombákban, például *Aspergillus*ban és *Trichoderma*ban biztosítanak nagymértékű expressziót. A szakirodalomban leírtak számos expressziós szabályzó régiót *Aspergillus*ban történő alkalmazásra, például a Novo cég által benyújtott, 5,252,726. számú és az Unilever cég által benyújtott 5,705,358. számú USA-beli szabadalmi leírásban. Az idézett közlemények tartalmát a kitanítás részének tekintjük.

A hidrofobin-gén gombában nagymértékben expresszálódó gén. Ezért feltételeztük, hogy a hidrofobin-gén promóterszekvenciája, amely előnyösen *Chrysosporium*ból származik, a találmány előnyös megvalósítási módja szerint előnyösen alkalmazható expressziós szabályzó szekvencia. Például *Trichoderma reesei*ből és a *Trichoderma harzianum*ból származó hidrofobin-gén szekvenciáját leírták a szakirodalomban, valamint *Aspergillus fumigatus*ból és *Aspergillus nidulans*ból származó, ide vonatkozó szekvenciainformációkat, melyeket a kitanítás részének tekintünk [Munoz és mtsai., Curr. Genet. 32, 225-230 (1997); Nakari-Setälä T. és mtsai., Eur. J. Biochem. 15, 235, 248-255 (1996); M. Parta és mtsai., Infect. Immun. 62, 4389-4395 (1994); és Stringer M. A. és mtsai., Mol. Microbiol. 16, 33-44 (1995)]. A szekvenciainformációkat felhasználva szakember hozzájuthat *Chrysosporium*ból származó hidrofobin-gének expressziós szabályzó szekvenciáihoz, felesleges kísérletezés nélkül, a fentebb leírtak szerint, már közölt, standard technikákat követve. A találmány szerinti, rekombináns



Chrysosporium törzs olyan hidrofobin-expressziót szabályzó régiót tartalmazhat, amely működőképesen kapcsolódik a kérdéses polipeptidet kódoló szekvenciához.

Az expressziós szabályzó szekvencia továbbá enhanszert és némitó szekvenciát is tartalmazhat. Ezek szintén jól ismertek a szakirodalomból, és rendszerint a promótertől kissé távolabb helyezkednek el. Az expressziós szabályzó szekvenciák tartalmazhatnak olyan promótereket is, amelyek aktivátor-kötőhellyel és represszor-kötőhellyel rendelkeznek. Néhány esetben az ilyen helyek úgy lehetnek módosítva, hogy megszűnik az ilyen típusú szabályzás. Leírtak fonalas gombákban működőképes promótereket, amelyekben *creA*-helyek vannak. Az ilyen *creA*-helyeket mutációnak lehet alávetni a glükózrepresszió biztosítása céljából, amely normálisan nem-mutáns helyek jelenlétének eredménye. A Gist-Brocades cég által benyújtott, WO 94/13820. számú nemzetközi közzétételi iratban leírtak ugyanezt az elvet szemléltetik. Ilyen promóter alkalmazása lehetővé teszi olyan nukleinsavszekvencia által kódolt polipeptid termeltetését, amelyet a promóter glükóz jelenlétében szabályoz. Ugyanezt az elvet írják le a WO 97/09438. számú nemzetközi közzétételi iratban. Ezek a promóterek alkalmazhatók *creA*-helyeikkel vagy azok nélkül. Azokat a mutánsokat, amelyekben a *creA*-helyek mutációnak lettek alávetve, expressziós szabályzó szekvenciaként lehet alkalmazni a találmány szerinti rekombináns törzsben, és azután az általa szabályzott nukleinsavszekvenciát glükóz jelenlétében lehet expresszálni. Ilyen *Chrysosporium*ból származó promóterek analóg módon de-



repressziót biztosítanak a WO 97/09438. számú nemzetközi közzétételi iratban leírtak szerint. A creA-helyek azonoságát a szakirodalomban leírták. Ezzel alternatív módon, olyan CreA-kötőhelyekkel rendelkező promótert lehet alkalmazni, amelyet nem vetettünk alá mutációnak gazdatörzsben, és mutációt tartalmaz máshol a repressziós rendszerben, például magában a creA-génben, így a törzs, creA-kötőhelyek jelenlétének ellenére képes fehérjét vagy polipeptidet termelni glükóz jelenlétében.

Expressziós szabályzó szekvenciák lehetnek terminációs szekvenciák is, és ezek működőképesen vannak kapcsolva az expresszálandó szekvencia 3'-terminálisához. Bármilyen gombából származó terminátor valószínűleg működőképes gazdaszervezetként alkalmazott, találmány szerinti *Chrysosporium* törzsben. Például: *A. nidulans*ből származó trpC-terminátor (1), *A. niger*ből származó alfa-glükozidáz-terminátor (2), *A. niger*ből glükoamiláz-terminátor (3), *Mucor miehe*ből származó karboxi-proteáz-terminátor (5,578,463. számú USA-beli szabadalmi leírás) és *Trichoderma reesei*ből származó cellobio-hidroláz-terminátor.

Természetesen *Chrysosporium*ból származó terminációs szekvenciák működőképesek *Chrysosporium*ban és alkalmasak például CBH1-terminátorként.

A találmány szerinti megoldásban előnyösen alkalmazható, rekombináns *Chrysosporium* törzsekben az expresszálandó nukleinsavszekvencia működőképesen van kapcsolva szignálszekvenciaként definiált aminosav-szekvenciát kódoló szekvenciához. A szignálszekvencia olyan aminosav-szekvencia,



amely ha működőképesen van kapcsolva az expresszált polipeptid aminosav-szekvenciájához, lehetővé teszi annak szekréciónak a gomba-gazdaszervezetből. Ilyen szignálszekvencia lehet olyan, amely normálisan asszociált a heterológ polipeptiddel, vagy lehet olyan, amely natív a gazdaszervezet számára. Lehet idegen is mind a gazdaszervezet, mind a polipeptid számára. A szignálszekvenciát kódoló nukleinsav-szekvenciát egy fázisban kell elhelyezni, hogy lehetővé váljon a szignálszekvencia és a heterológ polipeptid transzlációja. A találmány szerinti megoldásban szóba jöhet bármilyen szignálszekvencia, amely képes lehetővé tenni polipeptid szekréciónak *Chrysosporium* törzsben. Ilyen szignálszekvencia lehet alkalmasan választott, gombában működőképes szignálszekvencia, előnyösen ascomycetesből származó szignálszekvencia.

Alkalmas szignálszekvenciák származhatnak általában élesztőkből, vagy az alábbi nemzetségek bármelyikéből: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chrysosporium*, *Pichia*, *Neurospora*, *Rhizomucor*, *Hansenula*, *Humicola*, *Mucor*, *Tolypocladium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Saccharomyces*, *Talaromyces* vagy ezek alternatív szexuális formái, mint például *Emericella*, *Hypocrea*. Különösen hasznosan alkalmazható szignálszekvenciák gyakran natív körülmények között asszociáltak az alábbi fehérjékkel: cellobio-hidroláz, endoglükánáz, béta-galaktozidáz, xilanáz, pektináz, észteráz, hidrofobin, proteáz vagy amiláz. Például *Aspergillus*ból vagy *Humicolaból* származó amiláz vagy glükoamiláz (4), *Aspergillus oryzae*ből származó TAKA-amiláz, *Aspergillus*



nigerből származó alfa-amiláz, *Mucor*ból származó karboxipeptidáz (5,578,463. számú USA-beli szabadalmi leírás), *Rhizomucor* mieheiből származó lipáz vagy proteáz, *Trichoderma*ból származó cellobio-hidroláz (5), *Penicillium canescens*ből származó béta-galaktozidáz és *Saccharomyces*ből származó alfa-párosodási faktor.

Alternatív módon, a szignálszekvencia származhat *Bacillus* törzsben előforduló amiláz- vagy szubtilizin-génből. Ugyanabból a nemzetségből származó szignálszekvencia, mint amelyhez a gazdaszervezet tartozik, különösen alkalmas, mivel speciálisan adaptálódott az adott gazdaszervezethez, így előnyösen alkalmazható szignálszekvencia lehet *Chrysosporium*ból származó szignálszekvencia, különösen *Chrysosporium* C1-törzsből, UV13-6-törzsből, NG7C-19-törzsből és UV18-25-törzsből származó szignálszekvencia, a fentebb leírtak szerint. Hasznosan alkalmazhatók fonalas gombákból, élesztőből és baktériumokból származó szignálszekvenciák. Nem-gombaeredetű szignálszekvenciák szintén hasznosnak tekinthetők, különösen bakteriális, növényi vagy emlősszervezetből származó szignálszekvenciák.

A találmány bármely előnyös megvalósítási módja szerint alkalmazott, rekombináns gazdaszervezet szelektálható markert tartalmaz. Ilyen szelektálható marker lehetővé teszi a transzformált vagy transzfektált sejtek könnyű szelekcióját. A szelektálható marker gyakran olyan génterméket kódol, amely specifikus rezisztencia-típust biztosít, amely idegen a nem-transzformált törzshöz képest. Ez általában lehet nehézfém-, antibiotikum- vagy peszticid-rezisztencia.

Prototrófia szintén hasznos, nem-antibiotikum típusú, szelektálható marker. Nem-antibiotikum típusú, szelektálható markereket előnyösen olyan esetekben alkalmazunk, ahol a kérdéses fehérje vagy polipeptid élelmiszerben vagy gyógyszerben kerül alkalmazásra, az ilyen termék gyorsabb vagy egyszerűbb engedélyeztetése céljából. Nagyon gyakran GRAS-jelölést alkalmaznak ilyen markerekre. Szakember számára számos ilyen marker áll rendelkezésre. Az FDA például közread ilyen listát. A legelterjedtebben alkalmazott szelektálható markerek droggal szemben határoznak meg rezisztenciát vagy feloldanak tápanyaghiányt, például amdS (acetaamidáz), hph (higromicin foszfortranszferáz), pyrG (orotidin-5'-foszfát dekarboxiláz), trpC (antranilát szintetáz), argB (ornitin karbamoiltranszferáz), sC (szulfát adeniltranszferáz), bar (foszfinotricin acetiltranszferáz), glüfozinát-rezisztencia, niaD (nitrát reduktáz), bleomicinrezisztencia-gén, pontosabban Sh ble, szulfonil-karbamid-rezisztencia, például acetolaktát szintetáz ilv1-mutáns. Szelekciót kotranszformálás alapján is lehet végezni, amelyben a szelektálható marker egy vektoron van, vagy amelyben a szelektálható marker ugyanazon a nukleinsavfragsmenen van, mint a kérdéses polipeptidet kódoló szekvencia.

A leírásban a „heterológ polipeptid” kifejezésen olyan fehérjét vagy polipeptidet értünk, amelyet normálisan nem expresszál és szekretál az expresszióra alkalmazott, találmány szerinti *Chrysosporium* gazdatörzs. A polipeptid lehet növényi vagy állati eredetű azzal a kikötéssel, hogy nem fordul elő a gazda-törzsben. Az emlősszervezet lehet ember.



Mikroorganizmusok lehetnek vírusok, baktériumok, archaebaktériumok és gombák, azaz fonalas gombák és élesztők. Bergey-féle „Manual for Bacterial Determinology” megfelelő listát közöl baktériumokról és archaebaktériumokról. Gyógyászati célokra nagyon gyakran előnyben részesítenek humán fehérjéket, így a találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány szerinti, rekombináns gazdaszervezet abban az esetben szolgálhat gazdaszervezetként, ha a polipeptid humán eredetű. Élelmiszer ipari felhasználás céljára a heterológ polipeptid előnyösen állati, növényi vagy alga eredetű. A találmány ilyen előnyös megvalósítási módjait is alkalmas példáknak tekintjük. A találmány alternatív előnyös megvalósítási módjai szerint, heterológ polipeptidként alkalmazhatunk bármilyen baktériumból, élesztőből, vírusból, archaebaktériumból és gombából származó polipeptidet. A polipeptid legelőnyösebben gombaeredetű.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, kódonhasználatra nézve adaptált, heterológ nukleinsavszekvenciát alkalmazunk. Ilyen szekvencia annak a gazdaszervezetnek natív aminosav-szekvenciáját kódolja, amelyből az származott, de eltérő nukleinsavszekvenciával rendelkezik, azaz olyan nukleinsavszekvenciával, amelyben bizonyos kódonok helyettesítve vannak más kódonokkal, amelyek ugyanazt az aminosavat kódolják, de amelyeket könnyebben használ a gazdaszervezet expresszióra. Ez a heterológ nukleinsavszekvencia fokozottabb expressziójához vezet. Az általános gyakorlat szakember számára jól ismert. A kódonhasználatot adaptálhatjuk gombákban megfigyelt, ismert kódonhasználat,



és ezzel szemben, nem-gombákban megfigyelt kódonhasználat alapján. Sőt, még konkrétabban, a kódonhasználatot adaptálhatjuk magához *Chrysosporium*hoz. A hasonlóságok olyan mértékűek, hogy *Trichoderma*ban, *Humicolab*an és *Aspergillus*ban megfigyelt kódonhasználat lehetővé tesz szekvenciák cseréjét az ilyen organizmusok között a kódonhasználat adaptálása nélkül. Az említett gombákban lévő kódonhasználat részletei szakember számára rendelkezésre állnak, és a kitanítás részét képezik.

A találmány által igényelt oltalmi kör nem korlátozódik a fentebb említett rekombináns *Chrysosporium* törzsekre, de a találmány tárgyát képezi olyan rekombináns *Chrysosporium* törzs, amely *Chrysosporium* törzsből származó, homológ fehérjét kódoló nukleinsavszekvenciát tartalmaz, amely nukleinsavszekvencia működőképesen van kapcsolva expressziós szabályzó régióhoz, és a rekombináns törzs több fehérjét expresszál, mint a megfelelő, nem-rekombináns törzs ugyanolyan körülmények között. A kérdéses, homológ polipeptid esetén, ez előnyösen semleges vagy lúgos enzim, például hidroláz, proteáz vagy szénhidrát-lebontó enzim, melyeket már máshol leírtak. A polipeptid lehet savas is. A rekombináns törzs a polipeptidet előnyösen nagyobb mennyiségben expresszálja, mint a nem-rekombináns törzs. A heterológ polipeptid esetén megemlített valamennyi megjegyzés érvényes a szükséges változtatásokkal a homológ polipeptidre, azaz cellulázra is.

