



FI 000091083B

(B) (11) **KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT** 91083

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 10 08 1994

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 12N 15/11

SUOMI-FINLAND

(FI)

**Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 864301
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 23.10.86
(24) Alkupäivä - Löpdag 23.10.86
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 25.04.87
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. -
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 31.01.94
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet
24.10.85 DK 4889/85 P

(71) Hakija - Sökande

1. Danisco A/S, 5, Langebrogade, 1411 Koebenhavn K, Danmark, (DK)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Marcker, Kjeld Adrian, 1, Toftevej, 8250 Egå, Danmark, (DK)
2. Jensen, Erik Oestergård, 19, Laurbaervaenget, 8310 Tranbjerg, Danmark, (DK)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä geenien ilmentämiseksi hiivassa, ja DNA-sekvenssejä sekä plasmideja, jotka käsittävät kyseisiä DNA-sekvenssejä käytettäväksi menetelmän toteuttamiseksi
Förfarande för expression av gener i jäst, och DNA-sekvenser samt plasmider innehållande dessa DNA-sekvenser för användning vid förfarandet

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Plant Molecular Biology, Blackie & Son Ltd., 1984 pp 98-111

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää geenien ilmentämiseksi hiivassa, saattamalla hiivasoluun yhdistelmä-DNA:n palanen, joka sisältää sekä ilmennettävän geenin etä viereisen 5'-alueen, joka sisältää promoottori-sekvenssin, ja viljelemällä transformoituja hiivasoluja kasvualustassa, käyttäen yhdistelmä-DNA:n palasena palasta, jossa viereinen 5'-alue käsittää ensimmäisen DNA-palasan, joka sisältää promoottori-sekvenssin yhdistyneenä toiseen DNA-palaseen, joka sisältää esisekvenssin, jota säätelevät posttranskriptionaalisella tasolla hemi, hemianalogit tai hemiprekursorit. Edelleen keksintö koskee DNA-palasia ja plasmideja käytettäväksi menetelmän toteutuksessa. Toteutuksessa menetelmää keksinnön mukaisesti, saavutetaan geenien lisääntynyt ilmeneminen isäntäsolun vähentyneen geneettisen kuormituksen kautta ja proteiinisynteesielinten ja energia-aineenvaihdunnan optimaalisemman hyväksikäytön kautta.

Uppfinningen avser förfarande för uttryckning av gener i jäst genom införande in till en jästcell en rekombinant-DNA-segment innehållande både den uttryckbara genen och bredvidliggande 5'-region som innehåller en promotorsekvens, och genom odling av transformerade jästceller i växtmedium medelst rekombinant-DNA-segment vari den bredvidliggande 5'-regionen omfattar det första DNA-fragmentet innehållande en promotorsekvens i kombination med det andra DNA-fragmentet innehållande en ledarsekvens, vilken regleras på posttranskriptional nivå med hemi, hemianaloger eller hemiprekursorer. Uppfinningen avser vidare, DNA-fragment och plasmider för att användas för utförande av förfarandet. När man genomför förfarandet enligt uppfinningen uppnår man ökad uttryckande av gener genom minskad genetisk belastning av värdcell och genom mera optimalisk utnyttjande av proteinsyntesorgan och energimetabolism.

Menetelmä geenien ilmentämiseksi hiivassa, ja DNA-sekvenssejä sekä plasmideja, jotka käsittävät kyseisiä DNA-sekvenssejä käytettäväksi menetelmän toteuttamiseksi

Keksintö koskee uutta menetelmää geenien ilmentämiseksi hiivassa, ja DNA-sekvenssejä kuin myös plasmideja, jotka sisältävät mainittuja DNA-sekvenssejä käytettäväksi menetelmän toteuttamiseksi.

Kuvauksessa käytetään muun muassa seuraavia ilmaisuja:

Promoottorialue: DNA-sekvenssi, joka sisältää promoottorin ja kohdesekvenssejä RNA-polymeraasia varten sekä mahdollisia aktivointialueita, jotka sisältävät kohdesekvenssejä transkriptionaalaisia säätelyaineita varten.

Säätelyaine: Aineita, jotka toteuttavat tai välittävät säätelytoimintaa. Näin ollen säätelyaineet sisältävät myös aineita, jotka vaikuttavat säätelytoimintaa toteuttavien tai välittävien aineiden konsentraatioon.

Esisekvenssi (signaalisekvenssi): Yleensä tarkoitetaan DNA-sekvenssiä, joka kopioidaan mRNA:han, mutta jota sekvenssiä ei edelleen siirretä (lueta) proteiiniin. Esisekvenssi käsittää näin ollen DNA-sekvenssin kopioinnin aloituksesta ATG-luennan aloituskodoniin. Esillä olevan keksinnön suhteen tällä tarkoitetaan lyhyttä DNA-sekvenssiä, jossa tyypillisesti on 40-70 emäsparia, ja joka käsittää kohdesekvenssejä posttranskriptionaaliselle säätelylle, jota toteuttaa tai välittää solunsisäinen hemi.

Lisäksi käytetään seuraavia ilmaisuja, jotka yleensä ovat tunnettuja henkilöille, jotka tuntevat molekyylibiologian alaa.

CAP-liitospaikka: Paikka, jossa 7-metyyli-GTP lisätään vastaavaan mRNA:han.

DNA-sekvenssi: Lineaarinen nukleotidien joukko, joita yhdistävät toisiinsa fosfodiesterisidokset vierekkäisten pentoosien 3' - ja 5' -hiiliatomien välillä.

Ilmeneminen: Prosessi, jonka rakennegeeni läpikäy polypeptidin tuottamiseksi. Se on transkription (kopioinnin) ja translaation (luennan) kuin myös mahdollisten posttranskriptionaalisten modifikaatioiden yhdistelmä.

Edeltävät alueet: DNA-sekvenssejä, jotka edeltävät koodaavia alueita. Edeltävät 5'-alueet sisältävät promoottorin. Edeltävät 3' -alueet voivat sisältää transkriptionaalisia lopettamissignaaleja jne.

Geeni: DNA-sekvenssi, joka koostuu kolmesta tai neljästä osasta, (1) geenituotetta koodaava sekvenssi, (2) promoottorialueen sekvenssit, jotka säätelevät sitä ilmeneekö geeni vai ei, (3) ne sekvenssit 3'-päässä, jotka säätelevät transkriptionaalista lopettamista ja valinnaista polyadenylaatiota sekä mahdollisesti (4) välissä olevat sekvenssit.

Välisekvenssit: DNA-sekvenssit geenin sisällä, jotka eivät koodaa mitään peptidikappaletta. Välisekvenssit kopioidaan esi-mRNA:han ja ne eliminoituvat prekursori-RNA:n modifikaation kautta mRNA:han.

Kloonaus: Prosessi, jossa saadaan organismien tai DNA-sekvenssien populaatio, joka on lähtöisin yhdestä sellaisesta organismista tai sekvenssistä suvuttoman lisääntymisen kautta, tai erityisemmin:

Prosessi, jossa eristetään tietty organismi tai osa siitä, ja tämän alafraktion lisääminen (kasvattaminen) homogeenisena populaationa.

Koodaava sekvenssi: DNA-sekvenssi, joka määrää polypeptidin aminohapposekvenssin.

Lähetti-RNA (mRNA): RNA-molekyyli, joka muodostetaan geenin kopioinnin tai prekursori-RNA:n mahdollisen modifikaation kautta. mRNA-molekyyli välittää geneettisen viestin määräämällä polypeptidin aminohapposekvenssin mRNA-molekyylin tullessa osittain siirretyksi (luetuksi) mainittuun peptidiin.

Nukleotidi: DNA:n tai RNA:n monomeerinen yksikkö, joka käsittää sokeriosan (pentoosi), fosfaatin, ja tyypellisen heterosyklisen emäksen. Emäs on kytkeytyneenä sokeriosaan glykosidisella sidoksella (pentoosin 1'-hiili), ja tämä emäksen ja sokerin yhdistelmä on nukleosidi. Emäs tekee nukleotidista tunnusomaisen. Neljä DNA-emästä ovat adeniini (A), guaniini (G), sytosiini (C), ja tyymiini (T). Neljä RNA-emästä ovat A, G, C ja urasiili (U).

Plasmidi: Ei-kromosomaalinen, kaksijuosteinen DNA-sekvenssi, joka käsittää käsittelemättömän replikonin, sellaisen, että plasmidi replikoituu isäntäsolussa. Kun plasmidi saatetaan yksisoluisen organismin sisään, muuttuvat tai transformoituvat sen organismin ominaisuudet plasmidin DNA:sta johtuen. Esimerkiksi plasmidi, jossa on tetrasykliinin resistenssin geeni (Tc^R), transformoi solun, joka aikaisemmin oli herkkä tetrasykliinille, sellaiseksi, joka on sille resistentti. Plasmidin transformoimaa solua kutsutaan transformantiksi.

Polypeptidi: Aminohappojen lineaarinen joukko, jotka ovat kytkeytyneet toisiinsa peptidisidosten välityksellä vierekkäisten aminohappojen α -amino- ja karboksiryhmien välillä.

Rekombinaatio: Uuden DNA-molekyylin syntyminen eri alkuperää olevien DNA-sekvenssien yhdistymisen kautta.

Replikointi: DNA-molekyylien kopiointiprosessi.

Replikoni: Itse-replikoiva geneettinen elementti, jossa on lähtökohta DNA-replikoinnin käyntiinpanolle, ja geenit, jotka spesifioivat toimintoja, jotka ovat välttämättömiä replikoinnin ohjaamiseksi.

Restriktiokappale: DNA-sekvenssi, joka muodostuu kaksijuosteisesta katkaisemisesta entsyymillä, joka tunnistaa spesifisen kohde-DNA:n sekvenssin.

RNA-polymeraasi: Entsyymi, joka toteuttaa DNA:n kopioinnin RNA:ksi.

Transformaatio: Prosessi, jossa solu ottaa vastaan plasmidin.

Translaatio (luenta): Prosessi polypeptidin tuottamiseksi mRNA:sta tai prosessi, jossa mRNA-molekyylissä läsnä oleva geneettinen informaatio määrää spesifisten aminohappojen järjestyksen polypeptidin synteessin aikana.

Transkriptio (kopiointi): Menetelmä vastaavan RNA-sekvenssin syntetisoimiseksi DNA-sekvenssistä.

Vektori: Plasmidi, faagi-DNA tai muut DNA-sekvenssit, jotka pystyvät replikointiin isäntäsolussa, ja joilla on yksi tai pieni määrä endonukleaasin tunnistuspaikkoja, joissa DNA-sekvenssit voidaan katkaista määritettävissä olevalla tavalla ilman siihen liittyvää DNA:n biologisen toiminnan oleellista menetystä, esim. replikaation, kuoriproteiinin tuottamisen tai promoottorin tai sidospaikkojen menetystä, ja jotka sisältävät markkerin, joka on sopiva käytettäväksi transformoitujen solujen identifioinnissa, esimerkiksi tetrasykliiniresistenssin tai ampicilliiniresistenssin muodossa. Vektoria nimitetään usein kloonausvälineeksi.