Tehát szintén a találmány tárgyát képezik olyan géntechnológiailag módosított mikroorganizmus-törzsek, ame-



lyekben a bevitt szekvencia lehet *Chrysosporium*-eredetű. Viszont ilyen törzset például olyan heterológ szekvenciák alapján lehet megkülönböztetni a natívan előforduló törzstől, amelyek a *Chrysosporium* transzformálására vagy transzfektálására alkalmazott nukleinsavszekvenciában jelen vannak, az alapján, hogy több kópia kérdéses polipeptidet kódoló szekvencia van jelen, vagy az alapján, hogy ezek nagyobb mennyiségben expresszálnak, mint a nem-módosított törzsben azonos körülmények között, vagy az alapján, hogy az expresszió végbemegy olyan körülmények között is, amelyben normálisan nem történik expresszió. Ez utóbbi lehet olyan eset, amelyben egy indukálható promóter szabályozza a kérdéses szekvenciát, a nem-rekombináns törzset alkalmazó esettel szemben, vagy olyan eset, amelyben másik faktor indukálja az expressziót, mint a nem-rekombináns törzs esetén. A találmány tárgyát képezik olyan törzsek, amelyek genetikai módosítással lettek származtatva, klasszikus genetikai technológiák vagy modern géntechnológiai módosítások alkalmazásával.

A találmány szerinti expressziós rendszerek és ezeket tartalmazó gazda-törzsek olyan nukleinsavszekvenciát tartalmazhatnak, amely heterológ fehérjét kódol, például szénhidrát-lebontó enzimeket (cellulázokat, xilanázokat, mannanázokat, mannozidázokat, pektinázokat, amilázokat, például glükoamilázokat, α -amilázokat, α - és β -galaktozidázokat, α - és β -glükozidázokat, β -glükánázokat, kitinázokat, kitanázokat), proteázokat (endoproteinázokat, amino-proteázokat, amino- és karboxipeptidázokat, keratinázokat), más hidrolá-



zokat (lipázokat, észterázokat, fitázokat), oxidoreduktázokat (katalázokat, glükóz oxidázokat) és transzferázokat (transzglikozilázokat, transzglutaminázokat, izomerázokat és invertázokat).

A legjelentősebb termékek, melyeket a találmány szerinti eljárás alkalmazásával lehet előállítani, cellulázok, xilanázok, pektinázok, lipázok és proteázok, amelyben a cellulázok és xilanázok béta-1,4-kötéseket hasítanak, és a cellulázok lehetnek endoglükanázok, cellobio-hidrolázok és béta-glükozidázok. Ezek a fehérjék különösen hasznosak szakember által ismert, különböző ipari eljárásokban. Konkrétan cellulázokra megemlítjük a WO 98/15633. számú nemzetközi közzétételi iratot, amelyben cellobio-hidrolázok és endoglükanázok alkalmazását írták le. Az említett bejelentés tartalmát a kitanítás részének tekintjük.

A találmány szerinti rekombináns rendelkezhet polipeptidet kódoló nukleinsavszekvenciával, amely olyan kérdéses polipeptidet kódol, amely inaktivált vagy nem stabil savas pH-n, azaz pH 6,0-on, sőt pH 5,5 alatt, még előnyösebben pH 5 alatt, sőt, akár pH 4,0-en vagy alacsonyabb pH-értéken. Ez a találmány egy különösen előnyös megvalósítási módja, mivel az általában közölt expressziós rendszerek olyan gombában működőképesek, amelyeket nem semleges-lúgos pH-körülmények között tenyésztene, hanem savas pH-n tenyésztik azokat. Tehát a találmány szerinti rendszer biztonságos, gombában működőképes expressziós rendszert biztosít olyan fehérjékre vagy polipeptidekre, amelyek érzékenyek inaktiválásra vagy nem-stabilak savas pH-n.

Egészen pontosan, a találmány bármelyik előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezi olyan rekombináns törzs, amelyben a nukleinsavszekvencia a kérdéses polipeptidként olyan fehérjét vagy polipeptidet kódol, amely optimális aktivitást és/vagy stabilitást pH 5 fölött, előnyösen semleges vagy lúgos pH-n (azaz 7 fölött) és/vagy 6-nál magasabb pH-n mutat. A találmány különösen előnyös megvalósítási módjai szerint, ilyen pH-értékeken előreláthatóan, az optimális aktivitás több, mint 50%-a, több, mint 70%-a, sőt, több, mint 90%-a várható. Ilyen tenyésztési körülmények között expresszált polipeptid nem szükségszerűen aktív a tenyésztési körülmények között; tulajdonképpen előnyös lehet olyan körülmények között tenyészteni, amelyben inaktív, mivel aktív formája káros lehet a gazdaszervezet számára. Azonban szükséges, hogy a fehérje vagy polipeptid stabil legyen a tenyésztési körülmények között. A stabilitás jelenthet hőstabilitást. A stabilitás lehet konkrét készítményekkel vagy vegyszerekkel szemben mutatott stabilitás, például amelyek jelen vannak a kérdéses polipeptidet vagy fehérjét tartalmazó készítményekben, vagy előállításukra vagy alkalmazásukra szolgáló eljárásokban. Cellulázokat vagy lipázokat stb. tartalmazó detergens-készítményekben például a LAS olyan vegyszer, amely gyakran káros a fehérjékre. Az alkalmazások időtartama változó lehet rövidtől hosszú időtartamú érintkeztetésig, így a stabilitás eltérő lehet időtartam tekintetében az alkalmazástól függően. Szakember képes meghatározni esetről esetre, a pontos körülményeket. Kereskedelemben rendelkezésre álló vizsgálati



eljárásokat lehet alkalmazni különböző enzim-termékek optimális aktivitásainak meghatározására. Például a Sigma és Megazyme cégek katalógusai tartalmazzak ilyeneket. Ilyen tesztekre leírunk konkrét példákat máshol a leírásban. A gyártók segítséget adnak az alkalmazáshoz.

Chrysosporium törzset előnyösen lehet alkalmazni kérdéses, expresszálandó szekvenciával való transzformációra vagy transzfekcióra, és ilyen törzs viszonylag kevés biomasszát termel. Azt találtuk, hogy *Chrysosporium* törzsek kettő-öttször kevesebb biomasszát termelnek, mint *Trichoderma reesei*, ha a fermentáció végére 200-600 cP viszkozitásig tenyésztjük, és 10-20-szor kevesebb biomasszát termelnek, mint *Aspergillus niger*, ha 1500-2000 cP viszkozitásig tenyésztjük megfelelő körülmények között, azaz a törzsre vonatkozó, optimális tenyésztési körülmények között, amely nagymértékű expressziót biztosít. Az expresszió mértéke messze meghaladja azt, mint amit a két, ipari referencia törzs elér, sokkal kevesebb biomassza, és sokkal alacsonyabb viszkozitás mellett. Ezt azt jelenti, hogy az expresszió mértéke ilyen *Chrysosporium* törzsekben nyilvánvalóan magasabb, mint *Aspergillus niger*ben és *Trichoderma reesei*ben. A találmány előnyös megvalósítási módja szerint, ilyen transzformált vagy transzfektált *Chrysosporium* törzsek a találmány tárgyát képezik.

Azt találtuk, hogy a C1(18-25)-jelű *Chrysosporium* törzs 0,5-1,0 g/l biomasszát termel, ezzel szemben *Trichoderma reesei* esetén ez 2,5-5,0 g/l és *Aspergillus*

niger esetén ez 5-10 g/l a fentebb leírt körülmények között. A példákban részletesen leírjuk ezt az eljárást.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, egy rekombináns *Chrysosporium* törzs legalább akkora mennyiségben termel fehérjét vagy polipeptidet, amely ekvivalens az UV13-6- vagy C-19-törzs által termelt celluláz mennyiségével (mol/literben kifejezve), és legelőnyösebben ekvivalens vagy nagyobb mértékű, mint az UV18-25-törzs által termelt mennyiség, megfelelő vagy azonos körülmények között, azaz az adott törzsre jellemző, optimális tenyésztési körülmények között.

Azt találtuk, hogy az expresszió és szekréció mértéke nagyon magas, ha az UV18-25-törzs micélium-morfológiáját mutatja, azaz töredezett, rövid micéliumot mutató *Chrysosporium* törzset alkalmazunk. Tehát a találmány szerinti, rekombináns törzs előnyösen ilyen morfológiát mutat. A találmány tárgyát képezik olyan rekombináns törzsek vagy géntechnológiailag másképpen módosított *Chrysosporium* törzsek, amelyek ezt az új és találmány szerinti jellemzőt mutatják. A találmány bármelyik előnyös megvalósítási módja szerint, szintén a találmány tárgyát képezi rekombináns *Chrysosporium* törzs, amely továbbá csökkentett mértékű sporulációt mutat C1-hez viszonyítva, előnyösen UV13-6-törzsnél kisebb mértékű, előnyösen NG7C-19-törzsnél kisebb mértékű, előnyösen UV18-25-törzsnél kisebb mértékű sporulációt mutat ekvivalens fermentációs körülmények között. A találmány bármelyik előnyös megvalósítási módja szerint, szintén a találmány tárgyát képezi rekombináns *Chrysosporium* törzs,

amelyben továbbá a termelt fehérje mennyisége és a biomassza aránya legalább akkora, mint ez a C1-ben, előnyösen legalább akkora, mint ez UV13-6-, NG7C-19- és UV18-25-törzs bármelyikében, ekvivalens fermentációs körülmények között. Azonban szintén a találmány tárgyát képezik nem-rekombináns törzsek vagy géntechnológiailag másképpen módosított *Chrysosporium* törzsek, amelyek ezt az új és találmány szerinti jellemzőt mutatják, önmagukban vagy kombinációban a találmány más előnyös megvalósítási módjaival.

A találmány másik vonzó, előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezi olyan *Chrysosporium* törzs, amely alacsonyabb viszkozitást mutat, mint az NG7C-19-törzs, előnyösebb alacsonyabbat, mint az UV18-25-törzs, megfelelő vagy megegyező fermentációs körülmények között. Azonban szintén a találmány tárgyát képezik nem-rekombináns törzsek vagy géntechnológiailag másképpen módosított *Chrysosporium* törzsek, amelyek ezt az új és találmány szerinti jellemzőt mutatják, önmagukban vagy kombinációban a találmány más előnyös megvalósítási módjaival. Meghatároztuk, hogy az UV18-25-tenyészet viszkozitása 10 cP-nél kisebb, ezzel szemben *Trichoderma reesei* viszkozitása 200-600 cP nagyságrendű, *Aspergillus niger* viszkozitása 1500-2000 cP nagyságrendű megfelelő, optimális tenyésztési körülmények között, a fermentáció végén. Ilyen meghatározásra szolgáló eljárást a példákban ismertetünk.

A viszkozitást sok esetben vizuálisan lehet követni. Az anyag fluiditása olyan nagymértékben változhat, hogy lehet megközelítően szilárd, szosz-szerű vagy folyékony. A



viszkozitást könnyen meg lehet határozni Brookfield-féle rotációs viszkoziméterrel, kinematikus viszkozitás-csövekkel, golyók esésén alapuló (például Höppler-féle) viszkoziméterrel vagy „üvegedény” típusú viszkoziméterrel. Az ilyen alacsony viszkozitású tenyészetek hozamai magasabbak, mint az ismert, magasabb viszkozitású ipari tenyészetekben, időegységre és sejtszámra vonatkoztatva.

Az ilyen alacsony viszkozitású, találmány szerinti tenyészetek feldolgozása előnyös, különösen akkor, ha méretnövelés történik. A találmány tárgyat képező, alacsony viszkozitású *Chrysosporium* törzsek nagyon jó hatásfokkal működnek akár 150.000 literes tenyészetekben is. Tehát, a találmány előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyat képezi 150.000 literig bármilyen méretű tenyészet. Bármilyen más, általánosan alkalmazott fermentációs méretben lehet tenyészteni a találmány szerinti törzseket. Ennek hátterében az áll, hogy olyan problémák merülhetnek fel nagyméretű tenyészetben, hogy micelláris aggregátumok képződnek, amelyek túl sűrűek és/vagy nem egyenletes eloszlásúak. Ennek eredményeként a mikroorganizmus nem képes a tápközeget hatékonyan felhasználni tenyésztés alatt, amely alacsony hatékonyságú termelési folyamathoz vezet, különösen nagyméretű, azaz 150,000 liternél nagyobb térfogatban végzett fermentációban. A levegőztetés és kevertetés problematikussá válhat, ami oxigénben és tápanyagban szegény körülményekhez vezet, és így csökken a termelő biomassa koncentrációja, és csökken a polipeptid hozama a tenyésztés alatt és/vagy hosszabb fermentációs időt eredményezhet. To-



vább a magas viszkozitás és fokozott nyíró erők jelenléte nem-kívánatos az ipari fermentációs eljárásokban, és a találmány szerinti ipari eljárásokban, mivel termelést limitáló faktorok. Valamennyi említett negatív jelenséget ki lehet küszöbölni a találmányi szerinti *Chrysosporium*-gazdaszervezet alkalmazásával, amely sokkal jobb tulajdonságokat mutat, mint *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* és *Aspergillus oryzae*, amelyeket ipari törzsként alkalmazák ebben a vonatkozásban, azaz jobb fehérjetermelést és viszkozitási tulajdonságokat és biomassza-mennyiséget mutat.

A találmány fentebb említett, bármelyik előnyös megvalósítási módja szerint, a *Chrysosporium* törzs továbbá egy vagy több, gombaeredetű enzimet termel, például fentebb említett szénhidrát-lebontó enzimeket, proteázokat, más hidrolázokat, oxidoreduktázokat és transzferázokat, ezeket a találmány különösen hasznos előnyös megvalósítási módjának tekintjük. A legjelentősebb termékek konkrétan cellulázok, xilanázok, pektinázok, lipázok és proteázok. A találmány előnyös megvalósítási módja szerint, a *Chrysosporium* törzs azonban egy vagy több, olyan gombaeredetű enzimet termel, amelyek semleges vagy lúgos közegben mutatnak optimális aktivitást és/vagy stabilitást, előnyösen lúgos közegben mutatnak optimális aktivitást és/vagy stabilitást, amely enzimek lehetnek szénhidrát-lebontó enzimek, hidrolázok és proteázok, előnyösen hidrolázok és szénhidrát-lebontó enzimek. Nem-rekombináns *Chrysosporium* törzs esetén, ilyen enzimek előnyösen nem a WO 98/15633. számú nemzetközi közzé-



tételi iratban leírt cellulázok. Különösen érdekes enzimek lehetnek xilanázok, proteázok, észterázok, alfa-galaktozidázok, béta-galaktozidázok, béta-glükanázok és pektinázok. Nem korlátozzuk igényünket a fentebb leírtakra. A stabilitásra és aktivitásra vonatkozó, leírásban máshol található megjegyzések szintén érvényesek.

A találmány tárgyát képező eljárás kérdéses polipeptid termeltetésére, amely eljárásban gazda-törzset (például gombát, például *Chrysosporium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Hansenula*, *Mucor*, *Pichia*, *Neurospora*, *Tolypocladium*, *Rhizomucor*, *Fusarium*, *Penicillium* nemzetséghez tartozó törzset, vagy baktériumot vagy más mikroorganizmust) tenyészünk a találmány bármelyik előnyös megvalósítási módja szerint, olyan körülmények között, amely lehetővé teszi a polipeptid expresszióját és előnyösen szekrécióját, és azt követően termelődött, kérdéses polipeptid kinyerését.