Biologisesti aktiivisen tuotteen tuottaminen yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla on monimutkainen asia, johon kuuluu monia

prosessivaiheita kopioinnin käyntiinpanemisesta biologisesti aktiivisen molekyylin lopulliseen toteuttamiseen.

Monia näistä prosessivaiheista ei esiinny prokarioottisilla organismeilla, mikä on syy siihen, miksi eukarioottisia tuotanto-organismeja täytyy käyttää monissa tapauksissa. Hiiva on eukarioottinen organismi, jonka synteesiaparaatti käsittää monia prosesseja ja säätelymekanismeja, jotka ovat ominaisia korkeammille organismeille. Hiivasoluilla on lisäksi lyhyt generaatioaika ja hiivan käytölle on olemassa tuhatvuotinen kokemuspohja viljeltävänä organismina.

Täysin ratkaisevia tekijöitä halutun geenituotteen biologisen synteessin kannalta ovat transkriptionaalisen käyntiinpanon mahdollisuus ja parantaminen sekä transkriptionaalinen ja posttranskriptionaalinen säätely geenin ilmentämisessä.

Näitä toimintoja toteuttavat pääasiassa edeltävät 5'-alueet. Suuri joukko prokarioottisten ja eukarioottisten geenien 5'-alueista on sekventoitu, ja muun muassa siihen perustuen on hankittu laaja tietämys geenin ilmenemisen säätelystä ja ala-alueista ja sekvensseistä, jotka ovat tärkeitä geenin ilmenemisen säätelylle. Säätelymekanismeissa on suuria eroja prokarioottisissa ja eukarioottisissa organismeissa, mutta näiden kahden ryhmän sisällä esiintyy monia yhteisiä piirteitä.

Geenin ilmenemisen säätely voi tapahtua transkriptionaalisella tasolla, ja silloin se tulee edullisesti näkyviin transkription käyntiinpanofrekvenssin säätelyn kautta. Viimeksi mainittu on hyvin tunnettua, ja sitä kuvailee muun muassa Benjamin Lewin, Gene Expression, John Wiley & Sons, vol. I, 1974, vol. II, toinen painos 1980, vol. III, 1977. Vaihtoehtoisesti säätelyä voi tapahtua posttranskriptionaalisella tasolla, esimerkiksi translaation käyntiinpanon frekvenssin säätelyssä translaationopeudessa ja translaation lopettamisen säätelyssä.

Leghemoglobiinit ovat monomeerisiä hemoproteiineja, joita yksinomaan syntetisoituu juurinystryöissä, joita kehittyy Rhizobiabakteerien ja hernekasvien symbioottisen yhteyden kautta. Looginen kandidaatti säätelyaineeksi, joka aktivoi leghemoglobiinigeenejä, on Rhizobiassa tuotettu hemi, joka muodostaa leghemoglobiinien prosteettisen ryhmän. Useiden hemoproteiini-
en synteesiä *Saccharomyces cerevisiae*-hiivassa säätelee myös solunsisäisen hemin taso, joka hemi muodostaa myös näiden proteiinien prosteettisen ryhmän. Näin ollen isosytokromi c-geenin transkriptio on hemistä riippuvainen, kun taas katalaasi T₁:n tapauksessa hemisäätelyä tapahtuu sekä transkriptionaalisella että posttranskriptionaalisella tasolla.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti tuodaan esille soijapavun neljän leghemoglobiinigeenin, Lba, Lbc1, Lbc2 ja Lbc3 edeltävien 5'-alueiden sekvenssit. Sekvenssit esitetään oheisessa sekvenssikaaviossa, kaavio 1, jossa sekvenssit on asetettu riviin siihen tapaan, että homologia näkyy selvästi.

Sekvenssikaaviossa "-" osoittaa, että mikään emäs ei ole läsnä kyseessä olevassa paikassa. Geenien nimet ja emäksen asema laskettuna vastavirtaan ATG-lähtökodonista ovat esitettyinä sekvenssikaavion oikealla puolella. Lisäksi tärkeät sekvenssit on alleviivattu.

Kuten käy ilmi sekvenssikaaviosta, on olemassa selvä homologian aste neljän edeltävän 5'-alueen välillä, ja asemassa 23-24 emäsparia vastavirtaan CAP-liitospaikasta ne kaikki sisältävät TATATAAA sekvenssin, joka vastaa "TATA" kehystä, joka eukariotissa soluissa sijaitsee tavallisesti vastaavan määrän emäspareja vastavirtaan CAP-liitospaikasta kohdalla. Edelleen CCAAG-sekvenssi on läsnä kohdalla 64-72 emäsparia vastavirtaan CAP-liitospaikasta mainitun sekvenssin vastatessa "CCAAT" kehystä, joka tavallisesti sijaitsee 70-90 emäsparia vastavirtaan CAP-liitospaikasta. CAP-liitospaikasta translaation lähtökodonin, ATG:hen, on läsnä esisekvenssejä, joissa on 52-59 emäsparia, ja niillä on selvä homologia-aste noin 75-80 %.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti on edelleen osoitettu Lbc3:n ollessa esimerkkinä, että soi-japavun leghemoglobiini-geenien edeltävät 5'-alueet ovat toiminnallisesti aktiivisia hiivassa. Viimeksi mainittu on osoitettu yhdistämällä E. Colin kloramfenikoliasetyylitransferaasi (CAT)-geeni soi-japavun Lbc3-geenin edeltäviin 5' ja 3'-alueisiin sellaisella tavalla, että CAT-geenin ilmenemistä ohjaa Lb-promoottori. Yhteensulautettu sekvenssi sijoitettiin hiivan plasmidivektoriin, YEP 24, joka sisälsi hiivan URA-3-geenin valintamarkkerina. Hiivakanta *S. cerevisiae* TML, joka on URA-3 ja kykenemätön syntetisoimaan hemiä mutaation johdosta δ -aminolevuliinihapposyntetaasi geenissä, δ -ALA, transformoitiin myöhemmin muodostuneella konstruktiolla. Transformoiduissa hiivasoluissa ilmeni CAT-aktiivisuutta kaikissa testatuissa kasvuolosuhteissa. Sen tähden voidaan tehdä johtopäätös, että soi-japavun leghemoglobiinigeenien edeltävät 5'-alueet ovat toimivia hiivassa.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti on lisäksi osoitettu, että edeltävät 5'-alueet toimivat kohteena säätelylle, jota intrasellulaarinen hemi toteuttaa tai välittää. CAT-aktiivisuus on näin ollen 20-40 kertaa korkeampi hiivassa *S. cerevisiae* TML, joka on kasvanut δ -ALA:n läsnä ollessa, kuin CAT-aktiivisuus hiivassa, joka on kasvanut ilman tätä hemiprekursoria kasvu-alustassa. Samanlaisia korkeita CAT-aktiivisuuksia oli läsnä hiivassa *S. cerevisiae* TML, joka oli kasvanut hemin, protoporfyyriini IX, tai hemianalogin, deuteroporfyyriini IX, läsnä ollessa. Hemin vaikutus CAT-aktiivisuuteen on spesifistä, koska URA-3-geenituotteen määrä pysyy vakiona kaikissa testatuissa olosuhteissa. Edelleen transkriptionaalinen taso ei ilmeisesti muutu hemin läsnäolon johdosta, koska CAT-mRNA-taso pysyy vakiona riippumatta muutoksista solunsisäisen hemin konsentraatiossa. Sen vuoksi voidaan päätellä, että hemin toteuttamaa tai välittämää säätelymekanismia esiintyy posttranskriptionaalisella tasolla.

Keksinnön oleelliset tunnusmerkit on esitetty oheisissa patenttivaatimuksissa.

CAT-aktiivisuuden havaittu lisääntyminen riippuu proteiinisynteesistä. CAT-entsyymien puoliintumisaika on lisäksi riippumaton hemin läsnäolosta, eikä hemi stimuloi CAT-aktiivisuutta *in vitro*. Sen vuoksi hemi mitä todennäköisemmin säätelee geenin ilmenemistä translaationaalisella tasolla. Lbc3:n edeltävän 5'-alueen yhtymistä neomysiinifosfotransferaasi (neo) geenin koodaavaan alueeseen ohjaa hemi täysin samalla tavalla kuin CAT-geeniä, joka yhtyi Lbc3-geenin edeltävään 5'-alueeseen. Hemin vaikutusta ei näin ollen välitä hemi, joka vuorovaikuttaa koodaavan sekvenssin kanssa, vaan pikemminkin hemi, joka vuorovaikuttaa edeltävien 5'- ja 3'-Lbc3-sekvenssien kanssa, jotka ovat läsnä CATmRNA:ssa. Geenin ilmenemistä, joka geeni sisältää vain edeltävän 5'-alueen ja neo-geenin, ohjaa hemi samalla tavalla Solunsisäisen hemin vaikutus geenin ilmenemiseen voidaan näin ollen saada välillisesti aikaan vuorovaikutuksella esisekvenssin kanssa.

Lyhyet esisekvenssit eivät sisällä translaation lähtökodoneja. Solunsisäisen hemin toteuttama tai välittämä säätelymekanismi ei sen vuoksi liity läheisesti säätelymekanismeihin, jotka koskevat vääriä lähtökodoneja, vrt. julkaisua Hunt, T., Nature, vol. 316, 580-581 (1985). Säätelymekanismia, jota kuvaillaan esillä olevan keksinnön yhteydessä, toteuttaa tai välittää hemi, joka vuorovaikuttaa esisekvenssin kanssa, ja se on sen vuoksi uusi säätelymekanismi.

Plasmidien läsnäolo solussa, joka on läsnä luonnollisessa ympäristössä, antaa solun käyttöön ominaisuuden, joka on solulle edullinen vain tietyissä olosuhteissa. Plasmidin koodaamia ominaisuuksia voi esimerkiksi olla resistenssi antibiootille, jota on läsnä ympäröivässä ympäristössä. Plasmidin läsnäolo ja plasmidin koodaamien geenituotteiden synteesi kuormittavat kuitenkin solun energia-aineenvaihduntaa ja proteiinisynteesiapparaattia, ja solu, joka sisältää plasmidin, syrjäytyy pois ja häviää ympäröivässä, jossa ei tarvita plasmidin koodaamia ominaisuuksia.

Edellä mainittu epästabiilisuus lisääntyy lisäksi käyttämällä plasmideja vektoreina halutun geenituotteen synteisiä varten,

jota kyseinen solu ei tavallisesti tuota. Viimeksi mainittu merkitsee sitä, että solut, jotka syntetisoivat sellaisia tuotteita, on saatettava selektiopaineeseen, sen varmistamiseksi, että haluttua geenituotetta voidaan silti syntetisoida. Aikaisempi menetelmä tietyn geenituotteen suuren ilmenemisen saavuttamiseksi on se, että ilmenemistä säätelee voimakas promoottori, joka aiheuttaa suuren mRNA-konsentraation luetuksi tulemisen kyseiseksi geenituotteeksi.