Ha a leírásban a „fehérje” vagy „polipeptid” kifejezéseket említjük, a kifejezésen értünk variánsokat és mutánsokat, például a természetesen előforduló fehérjék szubsztitúciós, inszerciós vagy deléciós mutánsait, amelyek a nem-mutáns aktivitását mutatják. Ugyanez érvényes a megfelelő nukleinsavszekvenciákra. Ilyen polipeptideket, variánsokat vagy mutánsokat előállíthatunk például az alábbi eljárások alkalmazásával: mesterséges génkombináció („gene shuffling”), fehérjetervezés, irányított evolúció, helyspecifikus mutagenézis, és random mutagenézis. Az 5,223,409., 5,780,279. és 5,770,356. számú USA-beli szabadalmi leírások kitanítása az irányított evolúcióra vonatkozik. Az említett



eljárás alkalmazásával létrehozunk random mutáns génszekvenciákból álló könyvtárat, például mesterséges génkombinációval („gene shuffling”), hibára hajlamos PCR-rel, bármilyen sejttípusban. Az egyes génekhez szekrécioért felelős régió és immobilizálásért felelős régió van kapcsolva, így az eredményül kapott fehérje szekretálódik, és rögzítve marad a gazdaszervezet felszínén. Ezt követően olyan körülményeket alkalmazunk, amely szükséges az adott polipeptid biológiai aktivitásához. Ez számos ciklusban lejátszódik, míg végül a kívánt tulajdonságokkal rendelkező, végső génhez jutunk. Más szavakkal kifejezve, felgyorsított, irányított evolúciós folyamat történt. Az 5,763,192. számú USA-beli szabadalmi leírásban eljárást közölnek DNS, RNS, peptidek, polipeptidek vagy fehérjék előállítására, amelyben sztochasztikusan létrehozott szekvenciák kapcsolásával előállított, szintetikus polinukleotid alkalmazásával, beviszik azokat gazdaszervezetbe, azt követően szelektálják a megfelelő, előre meghatározott tulajdonságokkal rendelkező gazdasejtet.

A találmány szerinti eljárás más alkalmazása az „irányított evolúciós” folyamatban történhet, ahol előállítunk új, fehérjekódoló DNS-szekvenciákat, a kódolt fehérjéket gazdasejtben expresszáljuk, és azokat a szekvenciákat, amelyek kívánt tulajdonságú fehérjéket kódolnak, mutációnak vetjük alá és ismét expresszáljuk. Az eljárást számos cikluson át ismételjük, amíg a kívánt tulajdonságú fehérjéhez jutunk. Exogén fehérjéket kódoló, új DNS-szekvenciákat előállíthatunk például az alábbi eljárások alkalmazásával:

mesterséges génkombináció („gene shuffling”), fehérjetervezés, hibára hajlamos PCR, helyspecifikus mutagenézis és kombinatorikus és random mutagenézis. Az 5,223,409., 5,780,279. és 5,770,356. számú USA-beli szabadalmi leírások kitanítása az irányított evolúcióra vonatkozik [lásd még Kuchner és Arnold, *Trends in Biotechnology* 15, 523-530 (1997); Schmidt-Dannert és Arnold, *Trends in Biotechnology* 17, 135-136 (1999); Arnold és Volkov, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 54-59 (1999); Zhao és mtsai., „Manual of Industrial and Biotechnology”, 2. kiadás, szerk. Demain és Davies, 597-604. old., ASM Press, Washington DC (1999); Arnold és Wintrode, „Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation”, szerk. Flickinger és Drew, 971-987. old., John Wiley & Sons, New York (1999); és Minshull és Stemmer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 284-290 (1999)].

Kombinatorikus mutagenézis alkalmazását leírták Hu és munkatársai [*Biochemistry* 37, 10006-10015 (1998)]. Az 5,763,192. számú USA-beli szabadalmi leírásban közölt eljárásban előállítanak új, fehérjekódoló DNS-szekvenciákat sztochasztikusan létrehozott, szintetikus szekvenciák alkalmazásával, beviszik azokat gazdaszervezetbe és szelektálják a kívánt tulajdonságokkal rendelkező gazdasejteket. Mesterséges génkombinációt („DNA shuffling”) szolgáló eljárások: random láncindítást alkalmazó mutagenézis [Z. Shao és mtsai., *Nucleic Acids Res.* 26, 681-683 (1998)], lépcsős láncindítást alkalmazó eljárás [H. Zhao és mtsai., *Nature Biotech.* 16, 258-262 (1998)] és heteroduplex rekombináció



[A. Volkov és mtsai., *Nucleic Acids Res.* 27, 18 (1999)].
Egy másik megközelítés lehet még a hibára hajlamos PCR
[Song és Rhee, *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 890-894
(2000)].

Két eljárást alkalmaznak széles körben az irányított
evolúció szelekciós lépésében. Az egyik eljárásban a kérdé-
ses fehérje aktivitását valamilyen módszerrel esszenciális-
sá teszik a túlélő gazdasejtek számára. Például, ha a kí-
vánt aktivitás celluláz, és pH 8-on aktív, egy cellulázt-
gént mutációnak lehet alávetni és bevinni a gazdasejtekbe.
A transzformánsokat kizárólagos szénforrásként cellulózon
növesztik, és fokozatosan emelik a pH-t addig, amíg csak
néhány túlélő marad. A túlélőkből származó, mutáns cellu-
láz-gént (amely feltételezhetően viszonylag magas pH-n ak-
tív cellulázt kódol) alávetik egy másik mutációnak, és az
eljárást addig ismétlik, amíg csak olyan transzformánsokat
kapnak, amelyek cellulózon pH 8-on képesek növekedni. Az
enzimek termostabil variánsait ehhez hasonlóan lehet előál-
lítani, génmutációs ciklusokkal és gazdasejtek magas hőmér-
sékleten való növesztésével [Liao és mtsai., *Proc. Natl.*
Acad. Sci. USA 83, 576-580 (1986); Giver és mtsai., *Proc.*
Natl. Acad. Sci. USA 95, 12809-12813 (1998)].

A nagymértékben párhuzamos „legmegfelelőbb túlélése”
(„survival of the fittest”) elnevezésű megközelítés alter-
natívája a sorozatos szkrínelés. A megközelítés szerint,
egyedi transzformánsokat szkrínelünk hagyományos módszerek-
kel, például indikátort tartalmazó táptalajon növekvő koló-
niák körül kialakuló, színtelen vagy színes zónák megfigye-



lésével, kolorimetriás vagy fluorimetriás enzimes vizsgálati eljárások, immunológiai vizsgálati eljárások, kötési vizsgálati eljárások, stb. alkalmazásával, lásd például Joo és munkatársai által leírtakat [Nature 399, 670-673 (1999)], amely szerint olyan citokróm-P450 monooxygenázt fejlesztettek ki mutációs ciklusokkal és szkríneléssel, amelyekhez nem szükséges kofaktorként NADH; May és munkatársai által leírtakat [Nature Biotech 18, 317-320 (2000)], amely szerint reverz sztereoszelektivitással rendelkező hidantoinázt fejlesztettek ki hasonló módon; és Miuzaki és munkatársai által leírtakat [J. Mol. Biol. 297, 1015-1026 (2000)], amelyben termostabil szubtilizint fejlesztettek ki.

Standard klónozó és fehérje- vagy polipeptid-izolálási technikákat lehet alkalmazni, hogy a kívánt szekvencia-információkhoz jussunk. Ismert szekvenciák részleteit lehet alkalmazni próbaként más nemzetségekben és törzsekben lévő homológok izolálására. Például egy adott enzimaktivitást kódoló nukleinsavszekvenciát lehet alkalmazni *Chrysosporium*-könyvtár szűrésére. Szakember képes megállapítani, milyen hibridizációs körülmények megfelelőek. Nukleinsav-hibridizációra, könyvtárak előállítására szolgáló, szokásos eljárásokat és klónozó technikákat leírnak Sambrook és munkatársai (szerk.), „Molecular Cloning. A Laboratory Manual” című könyvben, Cold Spring Harbor, Press Plainview, New York (1989), és Ausubel és munkatársai (szerk.), „Current Protocols in Molecular Biology” című könyvben, John Wiley and Sons, New York (1987). A tárgyhoz

tartozó információk származhatnak később megjelent kézikönyvekből és szabadalmi leírásokból, valamint különböző, kereskedelemben rendelkezésre álló, erre a szakterületre vonatkozó reagenskészletekből.

A találmány egy alternatív előnyös megvalósítási módja szerint, az eljárásban találmány szerinti törzset tenyésztünk olyan körülmények között, amely lehetővé teszi a fehérje vagy polipeptid vagy prekursorának expresszióját és előnyösen szekrécióját, és azt követően termelődött polipeptid kinyerését, és adott esetben a prekuzort további izolálási és tisztítási lépéseknek vetjük alá a kérdéses polipeptid előállítás céljából. Ilyen eljárásban előnyösen a prekuzort hasítjuk, így a kérdéses polipeptidhez vagy prekuzorhoz jutunk. A hasítási lépésben alkalmazhatunk Kex-2-szerű proteázt, bármilyen bázikus aminosavra specifikus proteázt vagy Kex-2-t, például akkor, ha egy proteázhasítóhely kapcsolódik egy jól szekretálódó fehérje-hordozóhoz és a kérdéses polipeptidhez. Szakember könnyen képes Kex-2-szerű proteáz-szekvenciákat találni, mivel konszenzus szekvenciárszletek ilyen célra rendelkezésre állnak, és már számos alternatívát közöltek, például ilyen a furin.

A találmány bármelyik előnyös megvalósítási módja szerint, a polipeptid termeltetésére szolgáló eljárásban előnyösen a tenyésztést pH 5 fölött, előnyösen 5-10, előnyösebben 6-9 értéken végezzük. Ilyen eljárásban alkalmasan a tenyésztést 25-43°C közötti, előnyösen 30-40°C közötti hőmérsékleten végezzük. A találmány szerinti eljárásban alkalmazott törzsként teljesen megfelel rekombináns,

Chrysosporium törzs vagy más gombatörzs vagy nem-gombatörzs. A találmány szerinti eljárásban, ilyen esetben továbbá egy megelőző lépésben előállítunk találmány szerinti, rekombináns törzset. A megfelelő körülmények kiválasztása az expresszálandó polipeptid természetétől függ, és ilyen szelekciót szakember képes elvégezni.

A találmány tárgyát képezi eljárás a találmány szerinti, rekombináns törzs előállítására. Az eljárásban heterológ vagy homológ polipeptidet kódoló nukleinsavszekvenciát stabilan beviszünk alkalmas gazdatörzsbe, amely nukleinsavszekvencia működőképesen van kapcsolva expressziós szabályzó régióhoz, és a bevitel önmagában ismert módon történik, fonalas gomba transzformálásával. A fentebb leírtak szerint, számos hivatkozás áll rendelkezésre, és ezekből néhány kiválasztott közleményre hivatkozunk. Az ezekben leírt információ elegendő ahhoz, hogy szakember ez alapján képes elvégezni az eljárást felesleges kísérletezés nélkül. Az eljárásban beviszünk olyan nukleinsavszekvenciát, amely a találmány különböző előnyös megvalósítási módjai szerint, a találmány tárgyát képező rekombináns törzsre leírt, bármilyen nukleinsav-elemet tartalmaz egymagában vagy kombinációban.

A bevitel történhet például protoplaszt-transzformációs eljárással. Az eljárást leírjuk a példákban. Alternatív protoplaszt- vagy szferoplaszt-transzformációs eljárások jól ismertek, és a szakirodalomban, más fonalas gombákra leírtak szerint lehet ezeket alkalmazni. Ilyen eljárások részleteit megtalálhatjuk az idézett, számos hivatkozásban,

amelyek a kitanítás részét képezik. A találmány szerinti eljárásban előnyösen nem-rekombináns törzset alkalmazunk kiindulási anyagként arra a célra, hogy bevigyük a kérdéses polipeptidet kódoló, kívánt szekvenciát.

Szintén a találmány tárgyát képezi eljárás *Chrysosporium*ból származó enzim előállítására, amely eljárásban *Chrysosporium*ot vagy más törzset tenyésztünk, 5-nél magasabb, előnyösen 5 és 10 közötti, alkalmasan 6 és 7,5, 7,5 és 9 közötti pH-jú tenyésztési tápközegben vagy tápközegen, előnyösen semleges és lúgos pH-tartományokban.

Pontosabban, a találmány tárgyát képezi továbbá eljárás olyan enzimek termeltetésére, amelyek semleges vagy lúgos közegben mutatnak optimális aktivitást és/vagy stabilitást, előnyösen lúgos közegben mutatnak optimális aktivitást és/vagy stabilitást. A pH-val és optimális aktivitással kapcsolatos tartományokat, valamint ilyenek meghatározására szolgáló vizsgálati eljárásokat ismertetünk máshol az eljárásban. Az enzimeket választhatjuk szénhidrát-lebonító enzimek, proteázok, más hidrolázok, oxidoreduktázok és transzferázok közül, a fentebb leírtak szerint, az eljárásban a megfelelő enzimet kódoló nukleinsavszekvenciával transzformált vagy transzfektált gazdasejtet tenyésztünk. Az enzim előnyösen *Chrysosporium*ból származó enzim. Egy előnyös eljárásban például konkrétan cellulázt, xilanázt, pektinázt, lipázt vagy proteázt termelünk, ahol a celluláz és a xilanáz β -1,4-kötéseket hasít, és a celluláz lehet endoglükánáz, cellobiohidroláz és β -glükozidáz. A találmány szerinti eljárásban bármilyen, találmány szerinti

Chrysosporium gazdaszervezetet tenyésztethetünk, amely a fentebb felsorolt enzimeket kódoló nukleinsavat tartalmaz. A találmány szerinti nem-rekombináns *Chrysosporium* gazdaszervezetek alkalmazásával előnyösen szénhidrát-lebontó enzimeket, hidrolázokat vagy proteázokat termelünk. Ilyen esetben az enzim előnyösen nem celluláz. Az izolálásra szolgáló eljárások analógok a WO 98/15633. számú nemzetközi közzétételi iratban leírtakkal, melyek a kitanítás részét képezik.

Szintén a találmány tárgyát képezik a találmány szerinti eljárás alkalmazásával termeltetett enzimek. Szintén a találmány tárgyát képezik olyan *Chrysosporium*-eredetű enzimek, amelyeket találmány szerinti, nem-rekombináns *Chrysosporium* törzsekből lehet izolálni. Ezek a fentebb említett stabilitási, aktivitási tulajdonságokat mutatják. Ezek előnyösen LAS jelenlétében stabilak. A találmány tárgyát képezik különösen az alábbi enzimek: proteázok pI 4-9,5, proteázok 25-95 kDa molekulatömeggel, xilanázok 4,0 és 9,5 közötti pI-vel, xilanázok 25 és 65 kDa közötti molekulatömeggel, endoglükanázok 3,5 és 6,5 közötti pI-vel, endoglükanázok 25-55 kDa molekulatömeggel, β -glükózidázok, α,β -galaktozidázok pI 4-4,5, β -glükózidázok, α,β -galaktozidázok 45-50 kDa molekulatömeggel, cellobio-hidrolázok pI 4-5, cellobio-hidrolázok 45-75 kDa molekulatömeggel, például 55 kDa molekulatömeggel és 4,4 pI-vel, poligalakturonázok pI 4,0-5,0, poligalakturonázok 60-70 kDa molekulatömeggel, például 65 kDa molekulatömeggel, észterázok pI 4-5 és észterázok 95-105 kDa molekulatömeggel, amelyek a fentebb említett stabilitási és aktivitási tulajdonságokat mutatják.