Geenituotteen suuri konsentraatio voidaan kuitenkin saavuttaa myös kyseisen mRNA:n tehokkaammalla translaatiolla. Viimeksi mainittu merkitsee sitä, että geenituotteen synteesiä ohjataan sekä transkriptionaalisella että translaationaalisella tasolla, mikä merkitsee sitä, että soluun kohdistuva geneettinen kuormitus, joka solu syntetisoi tiettyä geenituotetta, voidaan jakaa kahden aktiviteetin osalle yhden sijasta kuten tavallisesti.

Mainittuja kahta aktiviteettia voidaan sen vuoksi manipuloida sellaisella tavalla, että sama tulos geenituotteen konsentraation suhteen voidaan saavuttaa, vaikka promoottori ei ole niin voimakas kuin tavallisesti käytetyt promoottorit. Sellainen kahden aktiviteetin jakautuminen merkitsee sitä, että solu ei ole niin geneettisesti kuormitettu kuin silloin, kun geenituotteen synteesiä ohjaa vain yksi voimakas promoottori. Tämän seurauksena voidaan kyseiseen soluun kohdistuvaa selektiopainetta vähentää.

On lisäksi tärkeää saada energia-aineenvaihdunnan ja proteiini-synteesiparaatin käyttö solun kannalta järkevimmäksi siinä vaiheessa, jossa halutun geenituotteen synteesiä tapahtuu. Sellainen rationaalinen energia-aineenvaihdunnan ja proteiini-synteesiparaatin käyttäminen saatetaan edullisesti paremmaksi optimoimalla geenituotteen synteesin myöhempiä vaiheita mieluummin kuin optimoimalla varhaisia vaiheita.

Tärkeä geenin ilmenemissysteemin piirre on sen vuoksi se, että halutun tuotteen ilmenemistä voidaan lisätä, alkujaan alhaisesta

ilmenemisestä ylituotantoon, manipuloimalla solun ulkoista elinympäristöä, kuten esillä olevassa keksinnössä tuodaan julki. Edelleen, posttranskriptionaalisten synteesisivaiheiden indusoiva optimointi - mikä on tuotu julki esillä olevassa keksinnössä - on edullisempaa kuin transkription indusoitu optimointi.

Aikaisemmissa menetelmissä geenien ilmentämiseksi hiivassa käytetään joukkoa promoottoreja ja ekspressiovektoreita, vrt. esimerkiksi EP 120 551 A2, jossa tuodaan julki GAPDH- tai PyK-hiivapromoottorien käyttö kuin myös ekspressiovektorien käyttäminen, jotka sisältävät näitä promoottoreita.

GB-patentti 2 137 208 A julkaisee edelleen promoottorin GAL1 käyttämisen useissa ekspressiovektoreissa.

Käytettäessä näitä aikaisemmin tunnettuja promoottoreja, voidaan ilmenemistä lisätä vain lisäämällä transkriptio-käyntiinpanon frekvenssiä. Näiden promoottorien käyttäminen aiheuttaa niin muodoin suuren geneettisen kuorman solulle, energia-aineenvaihdunnan ja synteesiaparaatin irrationaalisen käytön kuin myös syntyvän epästabiilisuuden, tehden välttämättömäksi suuren selektiopaineen kohdistumisen isäntäorganismiin käytettäessä näitä promoottoreita.

Esillä olevan keksinnön tarkoituksena on sen vuoksi tuoda esille menetelmä promoottorien käyttämiseksi, jotka ovat aktiivisia hiivassa, kuin myös esisekvenssejä, jotka saattavat niitä seuraavan geenin ilmenemisen uudella tavalla säätelyn alaiseksi posttranskriptionaalisella tasolla. Keksinnön tarkoituksena on lisäksi antaa käyttöön promoottori- ja esisekvenssin yhdistelmiä, missä yhteydessä nämä yhdistelmät on saatu kasvin leghemoglobiinigeenien edeltävistä 5'-alueista, ja ovat osoittautuneet toiminnallisiksi hiivassa, kuin myös keksinnön tarkoituksena on antaa käyttöön plasmideja, jotka sisältävät edellä olevan promoottori- ja esisekvenssien yhdistelmän.

Esillä olevan keksinnön mukaista menetelmää geenien ilmentämiseksi hiivassa viemällä hiivasoluun yhdistelmä-DNA-sekvenssi, joka sisältää sekä ilmennettävän geenin että edeltävän 5'-alueen, joka käsittää promoottorisekvenssin, ja kasvattamalla transformoituja hiivasoluja kasvualustassa, kuvataan käyttämällä yhdistelmä-DNA-sekvenssinä sekvenssiä, jonka edeltävä 5'-alue käsittää ensimmäisen DNA-sekvenssin, joka sisältää promoottorisekvenssin yhdistyneenä toiseen DNA-sekvenssiin, joka sisältää esisekvenssin, jota säätelevät posttranskriptionaalisella tasolla hemi, hemianalogit ja hemiprekursorit. Tällä tavalla on mahdollista liittämällä geeni myötävirtaan yhdistelmästä ja sopivassa vektorissa, joka kykenee replikoitumaan hiivassa, saada aikaan biologisesti aktiivisen tuotteen synteesi. Tämä menetelmä tekee mahdolliseksi lisätä halutun geenin ilmenemistä uudella säätelymekanismilla, joka toimii posttranskriptionaalisella tasolla. Erityisenä seurauksena saadaan isäntäsolun geneettisesti pelkistynyt kanta, ja isäntäsolun proteiinisynteesiaparatiin ja energia-aineenvaihdunnan optimaalinen käyttö ja niin muotoin ekspressiovektorin lisääntynyt stabiilisuus isäntäsolussa.

Menetelmän erityinen suoritusmuoto keksinnön mukaisesti käyttää ensimmäisenä DNA-sekvenssinä eristettyä tai syntetisoitua promoottorisekvenssiä liitettäväksi toiseen eristettyyn tai syntetisoituun esisekvenssiin. Tällä tavalla on mahdollista yhdistää mikä tahansa hiivan, kasvien tai eläinten esisekvenssi, joka luonnollisissa olosuhteissa on alttiina posttranskriptionaaliselle säätelyyn patenttivaatimuksen 1 mukaisesti, minkä tahansa sopivan hiivan promoottorin, kasvipromoottorin tai muun promoottorin kanssa, joka on toiminnallinen hiivassa.

Keksinnön mukaisen menetelmän erityisen suoritusmuodon mukaisesti lisääntyy hemin solunsisäinen konsentraatio lisäämällä kasvualustaan sellaisia hiilenlähteitä, erityisesti ei-fermentoituvia hiilenlähteitä, jotka saavat aikaan kohonneita hemin solunsisäisiä konsentraatioita. Tällä tavalla saadaan aikaan halutun geenin ilmenemisen induktio lisäämällä hiilenlähde kasvualustaan. Esimerkkejä sellaisista hiilenlähteistä ovat

glyseroli ja sukkiinaatti, jotka ovat erityisen edullisia, koska ne ovat huokeita ja helposti saatavissa olevia hiilenlähteitä. Lisäksi etanolia voidaan käyttää. Tietyissä olosuhteissa voi hiiva itse tuottaa tämän etanolin kasvaessaan. Kasvun päättymisen jälkeen etanoli käytetään, minkä seurauksena translaatio lisääntyy.

Erityisen suoritusmuodon mukaisesti voidaan saavuttaa sama vaikutus hemin solunsisäisen konsentraation lisääntymisen avulla lisäämällä kasvualustaan yhtä tai useampaa ainetta, jotka on valikoitu ryhmästä, johon kuuluvat hemi, hemianalogit ja hemiprekursorit. Esimerkkinä hemianalogista on deuteroporfyriini IX, ja esimerkkinä hemiprekursorista on δ -aminolevuliinihappo.

Keksinnön mukaisen menetelmän erityinen suoritusmuoto käyttää DNA-sekvenssiä, joka sisältää promoottorisekvenssin ja esisekvenssin, joka mainittu DNA-sekvenssi on identtinen kasvin leghemoglobiinigeenien, hiivageenien tai muiden geenien edeltävien 5'-alueiden kanssa, on niistä peräisin tai sisältää niitä, jotka geenit ovat alttiina ekspressiosäätelylle luonnollisissa olosuhteissa, mainitun ekspressiosäätelyn ollessa solunsisäisen hemin toteuttamaa tai välittämää. Tällä tavalla päästään yksinkertaisesti käsiksi esisekvenssin ja promoottorisekvenssin yhdistelmään, mainitun yhdistelmän ollen osoitettu esillä olevan keksinnön mukaisesti toiminnalliseksi hiivassa. Esimerkkejä sellaisista DNA-sekvensseistä ovat soijapavun leghemoglobiinigeenien neljä edeltävää 5'-aluetta, nimittäin Lba sekvenssillä

```
GAGATACATT ATAATAATCT CTCTAGTGTC TATTTATTAT TTTATCTGGT
GATATATAACC TTCTCGTATA CTGTTATTTT TTCAATCTTG TAGATTTACT
TCTTTTATTT TTATAAAAAA GACTTTATTT TTTTAAAAAA AATAAAGTGA
ATTTTGAAAA CATGCTCTTT GACAATTTTC TGTTTCCTTT TTCATCATTG
GGTTAAATCT CATAGTGCCT CTATTCAATA ATTTGGGCTC AATTTAATTA
GTAGAGTCTA CATAAAATTT ACCTTAATAG TAGAGAATAG AGAGTCTTGG
AAAGTTGGTT TTTCTCGAGG AAGAAAGGAA ATGTTAAAAA CTGTGATATT
TTTTTTTTGG ATTAATAGTT ATGTTTATAT GAAAAC TGAA AATAAATAAA
CTAACCATAT TAAATTTAGA ACAACACTTC AATTATTTTT TTAATTTGAT
TAATTTAAAA ATTATTTGAT TAAATTTTTT AAAAGATCGT TGTTTCTTCT
TCATCATGCT GATTGACACC CTCCACAAGC CAAGAGAAAC ACATAAGCTT
TGGTTTTCTC ACTCTCCAAG CCCTCTATAT AAACAAATAT TGGAGTGAAG
TTGTTGCATA ACTTGCATCG AACAATTAAT AGAAATAACA GAAAATTAAG
AAAGAAATAT G
```

Lbc1 sekvenssillä:

TTCTCTTAAT ACAATGGAGT TTTTGTTGAA CATACATACA TTTAAAAAAA
 AATCTCTAGT GTCTATTTAC CCGGTGAGAA GCCTTCTCGT GTTTTACACA
 CTTTAATATT ATTATATCCT CAACCCACACA AAAAAGAATA CTGTTATATC
 TTTCCAAACC TGTAGATTTA TTTATTTATT TATTTATTTT TACAAAGGAG
 ACTTCAGAAA AGTAATTACA TAAAGATAGT GAACATCATT TTATTTATTA
 TAATAAACTT TAAAATCAAA CTTTTTTATA TTTTTTGTTA CCCTTTTCAT
 TATTGGGTGA AATCTCATAG TGAAGCCATT AAATAATTTG GGCTCAAGTT
 TTATTAGTAA AGTCTGCATG AAATTTAACT TAACAATAGA GAGAGTTTTC
 GAAAGGGAGC GAATGTTAAA AAGTGTGATA TTATATTTTA TTTCGATTAA
 TAATTATGTT TACATGAAAA CATACAAAAA AATACTTTTA AATTCAGAAT
 AATACTTAAA ATATTTATTT GCTTAATTGA TTAAGTAAA ATTATTTGAT
 TAGGATTTTG AAAAGATCAT TGGCTCTTCG TCATGCCGAT TGACACCCTC
 CACAAGCCAA GAGAACTTA AGTTGTA AAC TTTCTCACTC CAAGCCTTCT
ATATAAACAT GTATTGGATG TGAAGTTATT GCATAACTTG CATTGAACAA
 TAGAAAATAA CAAAAAAAAG TAAAAAAGTA GAAAAGAAAT ATG,

Lbc2 sekvenssillä:

TCGAGTTTTT ACTGAACATA CATTTATTAA AAAAAACTCT CTAGTGTCCA
 TTTATTCGGC GAGAAGCCTT CTCGTGCTTT ACACACTTTA ATATTATTAT
 ATCCCACCC CCACCAAAAA AAAAAAACT GTTATATCTT TCCAGTACAT
 TTATTTCTTA TTTTACAAA GGAACTTCA CGAAAGTAAT TACAAAAAAG
 ATAGTGAACA TCATTTTTTT AGTTAAGATG AATTTTAAAA TCACACTTTT
 TTATATTTTT TTGTTACCCT TTTCAATTATT GGGTCAAATC TCATAGTGAA
 ACTATTAAAT AGTTTGGGCT CAAGTTTTAT TAGTAAAGTC TGCATGAAAT
 TTAAGTTAAT AATAGAGAGA GTTTTGGAAA GGTAACGAAT GTTAGAAAGT
 GTGATATTAT TATAGTTTTA TTTAGATTAA TAATTATGTT TACATGAAAA
 TTGACAATTT ATTTTTAAAA TTCAGAGTAA TACTTAAATT ACTTATTTAC
 TTTAAGATTT TGAAAAGATC ATTTGGCTCT TCATCATGCC GATTGACACC
 CTCCACAAGC CAAGAGAAAC TTAAGTTGTA ATTTTTCTAA CTCCAAGCCT
TCTATATAAA CACGTATTGG ATGTGAAGTT GTTGCAATAC TTGCATTGAA
 CAATAGAAAT AACAAACAAG AAAATAAGTG AAAAAAGAAA TATG,

Lbc3 sekvenssillä:

```
TATGAAGATT AAAAAA'ACA CTCATATATA TGCCATAAGA ACCAACAAAA
GACTATTTA AGAAAAGAAA AAAAAACCT GCTACATAAT TTCCAATCTT
GTAGATTTAT TTCTTTTATT TTTATAAAGG AGAGTTAAAA AAATTACAAA
ATAAAAATAG TGAACATCGT CTAAGCATTT TTATATAAGA TGAATTTTAA
AAATATAATT TTTTGTCTA AATCGTATGT ATCTTGTCTT AGAGCCATTT
TTGTTTAAAT TGGATAAGAT CACACTATAA AGTTCTTCCT CCGAGTTTGA
TATAAAAAAA ATTGTTTCCC TTTTGATTAT TGGATAAAAT CTCGTAGTGA
CATTATATTA AAAAAATTAG GGCTCAATTT TTATTAGTAT AGTTTGCATA
AATTTTAACT TAAAAATAGA GAAAATCTGG AAAAGGGACT GTTAAAAAGT
GTGATATTAG AAATTTGTCG GATATATTA TATTTTATTT TATATGGAAA
CTAAAAAAT ATATATTA AAAATGAGTT GATTTAAGTT TTTGAAAAGA TGATTGTCTC
TTACTTACTG AAAATGAGTT GATTTAAGTT TTTGAAAAGA TGATTGTCTC
TTCACCATAC CAATTGATCA CCCTCCTCCA ACAAGCCAAG AGAGACATAA
GTTTTATTAG TTATTCTGAT CACTCTTCAA GCCTTCTATA TAAATAAGTA
TTGGATGTGA AGTTGTTGCA TAACTTGCAT TGAACAATTA ATAGAAATAA
CAGAAAAGTA GAAAAGAAAT ATG.
```

Keksinnön mukaisen menetelmän lisäsuoritusmuodossa käytetään DNA-sekvenssiä, joka on identtinen YEP Lb CAT-geenin edeltävien 5'-alueiden kanssa, on niistä peräisin tai sisältää niitä, jolla geenillä on sekvenssi:

```
TATGAAGATT AAAAAATACA CTCATATATA TGCCATAAGA ACCAACAAAA
GACTATTTA AGAAAAGAAA AAAAAACCT GCTACATAAT TTCCAATCTT
GTAGATTTAT TTCTTTTATT TTTATAAAGG AGAGTTAAAA AAATTACAAA
ATAAAAATAG TGAACATCGT CTAAGCATTT TTATATAAGA TGAATTTTAA
AAATATAATT TTTTGTCTA AATCGTATGT ATCTTGTCTT AGAGCCATTT
TTGTTTAAAT TGGATAAGAT CACACTATAA AGTTCTTCCT CCGAGTTTGA
TATAAAAAAA ATTGTTTCCC TTTTGATTAT TGGATAAAAT CTCGTAGTGA
CATTATATTA AAAAAATTAG GGCTCAATTT TTATTAGTAT AGTTTGCATA
AATTTTAACT TAAAAATAGA GAAAATCTGG AAAAGGGACT GTTAAAAAGT
GTGATATTAG AAATTTGTCG GATATATTA TATTTTATTT TATATGGAAA
CTAAAAAAT ATATATTA AAAATGAGTT GATTTAAGTT TTTGAAAAGA TGATTGTCTC
TTACTTACTG AAAATGAGTT GATTTAAGTT TTTGAAAAGA TGATTGTCTC
TTCACCATAC CAATTGATCA CCCTCCTCCA ACAAGCCAAG AGAGACATAA
GTTTTATTAG TTATTCTGAT CACTCTTCAA GCCTTCTATA TAAATAAGTA
TTGGATGTGA AGTTGTTGCA TAACTTGCAT TGAACAATTA ATAGAAATAA
CAGAAAAGTA GAATTCTAAA ATG
```

Keksinnön mukaisen menetelmän lisäsuoritusmuodossa tuodaan vielä esille menetelmä valmistaa polypeptidiä viemällä hiivasolun sisään rekombinanttiplasmidi, joka menetelmä on tunnettu siitä, että käytetään rekombinanttiplasmidina plasmidia, joka sisältää promoottorisekvenssin ja esisekvenssin DNA-sekvenssissä, jossa on kasvin leghemoglobiinigeenin edeltävä 5'-alue.

Keksinnön mukaisen menetelmän toisessa suoritusmuodossa tuodaan esille menetelmä, jossa käytetään rekombinanttiplasmidina plasmidia, joka sisältää promoottorisekvenssin ja esisekvenssin DNA-sekvenssissä, jossa on kasvin leghemoglobiinigeenin edeltävä 5'-alue sekä edeltävä 3'-alue.

Esillä oleva keksintö käsittelee lisäksi DNA-sekvenssiä, jota on tarkoitus käyttää toisena DNA-sekvenssinä toteutettaessa keksinnön mukaista menetelmää, mainitun sekvenssin ollessa tunnettu siitä, että se on lyhyt DNA-sekvenssi, joka kopioidaan lähetti-RNA-juosteeksi, joka on kohteena säätelylle, jota solunsisäinen hemi toteuttaa tai välittää. Esimerkkejä sellaisista DNA-sekvensseistä ovat DNA-sekvenssit, jotka ovat identtisiä kasvin leghemoglobiinigeenien, hiivan geenien tai muiden geenien esisekvenssin kanssa, on siitä peräisin tai sisältävät sen, joissa geneissä mainittu esisekvenssi luonnollisissa olosuhteissa on kohteena säätelylle, jota solunsisäinen hemi toteuttaa tai välittää. Esimerkkejä niistä ovat keksinnön mukaisesti DNA-sekvenssit, jotka ovat identtisiä soijapavun leghemoglobiinigeenien esisekvenssin kanssa, ovat siitä peräisin tai jotka sisältävät sen, nimittäin

Lba sekvenssillä:

AACTTGCATC GAACAATTAA TAGAAATAAC AGAAAATTAA AAAAGAAATA
TG;

Lbcl sekvenssillä:

AACTTGCATT GAACAATAGA AAATAACAAA AAAAAGTAAA AAAGTAGAAA
AGAAATATG;

Lbc2 sekvenssillä:

AACTTGCATT GAACAATAGA AATAACAACA AAGAAAATAA GTGAAAAAAG
AAATATG;

ja Lbc3 sekvenssillä:

AACTTGCATT GAACAATTAA TAGAAATAAC AGAAAAGTAG AAAAGAAATA
TG.

Toinen esimerkki sellaisesta DNA-sekvenssistä on sekvenssi, joka on identtinen YEP Lb CAT-geenin esisekvenssin kanssa, on siitä peräisin tai sisältää sen, jolla geenillä on sekvenssi

AACTTGCATT GAACAATTAA TAGAAATAAC AGAAAAGTAG AATTCTAAAA
TG.

Esillä oleva keksintö käsittelee edelleen DNA-sekvenssejä, jotka sisältävät ensimmäisen DNA-sekvenssin ja toisen DNA-sekvenssin yhdistelmän, ja joita on tarkoitus käyttää toteutettaessa menetelmää keksinnön mukaisesti.

Nämä DNA-sekvenssit ovat tunnettuja siitä, että ne sisältävät promoottorisekvenssin ja esisekvenssin, ja ovat identtisiä kasvin leghemoglioniinigeenien edeltävien 5'-alueiden kanssa, ovat niistä peräisin tai sisältävät niitä.