A molekulatömeget (MW) SDS-PAGE alkalmazásával vannak meghatározva. A nem-rekombináns, azaz natív, természetesen előforduló enzim nem a WO 98/15633. számú nemzetközi közzétételi iratban leírt celluláz. Szintén a találmány tárgyát képezik olyan enzimek, amelyek a fentebb leírt pI-értékek és molekulatömegek kombinációival rendelkeznek.

Szintén a találmány tárgyát képezi nem-fehérje termékek (túl)termeltetése a találmány szerinti mutáns (rekombináns) törzsek alkalmazásával. Ilyen nem-fehérje termékek lehetnek primer metabolitok, például szerves savak, aminosavak, és szekunder metabolitok, például antibiotikumok, például penicillinek és cephalosporinok és más terápiás hatású anyagok. Ezek a termékek biokémiai folyamatsorok kombinációjának eredményeként keletkeznek, amelyben számos, kérdéses gombaeredetű gén játszik szerepet. Gombából származó primer és szekunder metabolitok, és ilyen metabolitok, és termelésükre szolgáló eljárások szakember számára jól ismertek. Primer metabolitok termelésére példákat leírt Matthey, M., Current Reviews in Biotechnology 12, 87-132 (1992). Szekunder metabolitok termelésére példákat leírtak Penalva és munkatársai, Trends in Biotechnology 16, 483-489 (1998).

1. példa

Transzformációs példák *Chrysosporium*, *Trichoderma* és *Tolypocladium geodes* összehasonlításával

Két nem-transzformált *Chrysosporium* Cl-törzset és egy *Trichoderma reesei* referencia törzset teszteltünk két táp-



közegen (Gs pH 6,8 és Pridham-agar, PA, pH 6,8). Az antibiotikum-rezisztencia mértékének tesztelése céljából spórákat gyűjtöttünk 7 napos PDA-tálcákról. Szelektív tálcákat inkubáltunk 32°C-on, és kiértékeljük 2, 4 és 5 nap múlva. Ebből az következett, hogy az NG7C-19- és UV18-25-jelű C-1-törzsek nyilvánvalóan alacsony alaprezisztencia-szinttel rendelkeztek mind bleomicinre, mind higromicinre. Ez a szint összehasonlítható volt azzal, mint amellyel egy általánosan alkalmazott, laboratóriumi *T. reesei* referenciatörzs rendelkezett. Ez egyértelműen azt mutatta, hogy ezt a két standard, gombában működőképes, szelektálható markert jól lehet alkalmazni *Chrysosporium* törzsekben. Más, standard, gombában működőképes, szelektálható markerekkel problémák nem várhatók.

Sh-ble (bleomicin-rezisztencia) transzformált *Chrysosporium* törzseket sikeresen szelektáltunk 50 µg/ml koncentráció alkalmazásával. Ezt a szelekciós szintet alkalmaztuk *T. reesei*re is, így bemutattuk, hogy differenciális szelekció könnyen elérhető *Chrysosporium*ban. Ugyanez érvényes transzformált törzsekre, 150 µg/ml higromicin-rezisztenciával.

Chrysosporium esetén olyan protoplaszt-transzformációs technikát alkalmaztunk, amely gombák esetén legáltalánosabban alkalmazott transzformációs technikára alapult. Egy 90 mm-es PDA-tálcáról az összes spórát felvettük 8 ml IC1-ben, és átvittük egy 50 ml-es, IC1-tápközeget tartalmazó rázó-lombikba, és 15 óra hosszáig inkubáltuk 35°C-on és 200 rpm-en. Miután a tenyészetet lecentrifugáltuk, az üledéket MnP-

ben mostuk, visszavittük oldatba 10 mg/ml Caylase-C₃-at tartalmazó, 10 ml MnP-ben, és 30 percig inkubáltuk, 35°C-on rázatva (150 rpm).

Az oldatot leszűrtük, és a szűrletet centrifugáltuk 10 percig, 3500 rpm-en. Az üledéket 10 ml MnPCa²⁺-al mostuk. Ezt 10 percig centrifugáltuk 25°C-on. Azután hozzáadtunk 50 µl hideg MPC-t. A keveréket jégen tartottuk 30 percig, azután hozzáadtunk 2,5 ml PMC-t. 15 perc elteltével szobahőmérsékleten, 500 µl kezelt protoplasztot összekevertünk 3 ml MnR-Soft-al, és közvetlenül ezután szélesztettük MnR-tálcára, amely szelekciós ágensként bleomicint vagy higromicint tartalmazott. Öt napig inkubáltuk 30°C-on, azután a transzformánsokat analizáltuk (azokat a klónokat, amelyek 48 óra után látható váltak). A transzformációs hatékonyságot 10 µg pAN8-1-jelű referenciaplazmid (19) alkalmazásával határoztuk meg. Az eredményeket bemutatjuk az alábbi 1. táblázatban.

1. táblázat: Transzformációs hatékonyság (10 µg pAN8-1-jelű, referenciaplazmid alkalmazásával)

	<i>T. reesei</i>	<i>NG7C-19</i>	<i>UV18-25</i>
Életképesség	10 ⁶ /200 µl	5 x 10 ⁶ /200 µl	5 x 10 ⁶ /200 µl
Transzformánsok 200 µl-ben	2500	10 ⁴	10 ⁴
Transzformánsok 10 ⁶ életképes sejtre	2500	2000	2000

A *Chrysosporium* transzformánsok életképessége felülmúlta a *Trichoderma* transzformánsok életképességét. A törzsek transzformálhatóságának mértéke összehasonlítható volt, és így egy kísérletben kapott transzformánsok száma 4-szer nagyobb volt *Chrysosporium* esetén, mint *T. reesei* esetén. Tehát a *Chrysosporium*ban lévő transzformációs rendszer hatékonysága nemcsak ugyanolyan, mint az általánosan alkalmazott *T. reesei* rendszeré, hanem meghaladja azt. Ez a javulás különösen olyan vektoroknál bizonyult hasznosnak, amelyek transzformációs hatékonysága kisebb, mint a pAN8-1 hatékonysága. Transzformáció vonatkozásában ilyen kevésbé hatékony vektorok lehetnek például olyan fehérjehordozó vektorok nem-gombából származó fehérjék termeltetésére, amelyek alkalmazásával általában 10-szer kevesebb transzformánshoz lehet jutni.

Számos más transzformációs és expressziós vektort állítottunk elő, amelyek homológ *Chrysosporium*ból származó fehérjét kódoló szekvenciát tartalmaztak, és heterológ fehérjét kódoló szekvenciát is tartalmaztak *Chrysosporium*mal való transzformációs kísérletekben történő alkalmazásra.

Az expressziós rendszerek tartalmazhatnak például *Chrysosporium*ból származó xilanáz Xyl1-promóterfragmensét xilanáz-szignálszekvenciához kapcsolva egy fázisban xilanáz nyitott leolvasási fázisával, ezt követően xilanáz terminátor szekvenciát. A transzformánsok szelektálását szelektálható vektorral való kotranszformáció alkalmazásával végezzük.

Egy másik példa szerint *Chrysosporium lucknowense*ből származó cellobio-hidroláz promótere *Penicillium*ból származó endoglükanáz-3 szignálszekevenciájához van kapcsolva egy fázisban *Penicillium*ból származó endoglükanáz-3 nyitott leolvasási fáziséval, ezt *Chrysosporium*ból származó cellobio-hidroláz terminátor szekvencia követi. A vektor továbbá egy második expressziós kazettát tartalmaz szelektálható markerrel, konkrétan acetamidáz-S-génnel (AmdS-génnel).

Egy további példa szerint *Chrysosporium*ból származó glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz-1 promóterét kapcsoltuk *Aspergillus niger*ből származó glükoamiláz szignálszekvenciájához, és a glükoamiláz nyitott leolvasási fázisát humán interleukin-6 nyitott leolvasási fáziséhoz fuzionáltuk. Ez a vektor továbbá egy második expressziós kazettát tartalmazott szelektálható markerrel, azaz AmdS-génnel.

Egy még további példa szerint, *Aspergillus nidulans*ből származó glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz-A promóterét kapcsoltuk endoglükanáz-5 nyitott leolvasási fáziséhoz, majd *Aspergillus nidulans*ből származó terminációs szekvenciához.

2. példa

Példák *Chrysosporium* transzformánsok heterológ és homológ expressziójára

C1-törzseket (NG7C-19 és/vagy UV18-25) teszteltünk arra vonatkozóan, hogy milyen mértékben képesek szekretálni különböző heterológ fehérjéket: bakteriális fehérjéket (*Streptoalloteichus hindustanus*ból származó bleomicinre-

zisztencia-fehérje, Sh ble), gombából származó fehérjét (*Trichoderma reesei*ből származó xilanáz-II, XYN2) és humán fehérjét (humán lizozim, HLZ).

***Trichoderma reesei*ből származó xilanáz-II (XYN2) szekréciója C1-ben**

UV18-25-jelű C1-törzset transzformáltunk pUT1064- és pUT1065-plazmidokkal.

A pUT1064-plazmid az alábbi két, gombában működőképes expressziós kazettát mutatja be:

Az első kazetta lehetővé teszi bleomicinrezisztens transzformánsok szelektálását:

- *Neurospora crassa* kereszt-folyamatsort szabályzó 1. gén (cpc-1) promótere (14);

- *Streptoalloteichus hindustanus*ból származó bleomicinrezisztencia-gén, Sh ble (4);

- *A. nidulans*ból származó triptofán szintetáz (trpC) terminátora (5).

A második kazetta a xilanáz-termelésért felelős kazetta:

- *T. reesei* törzsből származó TR2 cbhl-promóter (15);

- *T. reesei* törzsből származó TR2 xyn2-gén (szignálszekvenciával) (16);

- *T. reesei* törzsből származó TR2 cbhl-terminátor (15).

A vektor *E. coli*ből származó replikációs origót is tartalmaz a pUC19-plazmidból (6). A plazmid részletes térképét bemutatjuk az 1. ábrán.

A pUT1065-plazmid az alábbi, gombában működőképes expressziós kazettát mutatja be:

- A. nidulansból származó glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (gpdA) promótere (2);

- Szintetikus, T. reeseiből származó cellobio-hidroláz-I (cbhI) szignálszekvencia (1, 3);

- S. hindustanusból származó bleomicinrezisztenciagén, Sh ble (4), hordozó fehérjeként alkalmazva (10);

- Linkerpeptid (SGERK), amely KEX2-szerű proteázhasítóhelyet tartalmaz (1);

- T. reesei törzsből származó TR2 xyn2-gén (szignálszekvencia nélkül) (16);

- A. nidulansból származó triptofán szintetáz (trpC) terminátora (5).

A vektor β -laktamáz-gént (bla) és E. coliból származó replikációs origót tartalmaz is a pUC18-plazmidból (6). A plazmid részletes térképét bemutatjuk a 2. ábrán.

C1-protoplasztokat transzformáltunk pUT1064- vagy pUT1065-plazmiddal, ugyanazt az eljárást követve, mint amit a fenti példában leírtunk. A pUT1065-plazmidban (Sh ble :: XYN2) lévő fúziós fehérje funkcionális bleomicinrezisztencia vonatkozásában, így lehetővé teszi a C1-transzformánsok könnyű szelekcióját. Továbbá, a bleomicinrezisztencia mértéke körülbelül összhangban van az xyn2-expresszió mértékével. A pUT1064-plazmidban xyn2-t saját szignálszekvenciájával klónoztuk.

C1-transzformánsok (bleomicinrezisztens klónok) xilanáz-termelésének mértékét xilanáz-aktivitást vizsgáló eljárás

rással analizáltuk az alábbiak szerint: primer transzformánsokat GS+bleomicint (5 µg/ml) tartalmazó tálcákra vittük át (rezisztencia igazolása céljából), és XILAN-tálcákra is (xilanáz-aktivitást zóna tisztulásaként, vizuálisan detektáltuk, 17). A tálcákat 5 napig, 32°C-on növesztettük. Minden érvényesített (validált) klónt XILAN-tálcákra szubklónoztunk. Transzformánsoként két szubklónt használtunk PDA-tálcák oltására, hogy spórákhoz jussunk folyékony tenyészet elindításához. A folyékony tenyészeteket IC1 + 5 g/l K-ftalátban növesztettük 5 napig, 27°C-on (180 rpm-en rázatva). Azután a tenyészeteket lecentrifugáltuk (5000 g, 10 percig). Ezekből a mintákból xilanáz-aktivitást mértünk DNS-technikával Miller és munkatársai által leírtak szerint (18).

2. táblázat: Aktív XYN2-termelés mennyisége C1-ben (a legjobban termelők)

	Aktív xilanáz-II koncentrációja a tápközegben	Xilanáz-II specifikus aktivitás a tápközegben
Nemtranszformált UV18-25	3,9 U/ml	3,8 U/mg összfehérje
UV18-25::1064, 7-1.klón	4,7 U/ml	4,7 U/mg összfehérje
UV18-25::1064, 7-2.klón	4,4 U/ml	4,3 U/mg összfehérje
UV18-25::1065, 1-1.klón	29,7 U/ml	25,6 U/mg összfehérje
UV18-25::1065, 1-2.klón	30,8 U/ml	39,4 U/mg összfehérje

Ezek az adatok azt mutatják, hogy:

1) Igazoltuk a 2. példa 1-4. pontjait.

2) Cl-et gazdaszervezetként lehet alkalmazni heterológ, gombaeredetű fehérje szekréciójára.

Melléklet a példákhoz: tápközegek

Transzformációs tápközegek:

Mandels-alap:

MnP-tápközeg:

KH ₂ PO ₄	2,0 g/l	Mandels-alap +
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4 g/l	1 g/l pepton
MgSO ₄	0,3 g/l	2 g/l MES
CaCl ₂	0,3 g/l	100 g/l szacharóz
Oligoelemek	1,0 ml/l	pH 5-re állítva

MnR

MnP CA²⁺:

MnP-szacharóz	130 g/l	MnP-tápközeg +
Élesztőkivonat	2,5 g/l	50 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O
Glükóz	2,5 g/l	pH 6,5-re állítva
Agar	15 g/l	

MnR Lágú: MnR csak 7,5 g/l agarral

MPC:

CaCl ₂	50 mM
MOPS	10 mM
PEG	40%

Tápközegek szelekcióra és tenyésztéshez:

GS:

Glükóz	10 g/l	
Biosoyase	5 g/l	[Merieux]
Agar	15 g/l	pH 6,8 szükséges



PDA:

Burgonyaeredetű Dextróz Agar 39 g/l

[Difco]

pH 5,5 szükséges

MPG:

Mandels-alap +

Kálium-ftalát 5 g/l

Glükóz 30 g/l

Élesztőkivonat 5 g/l

A transzformánsok szelektálására alkalmazott regeneráló tápközeg (MnR) 50 µg/ml bleomicinnel vagy 100-150 µg/ml higromicinnel volt kiegészítve. Az antibiotikumrezisztencia igazolása céljából 5 µg/ml bleomicinnel kiegészített GS-tápközeget alkalmaztunk.