Esimerkkejä sellaisista DNA-sekvensseistä ovat keksinnön mukaisesti DNA-sekvenssit, jotka sisältävät promoottorisekvenssin ja esisekvenssin, ja jotka ovat identtisiä soijapavun leghemoglobiiniinigeenien edeltävien 5'-alueiden kanssa, ovat niistä peräisin tai sisältävät niitä, nimittäin

Lba sekvenssillä:

GAGATACATT	ATAATAATCT	CTCTAGTGTC	TATTTATTAT	TTTATCTGGT
GATATATACC	TTCTCGTATA	CTGTTATTTT	TTCAATCTTG	TAGATTTACT
TCTTTTATTT	TTATAAAAAA	GACTTTATTT	TTTTAAAAAA	AATAAAGTGA
ATTTTGAAAA	CATGCTCTTT	GACAATTTTC	TGTTTCCTTT	TTCATCATTG
GGTTAAATCT	CATAGTGCCT	CTATTCAATA	ATTTGGGCTC	AATTTAATTA
GTAGAGTCTA	CATAAAATTT	ACCTTAATAG	TAGAGAATAG	AGAGTCTTGG
AAAGTTGGTT	TTTCTCGAGG	AAGAAAGGAA	ATGTTAAAAA	CTGTGATATT
TTTTTTTTGG	ATTAATAGTT	ATGTTTATAT	GAAAAC TGAA	AATAAATAAA
CTAACCATAT	TAAATTTAGA	ACAACACTTC	AATTATTTTT	TTAATTTGAT
TAATTA AAAA	ATTATTTGAT	TAAATTTTTT	AAAAGATCGT	TGTTTCTTCT
TCATCATGCT	GATTGACACC	CTCCACAAGC	CAAGAGAAAC	ACATAAGCTT
TGGTTTTTCTC	ACTCTCCAAG	CCCTCTATAT	<u>AAAC</u> AAATAT	TGGAGTGAAG
TTGTTGCATA	ACTTGCATCG	AACAATTAAT	AGAAATAACA	GAAAATTA AA
AAAGAAATAT	G,			

Lbcl sekvenssillä:

TTCTCTTAAT ACAATGGAGT TTTTGTGAA CATACATACA TTTAAAAAA
 AATCTCTAGT GTCTATTTAC CCGGTGAGAA GCCTTCTCGT GTTTACACA
 CTTTAATATT ATTATATCCT CAACCCACA AAAAGAATA CTGTTATATC
 TTTCCAAACC TGTAGATTTA TTTATTTATT TATTTATTTT TACAAAGGAG
 ACTTCAGAAA AGTAATTACA TAAAGATAGT GAACATCATT TTATTTATTA
 TAATAAACTT TAAAATCAA CTTTTTTATA TTTTTTGTTA CCCTTTTCAT
 TATTGGGTGA AATCTCATAG TGAAGCCATT AAATAATTG GGCTCAAGTT
 TTATTAGTAA AGTCTGCATG AAATTTAACT TAACAATAGA GAGAGTTTTC
 GAAAGGGAGC GAATGTTAAA AAGTGTGATA TTATATTTTA TTTCGATTAA
 TAATTATGTT TACATGAAAA CATACAAAAA AATACTTTTA AATTCAGAAT
 AATACTTAAA ATATTTATTT GCTTAATTGA TTAAGTAAA ATTATTTGAT
 TAGGATTTTG AAAAGATCAT TGGCTCTTCG TCATGCCGAT TGACACCCTC
 CACAAGCCAA GAGAACTTA AGTTGTAAAC TTTCTCACTC CAAGCCTTCT
ATATAACAT GTATTGGATG TGAAGTTATT GCATAACTTG CATTGAACAA
 TAGAAAATA CAAAAAAG TAAAAAGTA GAAAAGAAAT ATG,

Lbc2 sekvenssillä:

TCGAGTTTT ACTGAACATA CATTATTAA AAAAACTCT CTAGTGCCA
 TTTATTCGGC GAGAAGCCTT CTCGTGCTTT ACACACTTTA ATATTATTAT
 ATCCCCACCC CCACCAAAA AAAAAAACT GTTATATCTT TCCAGTACAT
 TTATTTCTTA TTTTACAAA GGAACTTCA CGAAAGTAAT TACAAAAAAG
 ATAGTGAACA TCATTTTTTT AGTTAAGATG AATTTTAAA TCACACTTTT
 TTATATTTT TTGTTACCCT TTTTATTATT GGGTGAAATC TCATAGTGAA
 ACTATTAAAT AGTTTGGGCT CAAGTTTAT TAGTAAAGTC TGCATGAAAT
 TTAAGTTAAT AATAGAGAGA GTTTTGAAA GGTAACGAAT GTTAGAAAGT
 GTGATATTAT TATAGTTTTA TTTAGATTAA TAATTATGTT TACATGAAAA
 TTGACAATTT ATTTTTAAA TTCAGAGTAA TACTTAAATT ACTTATTTAC
 TTTAAGATTT TGAAAAGATC ATTTGGCTCT TCATCATGCC GATTGACACC
 CTCCACAAGC CAAGAGAAAC TTAAGTTGTA ATTTTCTAA CTCCAAGCCT
TCTATATAA CACGTATTGG ATGTGAAGTT GTTGATAAC TTGCATTGAA
 CAATAGAAAT AACAAACAAG AAAATAAGTG AAAAAAGAAA TATG,

Lbc3 sekvenssillä:

```
TATGAAGATT AAAAAATACA CTCATATATA TGCCATAAGA ACCAACAAAA
GTACTATTTA AGAAAAGAAA AAAAAAACCT GCTACATAAT TTCCAATCTT
GTAGATTTAT TTCTTTTATT TTTATAAAGG AGAGTTAAAA AAATTACAAA
ATAAAAATAG TGAACATCGT CTAAGCATTT TTATATAAGA TGAATTTTAA
AAATATAATT TTTTTGTCTA AATCGTATGT ATCTTGCTCT AGAGCCATTT
TTGTTTAAAT TGGATAAGAT CACACTATAA AGTTCCTCCT CCGAGTTTGA
TATAAAAAAA ATTGTTTCCC TTTTGATTAT TGGATAAAAT CTCGTAGTGA
CATTATATTA AAAAAATTAG GGCTCAATTT TTATTAGTAT AGTTTGCATA
AATTTTAACT TAAAAATAGA GAAAATCTGG AAAAGGGACT GTTAAAAAGT
GTGATATTAG AAATTTGTCTG GATATATTAA TATTTTATTT TATATGGAAA
CTAAAAAAAT ATATATTTAA ATTTTAAATT CAGAATAATA CTTAAATTAT
TTATTTACTG AAAATGAGTT GATTTAAGTT TTTGAAAAGA TGATTGTCTC
TTCACCATAC CAATTGATCA CCCTCCTCCA ACAAGCCAAG AGAGACATAA
GTTTTATTAG TTATTCTGAT CACTCTTCAA GCCTTCTATA TAAATAAGTA
TTGGATGTGA AGTTGTTGCA TAACCTGCAT TGAACAATTA ATAGAAATAA
CAGAAAAGTA GAAAAGAAAT ATG.
```

Toinen esimerkki sellaisesta DNA-sekvenssistä on sekvenssi, joka on identtinen YEP Lb CAT-geenin esisekvenssin kanssa, on siitä peräisin tai sisältää sen, jolla geenillä on sekvenssi:

```
TATGAAGATT AAAAAATACA CTCATATATA TGCCATAAGA ACCAACAAAA
GTACTATTTA AGAAAAGAAA AAAAAAACCT GCTACATAAT TTCCAATCTT
GTAGATTTAT TTCTTTTATT TTTATAAAGG AGAGTTAAAA AAATTACAAA
ATAAAAATAG TGAACATCGT CTAAGCATTT TTATATAAGA TGAATTTTAA
AAATATAATT TTTTTGTCTA AATCGTATGT ATCTTGCTCT AGAGCCATTT
TTGTTTAAAT TGGATAAGAT CACACTATAA AGTTCCTCCT CCGAGTTTGA
TATAAAAAAA ATTGTTTCCC TTTTGATTAT TGGATAAAAT CTCGTAGTGA
CATTATATTA AAAAAATTAG GGCTCAATTT TTATTAGTAT AGTTTGCATA
AATTTTAACT TAAAAATAGA GAAAATCTGG AAAAGGGACT GTTAAAAAGT
GTGATATTAG AAATTTGTCTG GATATATTAA TATTTTATTT TATATGGAAA
CTAAAAAAAT ATATATTTAA ATTTTAAATT CAGAATAATA CTTAAATTAT
TTATTTACTG AAAATGAGTT GATTTAAGTT TTTGAAAAGA TGATTGTCTC
TTCACCATAC CAATTGATCA CCCTCCTCCA ACAAGCCAAG AGAGACATAA
GTTTTATTAG TTATTCTGAT CACTCTTCAA GCCTTCTATA TAAATAAGTA
TTGGATGTGA AGTTGTTGCA TAACCTGCAT TGAACAATTA ATAGAAATAA
CAGAAAAGTA GAATTCTAAA ATG
```

Keksintö koskee lisäksi mitä tahansa plasmidia, jota on tarkoitus käyttää keksinnön mukaisen menetelmän suorituksessa, ja jolle on ominaista se, että se sisältää ensimmäisen DNA-sekvenssin kuten aikaisemmin määriteltiin, tai toisen DNA-sekvenssin ja toisen DNA-sekvenssin yhdistelmän, myös kuten aikaisemmin määriteltiin. Sopivia keksinnön mukaisia plasmideja ovat YEP Lb CAT ja YEP 5 Lb Km. Keksinnön mukaiset plasmidit mahdollistavat halutun geenituotteen suuren ilmenemisen liittämällä koodaavia sekvenssejä näitä geenituotteita varten.

Esimerkki 1

Soijapavun leghemoglobiinigeenien edeltävien 5'-alueiden sekvenssimäärittely

Soijapapu (glysiini maks. var. evans)-geenikokoelmasta annetaan käyttöön neljä soijapavun leghemoglobiinigeeniä Lba, Lbc1, Lbc2 ja Lbc3, kuten kuvailivat Jensen, E. Ø. et al., Nature Vol. 291, no 3817, 677-679 (1981). Neljän soijapavun leghemoglobiinigeenin edeltävät 5'-alueet eristetään, kuten kuvaili Jensen, E. Ø., Ph D-väitöskirja, Institut for Molekyler Biologi, Århus Universitet (1985), ja neljän edeltävän 5'-alueen sekvenssit määritetään käyttämällä dideoksiketjuterminatiomenetelmää kuten kuvaili Sanger, F., J.Mol. Bio. 143, 161 (1980) ja ilmaistaan sekvenssikaaviossa.

Esimerkki 2

YEP Lb CAT:n konstruointi

Konstruointi on suoritettu prosessijaksojen järjestyksessä kuten jäljempänä on kuvailtu:

Lbc3-geenin alakloonaus

Lbc3-geeni eristettiin soijapapu-DNA-kokoelman 12 kb:n EcoRI-restriktiokappaleena, jota ovat kuvailleet Wiborg et al., Nucl. Acids. Res. 10, 3487. Osa kappaleesta on esitettyinä kaavion 2 yläosassa. Tämä kappale liuotettiin entsyymien avulla ilmaisten myöhempi liittämisen pBR322:een kuten on esitetty kaaviossa. Muodostuneet plasmidit Lbc3HH ja Lbc3HX liuotettiin myöhemmin PvuII:lla ja liitettiin uudelleen, josta oli tuloksena kaksi plasmidia nimettynä pLpHH ja pLpHX.

Lbc3-geenin edeltävien 5'-sekvenssien alakloonaus

Tätä tarkoitusta varten käytettiin plasmidia pLpHH, kuten esitetään kaaviossa 3. Plasmidi avattiin PvuII:n avulla, ja sitä käsiteltiin eksonukleaasilla Bal31. Reaktio pysäytettiin eri aikoina, ja lyhennetyt plasmidit liitettiin pBR322:n sekvenssiin. Näitä sekvenssejä on käsitelty etukäteen kuten on esitetty kaaviossa 3, siten, että niiden toisessa päässä oli DNA-sekvenssi

```

TTC ---
AAG ---

```

Liittämisen jälkeen tapahtui liuottamisen EcoRI:llä, ja sekvenssit, jotka sisälsivät edeltäviä 5'-sekvenssejä, liitettiin EcoRI:llä liuotettuun pBR322:een. Nämä plasmidit transformoitiin E. coliin K803, ja plasmidit transformanteissa testattiin sekvenssianalyysin avulla. Yksi plasmidi, p213 5'Lb, eristettyinä yhdestä transformantista, sisälsi edeltävän 5'-sekvenssin, joka päättyi 7 emäsparia ennen Lb ATG-lähtökodonia sillä tavalla, että sekvenssi on seuraava:

2kb

-5' edeltävä --- AAAGTAGAATTCTAAAATG
Lbc3-sekvenssi.

Lbc3-geenin edeltävän 3'-alueen alakloonaus

Tätä tarkoitusta varten käytettiin plasmidia pLpHX, joka liuotettiin XhoII:lla. Päät täytettiin osittain, ja ylimäärä DNA:sta poistettiin, kuten esitetään kaaviossa 4. Osoitettu sekvenssi liitettiin plasmidiin pBR322, jota oli esikäsitelty, kuten kaaviossa on esitetty. Konstruktio transformoitiin E. coliin K803. Yksi transformanteista sisälsi plasmidin, jota nimitettiin Xho2a-3'Lb:ksi. Koska XhoII tunnistussekvenssi on sijoittunut välittömästi Lp-pysäytyskodonin jälkeen, vrt. kaavio 2, plasmidi sisälsi noin 900 emäsparia edeltävästä 3'-alueesta, ja sekvenssi alkoi GAATTCTACAA---.

Lb-promoottorikasetin konstruointi

EcoRI/SphI-sekvenssi Xho2a-3'Lb:stä sekoitettiin BamHI/EcoRI-sekvenssin kanssa p 213-5'Lb:stä. Nämä kaksi sekvenssiä liitettiin BamHI/SphI-katkaisupisteiden kautta pBR322-johdannaiseen,

josta EcoRI-tunnistussekvenssi oli poistettu, vrt. kaavio 4. Ligatoidut plasmidit transformoitiin E.coliin K803. Yksi plasmidi yhdessä transformantissa sisälsi oikeita sekvenssejä, ja sitä nimitettiin plasmidiksi pEJLb 5'-3'-1.

Kimeerisen Lb/CAT-geenin konstruointi

pBR322:n CAT-geeni eristettiin useana pienempänä restriktiosekvenssinä kuten esitetään kaaviossa 5. Koodaava 5'-alue eristettiin AluI-sekvenssinä, joka myöhemmin liitettiin plasmidiin pBR322, ja käsiteltiin kuten kaaviossa on ilmaistu. Tämä transformoitiin E. coliin K803, ja valikoitu transformantti sisälsi plasmidin, jota nimitettiin AluII:ksi. Koodaava 3'-alue eristettiin TaqI-sekvenssinä. Tätä sekvenssiä käsiteltiin eksonukleaasilla Bal31, minkä jälkeen lisättiin EcoRI-linkkereitä. Sitten seurasi liuotus EcoRI:llä ja liittäminen EcoRI:llä liuotettuun plasmidiin pBR322. Jälkimmäinen transformoitiin E. coliin K803, ja transformantit analysoitiin. Yksi plasmidi, Taq12, sisälsi CAT-geenin koodaavan 3'-alueen plus23 emäsparin edeltäviä 3'-sekvenssejä päättyen siten myöhemmin seuraavaan sekvenssiin ——— CCCCGAATTC. Myöhemmin seuraavat sekvenssit liitettiin yhdessä EcoRI:llä liuotettuun plasmidiin pEJLb5'-3'-1: EcoRI/PvuII-sekvenssi AluII:sta, PvuII/DdeI-sekvenssi pBR322:sta ja DdeI/EcoRI-sekvenssi Taq 12:sta. Jälkimmäinen transformoitiin E coliin K803. Valikoitu transformantti sisälsi oikean plasmidin, jota nimitettiin pEJLb5'-3'-CAT:ksi.

Kimeerisen Lb/CAT-geenin kloonaus hiivan plasmidissa

Tämä kimeerinen geeni eristettiin plasmidin pEJLb5'-3'-CAT 15 sekvenssistä BamHI/SphI ja liitettiin hiivan plasmidiin YEP24, joka oli katkaistu samoilla entsyymeillä. Transformoinnin E coliin K803 jälkeen tutkittiin valikoitua transformanttia. Se sisälsi plasmidin YEP LbCAT, joka esitetään kaaviossa 6. Tämä plasmidi transformoitiin edelleen hiivakantoihin *Saccharomyces cerevisiae* DBY747 ja TML.

Esimerkki 3YEP 5Lb Km:n konstruointi

Neomysiinifosfotransferaasi (NPTII)-geeni eristettiin pKM2:sta (Beck. et al., Gene 19, 327). Tämän geenin koodaava 5'-alue eristettiin Sau3A-sekvenssinä, kuten on esitetty kaaviossa 7, ja liitettiin myöhemmin pBR322:een, mistä oli tuloksena plasmidi, nimettynä SAU 13. Koodaava ja edeltävä 3'-alue geenistä NPTII eristettiin PvuII-sekvenssinä. Jälkimmäinen liitettiin yhdessä plasmidin EcoRI/PvuII-sekvenssin kanssa EcoRI/PvuII:lla liuotettuun plasmidiin pEJLb 5'-3'-1. Transformaation yhteydessä E. coliin K803, valikoitiin transformantti, jossa oli oikea plasmidi, pEJLb 5'Km 1. Tämä plasmidi liuotettiin myöhemmin BamHI:n avulla ja osittain PvuII:n avulla sellaisella tavalla, että koko edeltävä 5'-Lb-sekvenssi + koodaava NPTII-sekvenssi olivat läsnä BamHI/PvuII-sekvenssissä. Tämä sekvenssi liitettiin BamHI/PvuII:lla liuotettuun YEP24:ään, mistä oli tuloksena plasmidi YEP 5Lb Km, esitettynä kaaviossa 8. Tämä plasmidi transformoitiin hiivakantaan *Saccharomyces cerevisiae* Tml.

Esimerkki 4Hiilenlähteen vaikutus CAT:n ilmenemiseen

Saccharomyces cerevisiae DBY747, joka sisälsi plasmidin YEP Lb CAT, kasvatetaan minimialustassa + 2 % hiilenlähdettä. Solut kerätään talteen solutiheydessä 5×10^6 solua per ml. CAT-aktiivisuus mitataan kuten kuvailevat Walker, Edlund, Boulet & Rutter, Nature, 306, 557 (1983).

Taulukossa 1 CAT-aktiivisuus on ilmaistu hiilenlähteen funktiona. Korkein aktiivisuus, joka saatiin kasvattamalla sukkinatilla ja glyserolilla, on keinotekoisesti asetettu 100 %:ksi.

Taulukko 1

<u>Hiilenlähde</u>	<u>Aktiivisuus</u>
Sukkinatilla	100
Glyseroli	100
Glukoosi	28
Sakkarosi	18

Esimerkki 5

Hemiprekursoreiden ja hemianalogien vaikutus geenin ilmenemisen indusoitumiseen

Saccharomyces cerevisiaeta Tm1, joka sisältää plasmidin YEP Lb CAT, kasvatetaan minimaalialustassa + 2 % glukoosia + 0,1 % Tween^R:iä + 20 µg/ml ergosterolia + 50 µg/ml metioniinia, mukana myös yksi seuraavista hemianalogeista tai hemiprekursoreista. Deuteroporfyriini IX (dp):ää ja protoporfyriiniä (pp), vastaavasti lisätään loppukonsentraatioksi 5 µg/ml. Hemiiniä lisätään loppukonsentraatioon 5 µg/ml. δ-aminolevuliinihappoa, δ-ALA, lisätään loppukonsentraatioon 50 µg/ml.

Taulukossa 2 on CAT-aktiivisuus osoitettu hemiprekursorin ja hemianalogin aktiivisuutena, vastaavasti. Korkein saatu aktiivisuus lisäämällä δ-ALA:aa tai dp:tä on asetettu keinotekoisesti 100 %:ksi.

Taulukko 2

<u>Induktori</u>	<u>CAT-aktiivisuus</u>
Glukoosi + δ-ALA	100
Glukoosi + dp	100
Glukoosi + pp	50
Glukoosi + hemiini	25
Glukoosi	5

Esimerkki 6Linkkerien liittäminen esisekvenssiin

Kaksi synteettistä DNA-linkkeriä on liitetty; yksi välittömästi lähtökodonin yläpuolelle, joka sisältää entsyymin BglII tunnustusekvenssin, ja yksi vastavirtaan CAP-liitospaikasta, joka sisältää tunnustusekvenssin KpnI:lle, vrt. kaavio 9, jossa uutta konstruktiota pEJ5'-3'-CAT101 verrataan alkuperäiseen konstruktiin.

Kahden konstruktion ilmenemisen vertailu osoittaa (testi kuten esimerkissä 5):

	<u>glukoosi</u>	<u>glukoosi + hemi</u>	<u>induktio</u>
CAT15	0,11	6,01	55x
CAT101	0,22	1,72	8x

Numerot ilmoittavat nmoolia reagoineutta kloramfenikolia/mg proteiinia/min.

Tämä osoittaa sen, että kaksi spesifistä muutosta 5'-alueessa aiheuttaa hemi-induktion putoamisen tasolta 55x tasolle 8x.