PDA egy komplett tápközeg a gyors növekedéshez és jó sporulációhoz. Folyékony tápközeget beoltottunk 1/20-térfogat spóraszuszpenzióval (valamennyi spóra egy 90 mm-es PDA-tálcáról származott 5 ml, 0,1% Tween-ben). Ilyen tenyészeteket 27°C-on növesztettünk rázott lombikokban (200 rpm).

3. példa

Cl-gének izolálása és jellemzése, és CBH1, XYL1 és GPD génexpressziós szekvenciái

UV18-25 génkönyvtárának előállítása BlueSTAR-ban

UV18-25-ből származó kromoszómális DNS-t részlegesen emésztettünk Sau3A-enzimmal, 12-15 kb méretű fragmenseket izoláltunk és ligáltunk BlueSTAR klónozó vektor BamHI-hasítóhelyébe. A ligációs keverék 20%-ának csomagolása 4,6



$\times 10^4$ független klónból álló génkönyvtárat eredményezett. Ezt a könyvtárat elszaporítottuk és 4°C -on és -80°C -on tároltuk. A ligációs keverék maradék részét szintén 4°C -on tároltuk.

UV18-25 génkönyvtárának szkrínelése *cbh1*-, *xyl1*- és *gpd1*-gének izolálása céljából

A különböző gének izolálása céljából, próbaként összesen $\pm 7,5 \times 10^4$ egyedi BlueSTAR-fágot hibridizáltunk két párhuzamossal. A hibridizációkat a *cbh1* és *xyl* PCR-fragmenseivel homológ körülmények között (65°C ; $0,2 \times \text{SSC}$), *A. niger*ből származó *gpd1*-gén PCR-fragmenseivel heterológ körülmények (53°C ; $0,5 \times \text{SSC}$) között végeztük (WO 00/20555. számú nemzetközi közzétételi iratban leírtak szerint). A pozitív jelek számát megadjuk a 3. táblázatban. A pozitív klónokat újra szkríneltük, és minden egyes klón esetén két egyedi fágot alkalmaztunk a további kísérletekben. A különböző klónokból származó DNS-t restrikciós analízissel elemeztük az egyes génekből származó, különböző klónok számának meghatározása céljából (az eredményeket bemutatjuk a 3. táblázatban).

Mivel mindhárom gén esetén 4-6 különböző klónt izoláltunk, azt a következtetést vontuk le, hogy a primer génkönyvtár ($\pm 4-5 \times 10^4$ klón) megfelel körülbelül $5 \times \text{UV18-25}$ -genomnak. Ebből az eredményből arra következtettünk, hogy a teljes UV18-25 genomnak 9×10^3 klón felel meg. Abból kiindulva, hogy egy átlagos genomi inszert mérete 13 kb, ez azt mutatja, hogy a genom mérete $\pm 120 \text{ Mb}$, amely 3-szor nagyobb méretű az *Aspergillus* genomjánál.



A plazmidban lévő génre specifikus láncindító oligonukleotidokkal (izolált PCR-fragmensekből kiindulva, korábbi szekvenciameghatározás alapján lettek tervezve) és a pBlueSTAR polilinkerében lévő T7 és T3 láncindító oligonukleotiddal végzett PCR-reakciókkal képesek voltunk meghatározni a gének helyzetét számos klónban. Az egyes gének esetén egy-egy plazmidot alkalmaztunk a gén szekvenciájának meghatározására.

Gén	Az első szkrínelésben pozitív	Szkrínelésben pozitív	Különböző klónok	Szekvenálásra alkalmazott klón
cbh1	8	7	4	pCBH7
xyl1	9	6	5	pXyl5
gpd1	12	12	6	pGPD4

3. táblázat: UV18-25-génkönyvtárból származó $7,5 \times 10^4$ fág szkrínelése UV18-25 PCR-fragmenseivel cbh1-génre és xyl1-génre (homológ körülmények között), és *A. niger*ből származó gpdA-génre (heterológ körülmények között). DNS-izolálást és restrikciós analízist alkalmaztunk a különböző klónok számának meghatározására.

A klónozott gének szekvenciaanalízise

A cbh1-, xyl1- és gpd1-génre, a szekvencia meghatározásának eredményeit bemutatjuk 1., 3. és 5. azonosítószámú szekvenciaként, sorrendben. Bemutatjuk a fehérjék leveztett aminosav-szekvenciáit is, 2., 4. és 6. azonosítószámú



szekvenciaként. A fehérjék néhány tulajdonságát megadjuk a 4. táblázatban. Meg kell említenünk, hogy a transzlációs start-helyet és az intronokat ugyanazon családból származó génekkel való homológia alapján jelöltük (azaz „papír” genetika alapján).

CBH1

CBH1 aminosav-szekvenciája alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a fehérje körülbelül 63 kD méretű, és egy cellulózkötő domén (CBD) van a fehérje C-terminális részében. Érdekes, hogy nem találtunk CBD jelentésre utaló jelet az izolált, 55 kD méretű, legjelentősebb fehérjében. Azonban, ebből az 55 kD méretű, legjelentősebb fehérjéből izolált peptidek jelenlétét igazoltuk a kódolt CBH1-fehérjében (2. azonosítószámú szekvencia), ami megerősíti azt, hogy az 55 kD méretű fehérjét a klónozott gén kódolja. Az így kapott eredmény lehetséges magyarázata az, hogy az 55 kD méretű fehérje a CBH1-fehérje rövidített változata, CBD nélkül.

A CBH1 cellobio-hidroláz aktivitást képes kifejteni MUF-cellobiózra, MUF-laktozidra, FP-re és avicelre, továbbá aktív p-nitrofenil- β -glükóziddal, cellobiózzal és p-nitrofenil-laktoziddal szemben is. MUF-cellobioziddal szemben mutatott aktivitását cellobióz gátolta, 0,4 mM inhibíciós állandóval. Michaelis-konstansok MUF-cellobioziddal szemben 0,14 mM, MUF-laktozidázzal szemben 4 mM és CMC-vel szemben 3,6 g/l volt. A pH-optimum 4,5 és 7 között volt. CMC esetén a maximális aktivitás 50%-a, és RBB-CMC esetén az aktivitás 80%-a megmaradt pH=8 értéken. pH 5 és 8 között az aktivitás

70-80%-a megmaradt az inkubálás 25 órája alatt. A hőmérséklet optimuma 60-70°C volt. CBH1 a 7. cellobio-hidroláz-család tagja. A megfelelő CBH-promótert bemutatjuk 1. azonosítószámú szekvenciaként, amely a találmány előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezi.

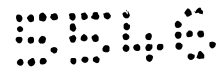
Xyl1

Az Xyl1 aminosav-szekvenciájából azt a következtetést vontuk le, hogy szintén jelen van CBD, a fehérje N-terminális oldalán (azaz a szignálszekvenciához közvetlenül, vagy attól legalább 5 aminosav távolságban kapcsolódva). A szakirodalomban csak néhány xilanáz ismeretes még, amely CBD-t tartalmaz (*Fusarium oxysporum*, *Humicola grisea* és *Neocallimastix patriciarum*). Az Xyl1-fehérje becsült mérete 43 kD, és a 30 kD méretű fehérjéből izolált, számos peptid származik ebből a fehérjéből (3. és 4. azonosítószámú szekvencia). Számos izolált peptidet nem találtunk meg a kódolt szekvenciában. Ez arra utalhat, hogy alternatív xilanáz-fehérjék vannak jelen UV18-25-ben. Korábbi analízisekben nem találtak CBD-t ebben a 30 kD méretű fehérjében. Az említett eredmények alapján is feltételeztük, hogy a fehérje CBD-része proteolízissel lehasad. Ezt a feltételezést tovább vizsgáltuk (a különböző C1-törzsekből, azaz C1 vad típusú, NG7C-, UV13-6-, UV18-25- és proteáz-mutáns UV18-25-törzsből származó, különböző fehérjék aktivitásainak, N-terminális szekvenciájának és méretének meghatározásával). A CBD jelenlétének vagy hiányának enzimaktivitásra kifejtett hatását analizáltuk részletesebben. A teljes hosszúságú gén túltermelését különböző C1-gazdaszervezetekben vizs-



gáltuk.

A cellulózkötő domén (CBD) jelenléte különösen jellegzetes tulajdonsága az enzimnek. A 10. glikolitikus enzimes család (xilanáz) egyetlen ismert tagja, amely N-terminális CBD-t tartalmaz, a *Fusarium oxysporum*ból származó XylF. *Chrysosporium lucknowense*ből származó Xyl1-fehérjében lévő CBD az alábbi szekvenciával rendelkezik: WGQCG GQGWT GPTTC VSGAV CQFVN DWYSQ CV (a 4. azonosítószámú szekvenciában a 22-53. aminosav). Ez a szekvencia nem egyezik meg az 5,763,254. számú USA-beli szabadalmi leírásban (Novo) közölt konszenzus szekvenciával. Az 5,763,254. számú USA-beli szabadalmi leírásban közölt konszenzus szekvencia: W/Y-G/A-Q-C-G G-Q/I/N-G/N-W/F/Y-S/T/N/Q G-P/A/C-T/R/K-T/C/N-C X-X-G/P-S/T/F/L/A/- -T/K C-V/T/R/E/K-K/Q/A-Q/I-N Q/D/A-W/F/Y-Y-Y/S/H/A-Q C.L/I/Q/V/T, ahol W/Y jelentése W vagy Y stb., X jelentése bármilyen aminosav, és „-” azt jelenti, hogy hiányzik aminosav. A legdegeneráltabb konszenzus szekvenciához képest négy különbség van az Xyl1-ben, melyet aláhúztunk fentebb a 7. szekvenciában. Tehát a találmány tárgyát képezik a konszenzus CBD-től különböző, N-terminális CBD-vel rendelkező xilanázok, amelyek eltérnek *Fusarium oxysporum*ban lévő xilanáztól. Pontosabban, a találmány szerinti xilanáz olyan CBD-vel rendelkezik, amely legalább 55%, különösen legalább 65%, előnyösen legalább 75% szekvencia-azonosságot mutat a fentebb leírt, 7. szekvenciával. A CBD a 23. helyzetben előnyösen Phe, Tyr és Trp egyikét tartalmazza, vagy legalább egyet az alábbi négy aminosavból: Val a 20. helyzetben, Gln a 22. helyzetben, Phe a 23.



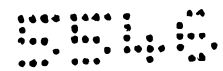
helyzetben és Val a 24. helyzetben. A szekvencia előnyösen Cys-Xaa-Phe, Xaa-Phe-Val, Cys-Xaa-Val, Cys-Gln-Phe, Val-Cys-Xaa-Phe, Gln-Phe-Val, Gln-Trp-Val, Gln-Tyr-Val, Val-Cys-Gln, Val-Cys-Gln-Phe és Val-Cys-Xaa-Phe-Val aminosavakat tartalmaz, ahol Xaa jelentése bármilyen aminosav, előnyösen Val, Thr, Arg, Glu, Gln vagy Lys, és legelőnyösebben Gln vagy Glu.

A xilanáz nem rendelkezik MUF-cellobiáz-aktivitással, tehát valódi xilanáz. Erős aktivitást mutat széles pH-tartományban 5 és 8 között, a maximális aktivitás 65%-át megtartja pH 9 és 10 között; a xilanáz-F-család tagja. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezi a megfelelő xilanáz-promóter, melyet bemutatunk 3. azonosítószámú szekvenciaként. Nyírfából származó xilánnal mutatott Michaelis-konstans 4,2 g/l a 30 kD méretű xilanázra. A hőmérséklet-optimuma magas, 70°C volt a xilanázra.

Gpd1

A gpd1-gén C-terminális részének DNS-szekvenciáját nem határoztuk meg. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezi a gén promóterszekvenciája, és bemutatjuk 5. azonosítószámú szekvenciaként.

A négy *Chrysosporium*-gén expressziójának mértékét Northern-analízissel vizsgáltuk. Különböző *C. lucknowense* törzseket növesztettünk „pharmedia”-t cellulózzal és laktózzal (1. tápközeg) tartalmazó gazdag tápközegben, vagy „pharmedia”-t és glükózt tartalmazó gazdag tápközegben (2. tápközeg), 33°C-on. 48 óra elteltével a micéliumot elkülö-



nítettük, és RNS-t izoláltunk. Az RNS-t hibridizáltattuk 4 különböző próbával: EG5, EG6, Xyl1 és CBH. Az érintkeztetés után a Northern-blotokat csíkokra vágtuk, és ismét hibridizáltattuk riboszómális L3-ra specifikus próbával, kontrollként, a bloton lévő mRNS mennyiségének meghatározása céljából. A legtöbb törzs nagyon erős választ adott CBH-ra és erős választ adott Xyl1-re az 1. tápközegeben; a 2. tápközegeben a törzsek fele nagyon erős választ adott valamennyi génre, és a másik fele kismértékű választ adott. Ezekből az adatokból levezettük az expresszió mértékének sorrendjét, amely: CBH > Xyl1 > EG5 > EG6.

*C. lucknowense*ből származó Xyl1-fehérje 67%-ban azonos (72%-ban homológ) legközelebbi homológjával a Genbank-adatbázisban (4. táblázat). Figyelemre méltó a CBH1-fehérje nagymértékű homológiája *Humicola grisea*ban lévő homológjához képest (74%-ban azonos/82%-ban homológ). Megjegyezzük azt is, hogy valamennyi esetben a legközelebbi homológok *Fusarium*ból, *Humicola*ból vagy más *Pyrenomycetes* (*Sordariomycetes*) gombából származtak, míg a *Chrysosporium* a *Plectomycetes* gombákhoz tartozik az NCBI-adatbázis szerint (4. táblázat). Tehát szintén a találmány tárgyát képezik *plectomycetes* gombákból származó, CBD-t tartalmazó glikanolitikus enzimek, különösen cellobio-hidrolázok és xilánázok.

	gliko- zidáz család	C1 izo- látum	Amino- savak száma	Intro- nok	Megj.	Rokon szekvenciák (% azonosság/ % homológia)
BH1	7	70 kD 55 kD	526 (63 kD)	1	CBD	<i>Humicola grisea</i> (74/82) (CBH1:P15828) <i>Fusarium oxysporum</i> (58/68) (CBH:P46238) <i>Neurospora crassa</i> (60/69) (CBH1:P38676)
YL1	10	30 kD	333 (43 kD)	3	CBD	<i>Fusarium oxysporum</i> (67/72) (XylF:P46239) <i>Penicillium</i> <i>simplissicum</i> (58/68) (XylF:P56588) <i>Aspergillus aculeatus</i> 61/70) (XylF:O59859)
PD1	-	-	Nem teljes	2+?	-	<i>Podospora anserina</i> (85/89) (GPD:P32637) <i>Neurospora crassa</i> (GPD:U67457) <i>Cryphonectria</i> <i>parasitica</i> (GPD:P19089)

4. táblázat: Strukturális és összehasonlító adatok a találmány szerinti CBH1-re, Xyl1-re és GPD1-re.

Ábrák rövid leírása:

Az 1. ábrán bemutatjuk a pUT1064 térképét.

A 2. ábrán bemutatjuk a pUT1065 térképét.



HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE

1. Calmels T.P., Martin F., Durand H., and Tiraby G. (1991) *Proteolytic events in the processing of secreted proteins in fungi*. J Biotechnol 17(1): p. 51-66.
2. Punt P.J., Dingemanse M.A., Jacobs-Meijnsing B.J., Pouwels P.H., and van den Hondel C.A. (1988) *Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of Aspergillus nidulans*. Gene 69(1): p. 49-57.
3. Shoemaker S., Schweickart V., Ladner M., Gelfand D., Kwok S., Myambo K., and Innis M. (1983) *Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase I derived from Trichoderma reesei strain L27*. Bio/Technology Oct.:691-696.
4. Drocourt D., Calmels T., Reynes J.P., Baron M., and Tiraby G. (1990) *Cassettes of the Streptoalloteichus hindustanus ble gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance*. Nucleic Acids Res 18(13): p. 4009.
5. Mullaney E.J., Hamer J.E., Roberti K.A., Yelton M.M., and Timberlake W.E. (1985) *Primary structure of the trpC gene from Aspergillus nidulans*. Mol Gen Genet 199(1): p. 37-45.
6. Yanisch-Perron C., Vieira J., and Messing J. (1987) *Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors*. Gene 33:103-119.
7. Durand H., Baron M., Calmels T., and Tiraby G. (1988) *Classical and molecular genetics applied to Trichoderma reesei for the selection of improved cellulolytic industrial strains*, in *Biochemistry and genetics of cellulose degradation*, J.P. Aubert, Editor. Academic Press. p. 135-151.
8. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J. (1951) *Protein measurements with the folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
9. Parriche M., Bousson J.C., Baron M., and Tiraby G. *Development of heterologous protein secretion systems in filamentous fungi*. in *3rd European Conference on Fungal Genetics*. 1996. Münster, Germany.
10. Baron M., Tiraby G., Calmels T., Parriche M., and Durand H. (1992) *Efficient secretion of human lysozyme fused to the Sh ble phleomycin resistance protein by the fungus Tolypocladium geodes*. J Biotechnol 24(3): p. 253-266.
11. Jeenes D.J., Marczinke B., MacKenzie D.A., and Archer D.B. (1993) *A truncated glucoamylase gene fusion for heterologous protein secretion from Aspergillus niger*. FEMS Microbiol. Lett. 107(2-3): p. 267-271.
12. Stone P.J., Makoff A.J., Parish J.H., and Radford A. (1993) *Cloning and sequence-analysis of the glucoamylase gene of neurospora-crassa*. Current Genetics 24(3): p. 205-211.
13. Mörsky P. (1983) *Turbidimetric determination of lysozyme with Micrococcus lysodeikticus cells: Reexamination of reaction conditions*. Analytical Biochem. 128:77-85.



14. Paluh J.L., Orbach M.J., Legerton T.L., and Yanofsky C. (1988) *The cross-pathway control gene of Neurospora crassa, cpc-1, encodes a protein similar to GCN4 of yeast and the DNA-binding domain of the oncogene v-jun-encoded protein.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(11): p. 3728-32.
15. Nakari T., Onnela M.L., Ilmen M., Nevalainen K., and Penttilä M. (1994) *Fungal promoters active in the presence of glucose*, WO 94/04673, Alko.
16. Torronen A., Mach R.L., Messner R., Gonzalez R., Kalkkinen N., Harkki A., and Kubicek C.P. (1992) *The two major xylanases from Trichoderma reesei: characterization of both enzymes and genes.* Biotechnology (N Y) 10(11): p. 1461-5.
17. Farkas V. (1985) *Novel media for detection of microbial producers of cellulase and xylanase.* FEMS Microbiol. Letters 28:137-140.
18. Miller G.L. (1959) *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.* Anal. Chem. 31:426-428.
19. Punt P.J., Mattern I.E., van den Hondel C.A.M.J.J. (1988) *A vector for Aspergillus transformation conferring phleomycin resistance.* Fungal Genetics Newsletter 35, 25-30.



SZEKVENCIALISTA

1. azonosítószámú szekvencia:

A teljes *Chrysosporium* CBH1 gén DNS- és aminosav-szekvenciája a promóter és terminátor szekvenciával együtt. A promóter szekvencia (1-1779), terminátor szekvencia (3427-4451) és intron szekvencia (2179-2256) kisbetűvel van jelölve.

```

aaggtatccgatttggggaacgtcgatgaaagtattgcaaaagtgacgagagttgcgcaa 60
ctaactcgctgccgaagaagctgcggaagaaagagaacaccgaaagtggaataacgttac 120
ggatgtcctgacctcaaagttgaaaccagcccttctgctctatTTgggaaagcggcttg 180
cccttgaatgcgctgcactgtggcagcactaccagtgatcgaggaggagcaaactaccctg 240
gtccggttccttggtggggcggcactagggcccaacttaggggtgatcggagggtcgatgccgc 300
ggctctcgttggtctgggctcttctcatttcccggtttgcacccccggttgcacctgctg 360
atcgcccgccaacgccgatgaggttgcgcccagaccgacaatcaccgcggctgcattccc 420
aagtatatTTgaagatggcaccaggtaccgcggttttgcgctccagtcgtttggtgccaaat 480
ttgggagtttttgagcctcaagatctggggaaatcgacctcaacttccatacaagttaaa 540
gtcgcacacacggcgagttccacgaagagacacatttttttctgaaggcctctctccccg 600
cacatcagaaaccaccaaataccaagactgcagaagccggggtaagtgggccaccgggac 660
tacactaaaatgcgggggagaagcgagatccggtgcgaaggggaagggatggggtgtgctgc 720
ggctttctccgctctcggtgcgccttttgcttgaatctagtgtacaccagggtaggctccg 780
aaggagtatctacggcgagcgtgttcggtgctgcggttgagagtcaggggcgagacgagcag 840
gcgacaggagcctcgcaccggcacttcggatcgcatttgcgcgagcgtcaaatacgctc 900
ttctgcggtcatcagagagcatcgtgaaccaaggttcttccgcagggcggcctgggcttc 960
gcagagtcgcactcggcgagcgccttccggtgcacccctgataacctggctgccgcgccc 1020
agactcctccaatgaggtgtgtggttgccctcgccgacccttcagcaaccttaatcgctt 1080
ccatcgcacgggtccacgtcctcgaacgatgccctcagtcggtgcccggccgtggcaacc 1140
ataacgtgacatcgccgcccagcctactagccgctatcgaccgggttaggcttgtcaccgc 1200
agcgcccatttctccatcgggcctctactctgatccacctcaccacccgcaagcactagcg 1260

```

agcctcaccagagtgcgaagcgacacgacccgccttggcccttcgctccttgactatctccca 1320
gacctctttgccatctttgccgaagcgccgcccccttttttttctcctccccctgccggcaggt 1380
cggtggccccagtcgccgagatggcattgctccgttgctccatgacgacccatcattegatg 1440
gctgactggcacactcgtcttgtttgagcatcgacggcccgcggcccgtctcccacggta 1500
cggaacctcgttgtagactacctctcgtaatgatacccaacaccggggccgagcgctggg 1560
agggcggcggttcccgagaagccgggaaggcggtggccggctgacctttgtgacttggcg 1620
atggatgcggccatggagaatgtccgtccgaagcgacgcgacaattagcctggctaccat 1680
cgatataaattgggtgattcccagctcttgatgggcgtgtcttctgcctggcagccctcg 1740
tcttcagatcaagcaactgtgtgctgatacctcttccgccATGTACGCCAAGTTCGCGACC 1800
M Y A K F A T
CTCGCCGCCCTTGTGGCTGGCGCCGCTGCTCAGAACGCCTGCACTCTGACCGCTGAGAAC 1860
L A A L V A G A A A Q N A C T L T A E N
CACCCCTCGCTGACGTGGTCCAAGTGCACGTCTGGCGGCAGCTGCACCAGCGTCCAGGGT 1920
H P S L T W S K C T S G G S C T S V Q G
TCCATCACCATCGACGCCAACTGGCGGTGGACTCACCGGACCGATAGCGCCACCAACTGC 1980
S I T I D A N W R W T H R T D S A T N C
TACGAGGGCAACAAGTGGGATACTTCGTACTGCAGCGATGGTCCTTCTTGCGCCTCCAAG 2040
Y E G N K W D T S Y C S D G P S C A S K
TGCTGCATCGACGGCGCTGACTACTCGAGCACCTATGGCATCACCACGAGCGGTAAGTCC 2100
C C I D G A D Y S S T Y G I T T S G N S
CTGAACCTCAAGTTCGTACCAAGGGCCAGTACTCGACCAACATCGGCTCGCGTACCTAC 2160
L N L K F V T K G Q Y S T N I G S R T Y
CTGATGGAGAGCGACACCAAGTACCAGAgtaagttcctctcgcacccggccgcccgggaga 2220
L M E S D T K Y Q M
tgatggcgcccagcccgctgacgcgaatgacacaGTGTTCCAGCTCCTCGGCAACGAGTT 2280
F Q L L G N E F
CACCTTCGATGTCGACGTCTCCAACCTCGGCTGCGGCCTCAATGGCGCCCTCTACTTCGT 2340
T F D V D V S N L G C G L N G A L Y F V
GTCCATGGATGCCGATGGTGGCATGTCCAAGTACTCGGGCAACAAGGCAGGTGCCAAGTA 2400
S M D A D G G M S K Y S G N K A G A K Y
CGGTACCGGCTACTGTGATTCTCAGTGGCCCCGCGACCTCAAGTTCATCAACGGCGAGGC 2460
G T G Y C D S Q C P R D L K F I N G E A
CAACGTAGAGAACTGGCAGAGCTCGACCAACGATGCCAACGCCGGCACGGGCAAGTACGG 2520
N V E N W Q S S T N D A N A G T G K Y G
CAGCTGCTGCTCCGAGATGGACGTCTGGGAGGCCAACACATGGCCGCCGCCTTCACTCC 2580
S C C S E M D V W E A N N M A A A F T P
CCACCCTTGACCGGTGATCGGCCAGTCCGCGCTGCGAGGGCGACTCGTGCGGCGGTACCTA 2640
H P C W V I G Q S R C E G D S C G G T Y



CAGCACCGACCGCTATGCCGGCATCTGCGACCCCGACGGATGCGACTTCAACTCGTACCG 2700
 S T D R Y A G I C D P D G C D F N S Y R
 CCAGGGCAACAAGACCTTCTACGGCAAGGGCATGACGGTCGACACGACCAAGAAGATCAC 2760
 Q G N K T F Y G K G M T V D T T K K I T
 GGTCGTCACCCAGTTCTCAAGAACTCGGCCGGCGAGCTCTCCGAGATCAAGCGGTTCTA 2820
 V V T Q F L K N S A G E L S E I K R F Y
 CGTCCAGAACGGCAAGGTCATCCCCAACTCCGAGTCCACCATCCCGGGCGTCGAGGGCAA 2880
 V Q N G K V I P N S E S T I P G V E G N
 CTCCATCACCCAGGACTGGTGCGACCGCCAGAAGGCCGCCTTCGGCGACGTGACCGACTT 2940
 S I T Q D W C D R Q K A A F G D V T D ?
 NCAGGACAAGGGCGGCATGGTCCAGATGGGCAAGGCCCTCGCGGGGGCCCATGGTCCTCGT 3000
 Q D K G G M V Q M G K A L A G P M V L V
 CATGTCCATCTGGGACGACCACGCCGTCAACATGCTCTGGCTCGACTCCACCTGGCCCAT 3060
 M S I W D D H A V N M L W L D S T W P I
 CGACGGCGCCGGAAGCCGGGCGCCGAGCGCGGTGCCTGCCCCACCACCTCGGGCGTCCC 3120
 D G A G K P G A E R G A C P T T S G V P
 CGCTGAGGTCGAGGCCGAGGCCCCCAACTCCAACGTCATCTTCTCCAACATCCGCTTCGG 3180
 A E V E A E A P N S N V I F S N I R F G
 CCCCATCGGCTCCACCGTCTCCGGCCTGCCCCGACGGCGGCAGCGGCAACCCCAACCCGCC 3240
 P I G S T V S G L P D G G S G N P N P P
 CGTCAGCTCGTCCACCCCGGTCCCCTCCTCGTCCACCACATCCTCCGGTTCCTCCGGCCC 3300
 V S S S T P V P S S S T T S S G S S G P
 GACTGGCGGCACGGGTGTCGCTAAGCACTATGAGCAATGCGGAGGAATCGGGTTCACTGG 3360
 T G G T G V A K H Y E Q C G G I G F T G
 CCCTACCCAGTGCGAGAGCCCCTACACTTGACCAAGCTGAATGACTGGTACTCGCAGTG 3420
 P T Q C E S P Y T C T K L N D W Y S Q C
 CCTGTAAacgaacctctctgaaggaggttctgagacacgcgcgattcttctgtatatagt 3480
 L *
 tttattttttcaactctggagtgtctcgctccaccagtacataaaccttttttttcacgtaa 3540
 caaaatggcttcttttcagaccatgtgaaccatcttgatgccttgacctcttcagttctc 3600
 actttaacgtagtttcgcgttagtctgtatgtcccagttgcatgtagttgagataaaatacc 3660
 cctggaagtgggtctgggcctttgtgggacggagccctctttctgtggtctggagagccc 3720
 gctctctaccgcctaccttcttaccacagtacactactcacacattgctgaactgaccca 3780
 tcataccgtactttatcctgttaattcgtggtgctgtcgactattctatttgctcaaattg 3840
 gagagcacattcatcggcgcagggatacacggtttatggaccccaagagtgttaaggacta 3900
 ttattagtaatatattatgatgcctctaggcgccttaacttcaacaggcgagcactactaatc 3960
 aacttttggttagaccaattacaaacgaccatacgtgccggaaattttgggattccgtcc 4020



gctctccccaaccaagctagaagaggcaacgaacagccaatcccgggtgctaattaaatta 4080
 tatgggttcatttttttaaaaaattttttcttcccattttcctctcgctttttctttttc 4140
 gcatcgtagttgatcaaagtccaagtcaagcgagctatttggtgctatagctcggtggcta 4200
 taatcagtagcagcttagagaggctgtaaaggtagatgataccacagcagtagtattcgcgctata 4260
 agcggcactcctagactaattggttacgggtctacagaagtaggtaataaaagcggttaattg 4320
 ttctaaatactagaggcacttagagaagctatctaaatatattgaccctagcttatta 4380
 tccctattagtaagtttagttagctctaacctatagatagccaaatgctataataggtacc 4440
 aggggttcaaaa 4451

2. azonosítószámú szekvencia:

A teljes *Chrysosporium* CBH1 fehérje szekvenciája. A feltételezett szignálszekvencia (1-19) dőlt betűvel van jelölve, és a cellulózkötő domén (496-526) vastag aláhúzott betűvel van jelölve.

MYAKFATLAA LVAGAAAQNA CTLTAENHPS LTWSKCTSGG SCTSVQGSIT 50
 IDANWRWTHR TDSATNCYEG NKWDTSYCSD GPSCASKCCI DGADYSSTYG 100
 ITTSGNSLNL KFTVTKGQYST NIGSRTYLME SDTKYQMFQL LGNEFTFDVD 150
 VSNLGCGLNG ALYFVSMDAD GGMSKYSNGK AGAKYGTGYC DSQCPRDLKF 200
 INGEANVENW QSSTNDANAG TGKYGSCCSE MDVWEANNMA AAFTPHPC?V 250
 IGQSRCEGDS CGGTYSTDRY AGICDPDGCD FNSYRQGNKT FYGKGMTVDT 300
 TKKITVVTQF LKNSAGELSE IKRFYVQNGK VIPNSESTIP GVEGNSITQD 350
 WCDRQKAAFG DVTD?QDKGG MVQMGKALAG PMVLVMSIWD DHAVNMLWLD 400
 STWPIDGAGK PGAERGACPT TSGVPAEVEA EAPNSNVIFS NIRFGPIGST 450
 VSGLPDGGSG NPNPPVSSST PVPSSSTTSS GSSGPTGGTG VAKHYEQCGG 500
IGFTGPTQCE SPYTCTKLND WYSQCL * 526



3. azonosítószámú szekvencia:

A teljes *Chrysosporium* Xyl1 gén DNS-szekvenciája a promóter és terminátor szekvenciával együtt. A promóter szekvencia (1-969), terminátor szekvencia (2428-3030 (3028)) és intron szekvenciák (1043-1116, 1181-1332 (1331), 1596 (1595) - 1674 (1672) kisbetűvel vannak jelölve.

```

tcatcaacttggcggttggatgtactaatattacacgctcgtttgcnnagcggagtcgtgtg 60
tcatctccgtgggggtcgggtgctccagacgacgcttcgggccgatcctgaattcggggaag 120
gaaacgggttcggctaatacaggtcctctaaaatataacgaagcactacagagggagttcct 180
cagaggacatcgtatcaaccgaagaacgaagcgccgaaaggactgatcaaacaggagta 240
ggtaggggatgtgtgagtacctaactttccatacctgacataaaatcatcatggtgcttc 300
agacctgtttgatgaggcgagggcgaggccgcattgtatttcggttccttccttctttt 360
tgtagtatatctnagggttccatcgtaaaatggaatcttcagctctactagtaattag 420
aacaatagttctgatgtcgtgcgccaagctttttcagatgactgccaaaaacccatcatg 480
ggtatggacaaaagcagtaatcggagtcacaacgccgcattttccttcatgatttccgtc 540
aaccggagaggtcggaggaggactccggccacatgtgatgcgaagaagtacatggcgcca 600
tggttctaacctcttatagtctgaaaatgcgcgaggccagcgaagccaagcccgggaac 660
cggtccttgatggtttcagattgtttcgctaaacattctatccgattcgcgataggtg 720
cggctgccaccgaaggttgtatccttaaagcttttgtaagtacggagtacggaaatggaa 780
acgcgccgcagtccttggttccatcgggtatcctccgcagtgcctccgcaaaaaaagaaaacc 840
cgggtatgtttacaaaggatataagagacaagatgcaccacccgcccccttcccatctgc 900
cggttgccacgctcgccgtcgactgcttgctcgcttctacctgcagcctctttcagaga 960
ccatcaaacATGCGTACTCTTACGTTTCGTGCTGGCAGCCGCCCGGTGGCTGTGCTTGCC 1020
          M R T L T F V L A A A P V A V L A
CAATCTCCTCTGTGGGGCCAGTgtatgtaattgccttactcggaataatagtcaccactag 1080
Q S P L W G Q C
agggacttaagctcactacttcctgtttcacaaatagGCGGCGGTCAAGGCTGGACAGGTC 1140
          G G Q G W T G
CCACGACCTGCGTTTCTGGCGCAGTATGCCAATTCGTCAAgtcagtaactgcttttatt 1200
P T T C V S G A V C Q F V N

```



tcttttctctctggtgattacgatttcgttttgcacttagcttggttctgcatttcattgt 1260

tgtattgttctctttttgtgtgtgagaggttttattaccacctaagggccatttgctaac 1320

aaatctccccagTGACTGGTACTCCCAATGCGTGCCCGGATCGAGCAACCCTCCTACGGG 1380
D W Y S Q C V P G S S N P P T G

CACCACCAGCAGCACCCTGGAAGCACCCCGGCTCCTACTGGCGGCGGCGGCAGCGGAAC 1440
T T S S T T G S T P A P T G G G G S G T

CGGCCTCCACGACAAATTCAAGGCCAAGGGCAAGCTCTACTTCGGAACCGAGATCGATCA 1500
G L H D K F K A K G K L Y F G T E I D H

CTACCATCTCAACAACAATGCCTTGACCAACATTGTCAAGAAAGACTTTGGTCAAGTCAC 1560
Y H L N N N A L T N I V K K D F G Q V T

TCACGAGAACAGCTTGAAGTGGGATGCTACTGAGCgtgagtgacctctcctccttctccc 1620
H E N S L K W D A T E P

gacaataatagataattacgagccggttcgaggctgacattgcgcgattctagCGAGCC 1680
S R

GCAATCAATTCAACTTTGCCAACGCCGACGCGGTTGTCAACTTTGCCAGGCCAACGGCA 1740
N Q F N F A N A D A V V N F A Q A N G K

AGCTCATCCGCGGCCACACCCTCCTCTGGCACTCTCAGCTGCCCGAGTGGGTGCAGAACA 1800
L I R G H T L L W H S Q L P Q W V Q N I

TCAACGACCGCAACACCTTGACCCAGGTCATCGAGAACCACGTCACCACCCTTGTCACCTC 1860
N D R N T L T Q V I E N H V T T L V T R

GCTACAAGGGCAAGATCCTCCACTGGGACGTCGTTAACGAGATCTTTGCCGAGGACGGCT 1920
Y K G K I L H W D V V N E I F A E D G S

CGCTCCGCGACAGCGTCTTCAGCCGCGTCCTCGGCGAGGACTTTGTGCGCATCGCCTTCC 1980
L R D S V F S R V L G E D F V G I A F R

GCGCCGCCCCGCGCCGCGGATCCCAACGCCAAGCTCTACATCAACGACTACAACCTCGACA 2040
A A R A A D P N A K L Y I N D Y N L D I

TTGCCAACTACGCCAAGGTGACCCGGGGCATGGTCGAGAAGGTCAACAAGTGGATCGCCC 2100
A N Y A K V T R G M V E K V N K W I A Q

AGGGCATCCCGATCGACGGCATCGGCACCCAGTGCCACCTGGCCGGGCCCCGGCGGGTGA 2160
G I P I D G I G T Q C H L A G P G G W N

ACACGGCCGCGCGGCTCCCCGACGCCCTCAAGGCCCTCGCCGCGGCCAACGTCAAGGAGA 2220
T A A G V P D A L K A L A A A N V K E I

TCGCCATCACCGAGCTCGACATCGCCGGCGCCTCCGCCAACGACTACCTCACCGTCATGA 2280
A I T E L D I A G A S A N D Y L T V M N

ACGCCTGCCTCCAGGTCTCCAAGTGCGTCGGCATCACCGTCTGGGGCGTCTCTGACAAGG 2340
A C L Q V S K C V G I T V W G V S D K D

ACAGCTGGAGGTGAGCAGCAACCCGCTCCTCTTCGACAGCAACTACCAGCCAAAGGCGG 2400
S W R S S S N P L L F D S N Y Q P K A A

CATACAATGCTCTGATTAATGCCTTGTAAGaggagggtatattatttttagaggcaatgaa 2460
Y N A L I N A L *



gctaggaggaaagaggggaagtgaggtaattagctaggacaggcaaatctagcagcaatt 2520
 ataagtcaacactatataaaatattcctataatggcttggtgcttcggtgtgcaaaaaaaa 2580
 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaactcaaaaacaaaatgatccaacatgatt 2640
 cgaaatggcgaccttgcaaatgcacacctcagataataccactatacaatacaccttaaa 2700
 tggcacctaaatccatttgtctgcggtcatagacggggcttaagaagcctgggatgcagg 2760
 tgtcgatgcaagggttacgtcagtgatgatagatgaacctgctgtctgggtaat 2820
 tctccactttccctccccttacgactcttcgggtgtgcctctctagaaagtcgactcctg 2880
 gcgcctcagatcgccctttggctctgttcggtacaatgacgtccgctgggtttcttccaaa 2940
 gaccaggtatttctcccgtggcaacaagaataccaaatacctatatcgaaccgtagtct 3000
 tctgataattagatgtctctcaaggcgcg 3030

4. azonosítószámú szekvencia:

A teljes *Chrysosporium* Xyl1 fehérje szekvenciája. A feltételezett szignálszekvencia (1-20) dőlt betűvel van jelölve, és a cellulózkötő domén (22-53) vastag aláhúzott betűvel van jelölve.

1 **MRTLTFVLAA** **APVAVLAQSP** **LWGQCGGQGW** **TGPTTCVSGA** **VCQFVNDWYS**
 51 **QCV**PGSSNPP TGTTSSTTGS TPAPTGGGGS GTGLHDKFKA KGKLYFGTEI
 101 DHYHLNNNAL TNIVKKDFGQ VTENSLKWDA TEPSRNQFNF ANADAVVNFA
 151 QANGKLIRGH TLLWHSQLPQ WVQNINDRNT LTQVIENHVT TLVTRYKGKI
 201 LHWDVVNEIF AEDGSLRDSV FSRVLGEDFV GIAFRAARAA DPNAKLYIND
 251 YNLDIANYAK VTRGMVEKVN KWIAQGIPID GIGTQCHLAG PGGWNTAAGV
 301 PDALKALAAA NVKEIAITEL DIAGASANDY LTMNACLQV SKCVGITVWG
 351 VSDKDSWRSS SNPLLFDSNY QPKAAYNALI NAL*



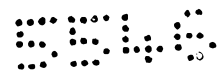
5. azonosítószámú szekvencia:

A részleges *Chrysosporium* GPD1 gén DNS-szekvenciája a promóter és terminátor szekvenciával együtt. A promóter szekvencia (1-1555) és intron szekvencia (1682-1781) kisbetűvel van jelölve.

```

tgagcagcaatgagcagcaatgagcattcctgggccaccgagtctgagtgccagtacgga 60
gtatcgtacttcgtaccggggtttgatttggtgacggtgcttttcacctctcgatgcccg 120
aaatcgggtctaagctgagtttgatcaaatatgtgactccaacatcgcccccttcggcaa 180
accccgtcgacacgtgtgtcatccttcattgcaagcgatcactcgcagggcgtgacgat 240
gaacgagatTTTTGCCCggaccgattcgcggaatatagcggcagccgaccagccctaccac 300
actgatggccgtgtcactagtgtatgctcccagaaccgcaagcatacactgggcaatgct 360
tggtatgcagttgaggcagctttatgtttccatacccttccacttcggctcggggactcg 420
gcgggggtcgcggaagtTTTgacggcagccgtcgggccttaggccgagattaccgtggttgt 480
ggcccagtttttagccgttcccgtccgtttcctaccggaccatgattttcgtgaaccattg 540
caatcccgaagcgcattttccgacgttaaggagttacctccgctgcccagaattcatgatc 600
gtggccgggtcaaggcagcgtggcggggcatccgtgtcaagctcccaggaggaggtgcgc 660
gatttcaaatccggggccaaaacaggccaagactggctggccaaaaaaaggagcgtagacg 720
gcccgggacatcgagcgtcagctcgcagccacccaaaaccggtccgatctactcgcttac 780
tgtggtagttcaggtacttttgagtagtaaaaacgctacggcagggccgggggggtcccc 840
ggtgacggaggtgcctctgcggtggcgaacatcccacgcactctcgagctacggtgacac 900
ctcgtgtcctgttggtcttgcaatgctggggcggcaggaaatgcgtcgcgctcctcccg 960
ccaagacctaaaacagacagcgcgcgcaaagtcgctcactagcaccgcgaaacgaagatgc 1020
cccacctcaacgcaatctgtgatgcaagcaattgggaaggctcacccacctcagcgagg 1080
ggctcaaccatttttattatcagctcatgccaccacaacatgactgttttctttccttgc 1140
tcatcccacatttgacaaaaatcgtcgattaatctctttccatacaggccgtccgcgctc 1200
tgataaccacataaaaagtctcttcagtcacagctcaaagctccctcatccctccaggta 1260
agcagccaaagagctccccacggaccccgactgcctcatccgcctgtatcggaacctg 1320
cgcgacccagcagagaatcccaaacctttgctgcttgctgcccgggttccggactgagctg 1380
caacccaagccttttaaaaagcttttcccttctccacgggtgtcaactctgtcctatccct 1440

```

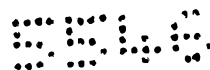


ccgacatccgttgagctcaacaactccccgaacctttttaccccgcgccgagctaccctc 1500
catcaaaccaccctgacagctcgctcactcacctccccacatcacagaaatcaaaaATGAC 1560
M T -
TATCAAGGTCGGCATCAACGGTTTTCGGCCGTATCGGCCGTATCGTCTTCCGCAACTCCAT 1620
I K V G I N G F G R I G R I V F R N S I -
CGAGCACTCGGATGTCGAGATCGTTGCCGTCAACGACCCCTTCATTGAGCCCAAGTACGC 1680
E H S - D V E I V A V N D P F I E P K Y A -
TgtaagtagtTTTTTTTTTccttcctcgcgttctttcctgttccatcgacagtacgagat 1740
GatcttgaggcggtcgagctaaccgcgattgtcgtagGAGTACATGCTCAAGTAT 1800
E Y M L K Y -
GACTCGACCCACGGTATCTTCAACGGCACCATCGCCGTGAGGGCAACGACCTCATTGTC 1860
D S T H G I F N G T I A V E G N D L I V -
AACGGCAAGAGGGTCAAGTTCTACACTGAGCGGGMCCCCGCCAACATTCCCTGGARGGAA 1920
N G K R V K F Y T E R ? P A N I P W ? E -
ACTGGTGCCGAGTACATMRTCGAGTCGACCGGTGTGTTCCACAMCACCAGGAGGCTAGC 1980
T G A E Y I ? E S T G V F T ? T ? K A S -
GCCACCTCAAGGGCGGCGCCAAGCGCGTCATCATCTCTGCTCCCTCGGCCGATGCCCCC 2040
A H L K G G A K R V I I S A P S A D A P -
ATGTACGTCATGGGCGTCAACGAGAAGACCTACGACGGCAAGGCCAGGTCATCTCTAAC 2100
M Y V M G V N E K T Y D G K A Q V I S N -
GCCTCGTGACCACTGACCTGGCTCCCTCGCCAAGGTCATCCACGACAAGTTCGGC 2160
A S C T T N C L A P L A K V I H D K F G -
CTCGTTGAGGGTCTCATGACCACCGTCCACTCCTACACTGCCACCCAGAAGACCGTCGAT 2220
L V E G L M T T V H S Y T A T Q K T V D -
GGTCCCTCTGCCAAGGACTGGCGTGGTGGCCGTGGTGCTGCTCAGAACATCATCCCCAGC 2280
G P S A K D W R G G R G A A Q N I I P S -
AGCACTGGCGCCGCCAAGGCCGTGCGCAAGGTCATCCCTGAGCTCAACGGCAAGCTCACC 2340
S T G A A K A V G K V I P E L N G K L T -
GGCATGTCCCTCCGTGTCCCCACCCCCAACGTTTCCGTGTCGACCTACCTGCCGCCTC 2400
G M S L R V P T P N V S V V D L T C R L -
GAGAAGGAGGCTACCTACGACGACATCAAGGCCGCCATCAAGGAGGCCGCCGCCGCCGCC 2460
E K E A T Y D D I K A A I K E A A A G P -
CTCAAGGgtgagttatctggttcctttttttttttttttggagaacgacacatgctgataaa 2520
L K G
acccagGCATCCTCGACTACACTGAGG 2547
I L D Y T E

6. azonosítószámú szekvencia:

A részleges *Chrysosporium* GPD1 fehérje aminosav-szekvenciája (A C-terminális szekvencia nem áll rendelkezésre).

MTIKVGINGF GRIGRIVFRN SIEHSDVEIV AVNDPFIEPK YAEYMLKYDS
THGIFNGTIA VEGNDLIVNG KRVKFYTER? PANIPW?ETG AEYI?ESTGV
FT?T?KASAH LKGGAKRVII SAPSADAPMY VMGVNEKTYD GKAQVISNAS
CTTNCLAPLA KVIHDKFGLV EGLMTTVHSY TATQKTVDGP SAKDWRGGRG
AAQNIIPSST GAAKAVGKVI PELNGKLTGM SLRVPTPNVS VVDLTCRLEK
EATYDDIKAA IKEAAAGPLK GILDYTE



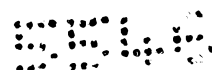
SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. *Chrysosporium*ből származó, 7. glikozil hidroláz családnak megfelelő fehérje, amely legalább 75%-ban azonos aminosav-szinten [BLAST-algoritmussal meghatározva] a 2. azonosítószámú aminosav-szekvenciával, vagy legalább 20, folyamatosan egymáshoz kapcsolódó aminosavból álló részlete, amely megegyezik a 2. azonosítószámú szekvencia 1-246. vagy 394-526. aminosavait tartalmazó aminosav-szekvencia megfelelő részével.

2. *Chrysosporium*ből származó, 10. glikozil hidroláz családnak megfelelő fehérje, amely legalább 70%-ban azonos aminosav-szinten [BLAST-algoritmussal meghatározva] a 4. azonosítószámú aminosav-szekvenciával, vagy legalább 20, folyamatosan egymáshoz kapcsolódó aminosavból álló részlete, amely megegyezik a 4. azonosítószámú szekvencia 1-133. vagy 252-383. aminosavait tartalmazó aminosav-szekvencia megfelelő részével.

3. *Chrysosporium*ből származó, 10. glikozil hidroláz családnak megfelelő fehérje, amely legalább 65%-ban azonos aminosav-szinten [BLAST-algoritmussal meghatározva] a 4. azonosítószámú aminosav-szekvenciával, vagy legalább 20, folyamatosan egymáshoz kapcsolódó aminosavból álló részlete, amely megegyezik a 4. azonosítószámú szekvencia 1-383. aminosavait tartalmazó aminosav-szekvencia megfelelő részével.

4. Egy 10. glikozil hidroláz családnak megfelelő fehérje, amely olyan cellulózkötő domént tartalmaz, amely le-



galább 55%-ban azonos aminosav-szinten a 4. azonosítószámú szekvencia 22-53. aminosavait tartalmazó aminosav-szekvenciával, és/vagy legalább 20, folyamatosan egymáshoz kapcsolódó aminosavat tartalmaz a 4. azonosítószámú szekvencia 22-53. aminosavait tartalmazó aminosav-szekvenciából, és/vagy a 44. relatív helyzetben F, W és Y aminosavak közül legalább egyet tartalmaz.

5. *Chrysosporium*ból származó, glicerinaldehid-foszfát dehidrogenáznak megfelelő fehérje, amely legalább 86%-ban azonos aminosav-szinten [BLAST-algoritmussal meghatározva] a 6. azonosítószámú részleges aminosav-szekvenciával, vagy legalább 20, folyamatosan egymáshoz kapcsolódó aminosavból álló részlete, amely megegyezik a 6. azonosítószámú szekvencia 1-277. aminosavait tartalmazó aminosav-szekvencia megfelelő részével.

6. Eljárás β -glikozidos kötések hidrolizálására, azzal jellemezve, hogy 1. igénypont szerinti enzimet alkalmazunk.

7. Eljárás β -xilozidos kötések hidrolizálására, azzal jellemezve, hogy 2., 3. vagy 4. igénypont szerinti enzimet alkalmazunk.

8. Nukleinsavszekvencia, amely 1-5. igénypontok bármelyike szerinti fehérjét kódol.

9. Nukleinsavszekvencia, amely az 1., 3. és 5. azonosítószámú nukleinsavszekvenciák bármelyikének 5'-végi nem-kódoló régiójában lévő nukleotidok legalább 70%-át tartalmazza.

10. Nukleinsavkonstrukció, amely *Chrysosporium*ból származó nukleinsav-expressziós szabályzó régiót tartalmaz.

az 1., 3. vagy 5. azonosítószámú nukleinsavszekvenciák bármelyikének 5'-végi nem-kódoló régiójában, működőképesen kapcsolva a kérdéses polipeptidet kódoló nukleinsavszekvenciához.

11. Rekombináns mikroorganizmus-törzs, előnyösen gombatörzs, amely 8-10. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavszekvenciát tartalmaz, és a kódoló nukleinsavszekvencia által kódolt polipeptidet képes expresszálni.

12. Eljárás polipeptid előállítására, azzal jellemezve, hogy 10. igénypont szerinti konstrukciót vagy 11. igénypont szerinti mikroorganizmus-törzset alkalmazunk.

13. Oligonukleotid-próba, amely legalább 15, folyamatosan egymáshoz kapcsolódó nukleotidot tartalmaz az 1., 3. vagy 5. azonosítószámú nukleinsavszekvenciák bármelyikéből vagy komplementerjéből.

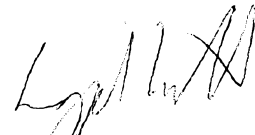
14. A 13. igénypont szerinti oligonukleotid-próba, amely 20-50 nukleotid hosszúságú.

15. A 13. vagy 14. igénypont szerinti oligonukleotid-próba, amely detektálható jelölővel jelölt próba.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



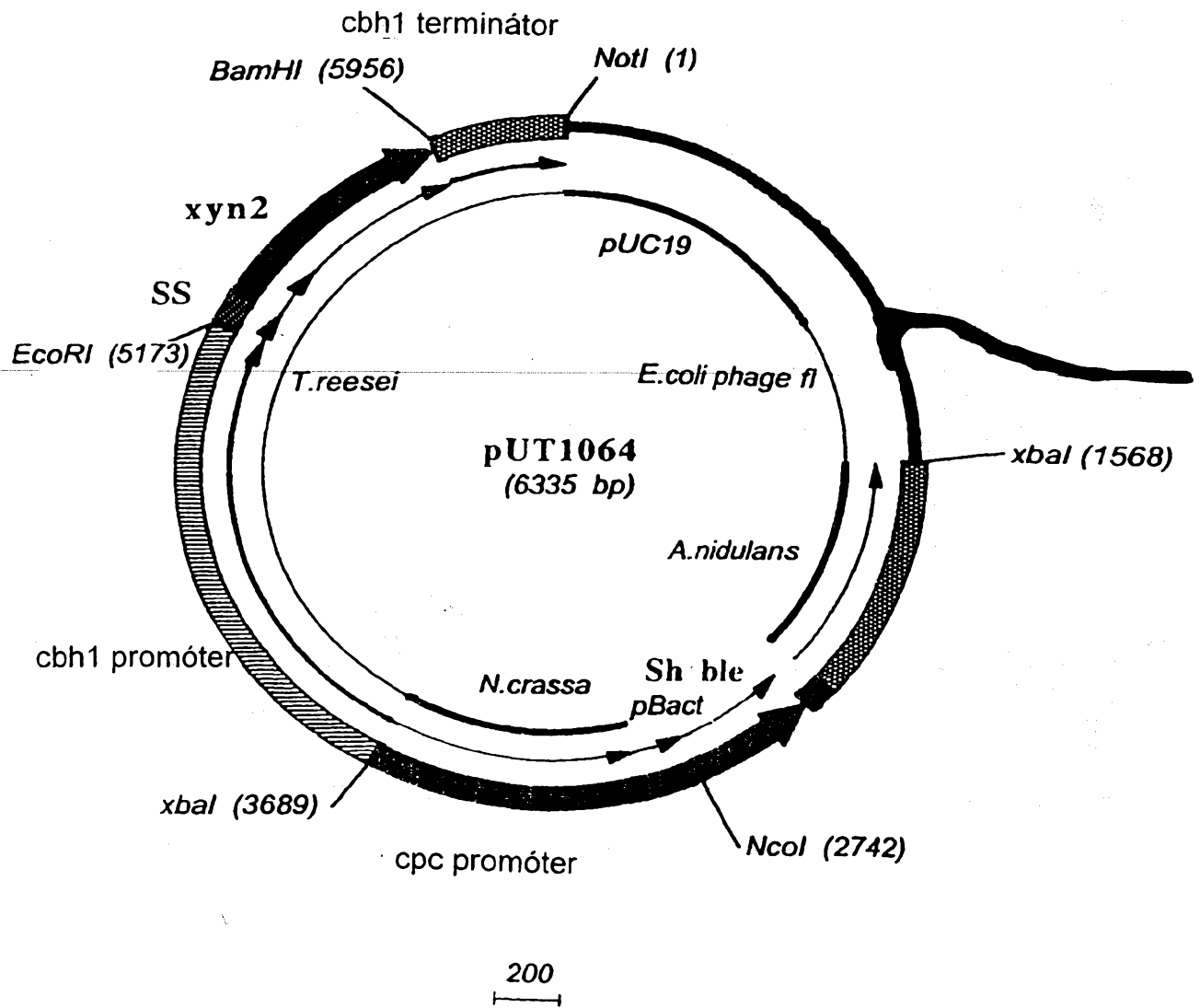
Lengyel Zsolt

szabadalmi ügyvivőjelölt

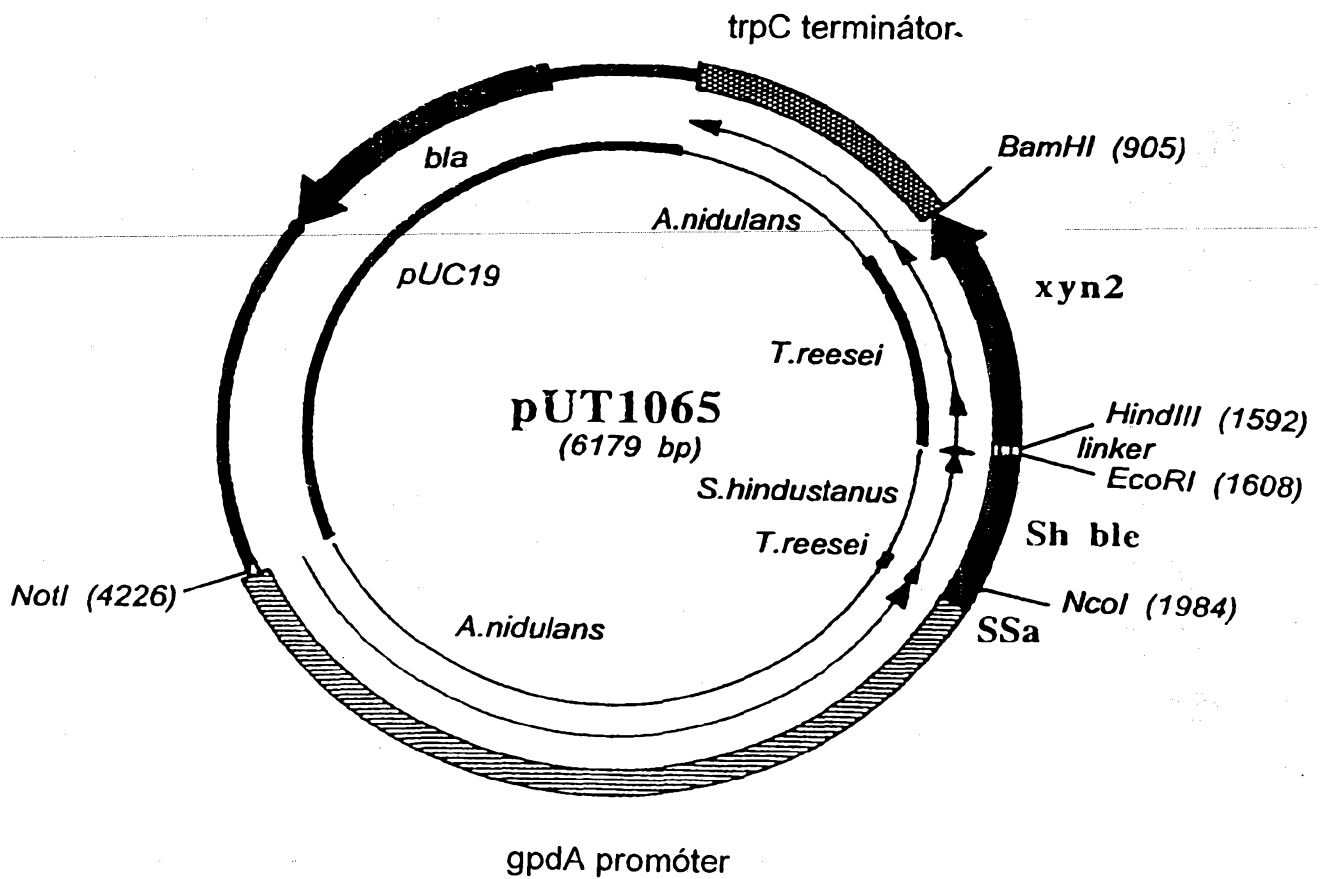
F. Csikó

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

A2



1. ábra



200

2. ábra