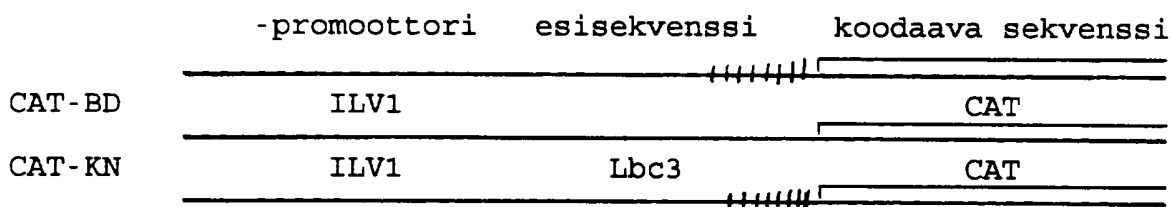
Esimerkki 7

Lbc3:n 5'-alueen korvaaminen vastaavalla alueella *S. cerevisiae*n ILV1-geenistä

Koko Lbc3 5'-alue poistetaan CAT 101:stä katkaisemalla BamHI:llä ja BglII:lla. Tilalle liitetään 765 emäsparin DNA-sekvenssi ILV1-geenistä, joka sisältää promoottori- ja esisekvenssin. Tätä konstruktioita nimitetään PEJ CAT-BD.

Toisessa konstruktiossa poistetaan Lbc3-promoottori esisekvenssin jäädessä jäljelle. Tämä tehdään katkaisemalla CAT101 BamHI:llä ja KpnI:llä. Tämä sekvenssi korvataan 670 emäsparin sekvenssillä ILV1:stä, promoottori ilman esisekvenssiä. Tätä plasmidia nimitetään PEJ CAT-KN.

Konstruktioita kuvataan kaavamaisesti:



Sekvenssien vertailua kuvataan kaaviossa 10.

Ilmenemistesti

	<u>glukoosi</u>	<u>glukoosi + hemi</u>	<u>induktio</u>
CAT-BD	1089	1162	-
CAT-KN	789	1580	2x

Samat yksiköt kuin aikaisemmissa testeissä.

Ainoa ero kahden konstruktion välillä on esisekvenssin alku-perä. Tulos osoittaa, että Lbc3-esisekvenssi on välttämätön induktiolle. Induktiotaso ei kuitenkaan ole niin korkea kuin CAT101:ssä, joka on lähtömateriaali; tämä voi johtua tosiseikasta, että konstruktio alkaa 13 nukleotidia lähempänä ATG:tä, ja siitä puuttuu näin ollen 13 mRNA-nukleotidia, jotka voivat olla tärkeitä induktion kannalta.

Kaikki nämä kokeet osoittavat selvästi, että hemi-induktio liittyy Lbc3-esisekvenssiin.

On selvää, ettei esillä olevan keksinnön patenttisuojia rajoitu tässä ilmaistuihin esimerkkeihin.

Näin ollen ei keksinnön mukaisesti käytetä yksinomaan edeltäviä 5'-alueita soijapavun leghemoglobiinigeeneistä. On hyvin tunnettua, että kaikkien hernekasvien leghemoglobiinigeeneillä on sama aktiivisuus, vrt. Appleby (1974) teoksessa The Biology of Nitrogen Fixation, Quispel. A. Ed. North-Holland Publishing Company, Amsterdam Oxford, sivut 499-554, ja edelleen on osoitettu salkopavun PvLb1-geenin osalta, että selvä homologia-aste on olemassa soijapavun Lbc3:n kanssa. Näin ollen keksintö käsittää leghemoglobiinigeenien 5'-alueiden käyttämisen kaikista kasveista.

Keksinnön mukaisesti on myös mahdollista käyttää sellaisia sekvenssejä kasveista, eläimistä tai hiivasta, jotka luonnollisissa olosuhteissa toteuttavat tai välittävät uutta säätelyaktiiviteettia, jota on kuvailtu esillä olevan keksinnön mukaisesti.

Viimeksi mainittu soveltuu erityisesti sellaisiin sekvensseihin, joita voidaan eristää geenikokoelmien DNA-sekvensseistä hybridisaatiolla soijapavun leghemoglobiinigeenien edeltävien 5'-alueiden merkittyjen sekvenssien kanssa.

On hyvin tunnettua, että on mahdollista muuttaa nukleotidisekvenssejä edeltävien 5'-alueiden ei-välttämättömissä ala-alueissa, ilman, että viimeksi mainittu aiheuttaa muuttuneen promoottoriaktiivisuuden ja säädeltävyyden. On myös hyvin tunnettua, että muuttamalla edeltävien 5'-alueiden tärkeiden ala-alueiden sekvenssejä, on mahdollista muuttaa sidosaaffiniteetteja nukleotidisekvenssien ja tekijöiden tai säätelyaineiden välillä, jotka ovat välttämättömiä transkriptionaaliselle käyntiinpanolle ja translationaaliselle käyntiinpanolle, ja että on niin muodoin mahdollista parantaa promoottoriaktiivisuutta ja/tai säädeltävyyttä. Esillä olevan keksinnön piiriin kuuluu myös tietysti edeltävien 5'-alueiden sellaista muutettujen sekvenssien käyttäminen. Erityisesti voidaan mainita esisekvenssien käyttäminen, joita on laajennettu yli luonnollisen pituuden, edellyttäen että sellaisten sekvenssien käyttäminen tekee halutun geenituotteen ilmenemisestä esillä olevan keksinnön mukaisen uuden säätelyn kohteen.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä geenien ilmentämiseksi hiivassa saattamalla hiivasoluun yhdistelmä-DNA-sekvenssi, joka sisältää sekä ilmentettävän geenin että edeltävän 5'-alueen, joka käsittää promoottorisekvenssin, ja viljelemällä transformoituja hiivasoluja omassa kasvualustassa, **tunnettu** siitä, että käytetään edeltävää 5'-aluetta kasvileghemoglobiinista, joka käsittää ensimmäisen DNA-sekvenssin, joka sisältää promoottorisekvenssin ja toisen DNA-sekvenssin, joka sisältää signaalisekvenssin, jota säätelevät posttranskriptionaalisella tasolla hemi, hemianalogit tai hemiprekursorit, ja että hemin solunsisäinen konsentraatio kasvaa, ja siitä, että kasvualustaan lisätään sellaisia hiililähteitä, jotka saavat aikaan kasvaneen hemin solunsisäisen konsentraation.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ensimmäisenä DNA-sekvenssinä käytetään bakteerista eristettyä DNA-sekvenssiä tai kasvin DNA:sta in vitro syntetisoitua DNA:ta, joka sisältää promoottorisekvenssin yhdistettäväksi toiseen DNA-sekvenssiin.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että toisena DNA-sekvenssinä käytetään bakteerista eristettyä DNA-sekvenssiä tai kasvin DNA:sta in vitro syntetisoitua, joka sisältää signaalisekvenssin yhdistettäväksi ensimmäiseen DNA-sekvenssiin.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että hiilenlähde valitaan ryhmästä glyseroli, sukkiinaatti tai etanoli.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että kohotetaan hemin solunsisäistä konsentraatiota lisäämällä kasvualustaan yksi tai useampia aineita, jotka on valittu ryhmästä, johon kuuluvat hemi, hemianalogit ja hemiprekursorit.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että käytetään hemianalogina yhdistettä deuteroporfyrini IX ja/tai hemiprekursorina yhdistettä δ -aminolevuliinihappo.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että käytetään DNA-sekvenssiä, joka on identtinen soijapavun leghemoglobiinigeenien edeltävien 5'-alueiden kanssa.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että edeltävä 5'-alue on identtinen Lba-geenin edeltävien 5'-alueiden kanssa, jolla geenillä on sekvenssi:

```
GAGATACATT ATAATAATCT CTCTAGTGTC TATTTATTAT TTTATCTGGT
GATATATACC TTCTCGTATA CTGTTATTTT TTCAATCTTG TAGATTTACT
TCTTTTATTT TTATAAAAAA GACTTTATTT TTTTAAAAAA AATAAAGTGA
ATTTTGAAAA CATGCTCFTT GACAATTTTC TGTTTCCTTT TTCATCATTG
GGTTAAATCT CATAGTGCCT CTATTCAATA ATTTGGGCTC AATTTAATTA
GTAGAGTCTA CATAAAATTT ACCTTAATAG TAGAGAATAG AGAGTCTTGG
AAAGTTGGTT TTTCTCGAGG AAGAAAGGAA ATGTTAAAAA CTGTGATATT
TTTTTTTTGG ATTAATAGTT ATGTTTATAT GAAAAC TGAA AATAAATAAA
CTAACCATAT TAAATTTAGA ACAACACTTC AATTATTTTT TTAATTTGAT
TAATTAATAAA ATTATTTGAT TAAATTTTTT AAAAGATCGT TGTTTCTTCT
TCATCATGCT GATTGACACC CTCCACAAGC CAAGAGAAAC ACATAAGCTT
TGGTTTTCTC ACTCTCCAAG CCCTCTATAT AAACAAATAT TGGAGTGAAG
TTGTTGCATA ACTTGCATCG AACAATTAAT AGAAATAACA GAAAATTAATA
AAAGAAATAT G.
```

9. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että edeltävä 5'-alue on identtinen Lbc1-geenin edeltävien 5'-alueiden kanssa, jolla geenillä on sekvenssi:

```
TTCTCTTAAT ACAATGGAGT TTTTGTTGAA CACACATACA TTTAAAAAAA
AATCTCTAGT GTCTATTTAC CCGGTGAGAA GCCTTCTCGT GTTTTACACA
CTTTAATATT ATTATATCCT CAACCCACAA AAAAAGAATA CTGTTATATC
TTTCCAAACC TGTAGATTTA TTTATTTATT TATTTATTTT TACAAAGGAG
ACTTCAGAAA AGTAATTACA TAAAGATAGT GAACATCATT TTATTTATTA
TAATAAACTT TAAAATCAAA CTTTTTTATA TTTTTTGTTA CCCTTTTCAT
TATTGGGTGA AATCTCATAG TGAAGCCATT AAATAATTTG GGCTCAAGTT
TTATTAGTAA AGTCTGCATG AAATTTAACT TAACAATAGA GAGAGTTTTT
GAAAGGGAGC GAATGTAAA AAGTGTGATA TTATATTTTA TTTTCGATTAA
TAATTATGTT TACATGAAAA CATACAAAAA AATACTTTTA AATTCAGAAT
AATACTTAAA ATATTTATTT GCTTAATTGA TTAAGTAAA ATTATTTGAT
TAGGATTTTG AAAAGATCAT TGGCTCTTCG TCATGCCGAT TGACACCCCTC
CACAAGCCAA GAGAACTTA AGTTGTAAAC TTTCTCACTC CAAGCCTTCT
ATATAAACAT GTATTGGATG TGAAGTTATT GCATAACTTG CATTGAACAA
TAGAAAATAA CAAAAAAAAG TAAAAAAGTA GAAAAGAAAT ATG.
```

10. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että edeltävä 5'-alue on identtinen Lbc2-geenin edeltävien 5'-alueiden kanssa, jolla geenillä on sekvenssi:

```
TCGAGTTTTT ACTGAACATA CATTATTTAA AAAAACTCT CTAGTGTCCA
TTTATTTCGGC GAGAAGCCTT CTCGTGCTTT ACACACTTTA ATATTATTAT
ATCCCCACCC CCACCAAAAA AAAAAAACT GTTATATCTT TCCAGTACAT
TTATTTCTTA TTTTTACAAA GGAACTTCA CGAAAGTAAT TACAAAAAAG
ATAGTGAACA TCATTTTTTT AGTTAAGATG AATTTTAAAA TCACACTTTT
TTATATTTTT TTGTTACCCT TTTCATTATT GGGTGAAATC TCATAGTGAA
ACTATTAAAT AGTTTGGGCT CAAGTTTTAT TAGTAAAGTC TGCATGAAAT
TTAACTTAAT AATAGAGAGA GTTTTGGAAA GGTAACGAAT GTTAGAAAGT
GTGATATTAT TATAGTTTTA TTTAGATTAA TAATTATGTT TACATGAAA
TTGACAATTT ATTTTTAAAA TTCAGAGTAA TACTTAAATT ACTTATTTAC
TTTAAGATTT TGAAAAGATC ATTTGGCTCT TCATCATGCC GATTGACACC
TCCACAAGC CAAGAGAAAC TTAAGTTGTA ATTTTCTAA CTCCAAGCCT
TCTATATAAA CACGTATTGG ATGTGAAGTT GTTGCATAAC TTGCATTGAA
CAATAGAAAT AACACAAAG AAAATAAGTG AAAAAAGAAA TATG.
```

11. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että edeltävä 5'-alue on identtinen Lbc3-geenin edeltävien 5'-alueiden kanssa, jolla geenillä on sekvenssi:

```
TATGAAGATT AAAAAATACA CTCATATATA TGCCATAAGA ACCAACAAAA
GACTATTTTA AGAAAAGAAA AAAAAACCT GCTACATAAT TTCCAATCTT
GTAGATTTAT TTCTTTTATT TTTATAAAGG AGAGTTAAAA AAATTACAAA
ATAAAAATAG TGAACATCGT CTAAGCATTT TTATATAAGA TGAATTTTAA
AAATATAATT TTTTGTCTA AATCGTATGT ATCTTGTCTT AGAGCCATTT
TTGTTTAAAT TGGATAAGAT CACACTATAA AGTTCTTCCT CCGAGTTTGA
TATAAAAAAA ATTGTTTCCC TTTTGATTAT TGGATAAAAT CTCGTAGTGA
CATTATATTA AAAAAATTAG GGCTCAATTT TTATTAGTAT AGTTTGCATA
AATTTTAACT TAAAAATAGA GAAATCTGG AAAAGGGACT GTTAAAAAGT
GTGATATTAG AAATTTGTGCG GATATATTAA TATTTTATTT TATATGGAAA
CTAAAAAAT ATATATTAA ATTTTAAATT CAGAATAATA CTAAATTAT
TTATTTACTG AAAATGAGTT GATTTAAGTT TTTGAAAAGA TGATTGTCTC
TTCACCATAC CAATTGATCA CCCTCCTCCA ACAAGCCAAG AGAGACATAA
GTTTTATTAG TTATTCTGAT CACTCTTCAA GCCTTCTATA TAAATAAGTA
TTGGATGTGA AGTTGTTGCA TAACTTGCAT TGAACAATTA ATAGAAATAA
CAGAAAAGTA GAAAAGAAAT ATG.
```

12. DNA-sekvenssi, jota voidaan käyttää yhdistelmä-DNA-segmentissä patenttivaatimusten 1-11 mukaisten menetelmien suorittamisessa, tunnettu siitä, että se käsittää ensimmäisen DNA-sekvenssin, joka sisältää promoottorisekvenssin, ja toisen DNA-sekvenssin, joka sisältää signaalisekvenssin, jota säätelevät posttranskriptionaalisella tasolla hemi, hemi-

analogit tai hemiprekursorit, ja joka on identtinen kasvi-leghemoglobiinin edeltävän 5'-alueen kanssa.

13. DNA-sekvenssi, jota käytetään patenttivaatimuksen 12 mukaisen menetelmän suorittamisessa, **tunnettu** siitä, että se on identtinen soijapavun leghemoglobiinigeenien signaalisekvenssin kanssa.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen DNA-sekvenssi, **tunnettu** siitä, että se on identtinen Lba-geenin edeltävien 5'-alueiden kanssa, jolla geenillä on sekvenssi:

```
GAGATACATT ATAATAATCT CTCTAGTGTC TATTTATTAT TTTATCTGGT
GATATATACC TTCTCGTATA CTGTTATTTT TTCAATCTTG TAGATTTACT
TCTTTTATTT TTATAAAAAA GACTTTATTT TTTTAAAAAA AATAAAGTGA
ATTTTGAAAA CATGCTCTTT GACAATTTTC TGTTTCCTTT TTCATCATTG
GGTTAAATCT CATAGTGCCT CTATTCAATA ATTTGGGCTC AATTTAATTA
GTAGAGTCTA CATAAAATTT ACCTTAATAG TAGAGAATAG AGAGTCTTGG
AAAGTTGGTT TTTCTCGAGG AAGAAAGGAA ATGTTAAAAA CTGTGATATT
TTTTTTTTGG ATTAATAGTT ATGTTTATAT GAAAACGAA AATAAATAAA
CTAACCATAT TAAATTTAGA ACAACACTTC AATTATTTTT TTAATTTGAT
TAATTAATAA ATTATTTGAT TAAATTTTTT AAAAGATCGT TGTTTCTTCT
TCATCATGCT GATTGACACC CTCCACAAGC CAAGAGAAAC ACATAAGCTT
TGGTTTTCTC ACTCTCCAAG CCCTCTATAT AAACAAATAT TGGAGTGAAG
TTGTTGCATA ACTTGCATCG AACAATTAAT AGAAATAACA GAAAATTA
AAAGAAATAT G.
```

15. Patenttivaatimuksen 13 mukainen DNA-sekvenssi, **tunnettu** siitä, että se on identtinen Lbc1-geenin edeltävien 5'-alueiden kanssa, jolla geenillä on sekvenssi:

```
TTCTCTTAAT ACAATGGAGT TTTTGTTGAA CACACATACA TTTAAAAAAA
AATCTCTAGT GTCTATTTAC CCGGTGAGAA GCCTTCTCGT GTTTTACACA
CTTTAATATT ATTATATCCT CAACCCACA AAAAAGAATA CTGTTATATC
TTTCCAACC TGTAGATTTA TTTATTTATT TATTTATTTT TACAAAGGAG
ACTTCAGAAA AGTAATTACA TAAAGATAGT GAACATCATT TTATTTATTA
TAATAAACTT TAAAATCAAA CTTTTTTATA TTTTTTGTTA CCCTTTTCAT
TATTGGGTGA AATCTCATAG TGAAGCCATT AAATAATTG GGCTCAAGTT
TTATTAGTAA AGTCTGCATG AAATTTAACT TAACAATAGA GAGAGTTTTC
GAAAGGGAGC GAATGTTAAA AAGTGTGATA TTATATTTTA TTTCGATTAA
TAATTATGTT TACATGAAAA CATACAAAA AATACTTTTA AATTCAGAAT
AATACTTAAA ATATTTATTT GCTTAATTGA TTAAGTAAA ATTATTTGAT
TAGGATTTTG AAAAGATCAT TGGCTCTTCG TCATGCCGAT TGACACCCCTC
CACAAGCCAA GAGAACTTA AGTTGTA AAC TTTCTCACTC CAAGCCTTCT
ATATAAACAT GTATTGGATG TGAAGTTATT GCATAACTTG CATTGAACAA
TAGAAAATAA CAAAAAAAAG TAAAAAAGTA GAAAAGAAAT ATG.
```

16. Patenttivaatimuksen 13 mukainen DNA-sekvenssi, tunnettu siitä, että se on identtinen Lbc2-geenin edeltävien 5'-aluiden kanssa, jolla geenillä on sekvenssi:

```
TCGAGTTTTT ACTGAACATA CATTATTAA AAAAACTCT CTAGTGCCA
TTTATTCGGC GAGAAGCCTT CTCGTGCTTT ACACACTTTA ATATTATTAT
ATCCCCACCC CCACCAAAAA AAAAAAACT GTTATATCTT TCCAGTACAT
TTATTTCTTA TTTTACAAA GGAACTTCA CGAAAGTAAT TACAAAAAG
ATAGTGAACA TCATTTTTTT AGTTAAGATG AATTTTAAAA TCACACTTTT
TTATATTTTT TTGTTACCCT TTTTATTATT GGGTGAAATC TCATAGTGAA
ACTATTAAAT AGTTTGGGCT CAAGTTTTAT TAGTAAAGTC TGCATGAAAT
TAACTTAAT AATAGAGAGA GTTTTGGAAA GGTAACGAAT GTTAGAAAGT
GTGATATTAT TATAGTTTTA TTTAGATTAA TAATTATGTT TACATGAAAA
TTGACAATTT ATTTTTAAAA TTCAGAGTAA TACTTAAATT ACTTATTTAC
TTTAAGATTT TGAAAAGATC ATTTGGCTCT TCATCATGCC GATTGACACC
CTCCACAAGC CAAGAGAAAC TTAAGTTGTA ATTTTTCTAA CTCCAAGCCT
TCTATATAAA CACGTATTGG ATGTGAAGTT GTTGACATAAC TTGCATTGAA
CAATAGAAAT AACACAAAG AAAATAAGTG AAAAAAGAAA TATG.
```

17. Patenttivaatimuksen 13 mukainen DNA-sekvenssi, tunnettu siitä, että se on identtinen Lbc3-geenin edeltävien 5'-aluiden kanssa, jolla geenillä on sekvenssi:

```
TATGAAGATT AAAAAATACA CTCATATATA TGCCATAAGA ACCAACAAAA
GTACTATTTA AGAAAAGAAA AAAAAACCT GCTACATAAT TTCCAATCTT
GTAGATTTAT TTCTTTTATT TTTATAAAGG AGAGTTAAAA AAATTACAAA
ATAAAAATAG TGAACATCGT CTAAGCATTT TTATATAAGA TGAATTTTAA
AAATATAATT TTTTGTCTA AATCGTATGT ATCTTGCTCT AGAGCCATTT
TTGTTTAAAT TGGATAAGAT CACACTATAA AGTTCTTCCT CCGAGTTTGA
TATAAAAAAA ATTGTTTCCC TTTTGATTAT TGGATAAAAT CTCGTAGTGA
CATTATATTA AAAAAATTAG GGCTCAATTT TTATTAGTAT AGTTTGCATA
AATTTTAACT TAAAAATAGA GAAAATCTGG AAAAGGGACT GTTAAAAAGT
GTGATATTAG AAATTTGTCG GATATATTAA TATTTTATTT TATATGGAAA
CTAAAAAAT ATATATTTAA ATTTTAAATT CAGAATAATA CTTAAATTAT
TTATTTACTG AAAATGAGTT GATTTAAGTT TTTGAAAAGA TGATTGTCTC
TTCACCATAC CAATTGATCA CCCTCCTCCA ACAAGCCAAG AGAGACATAA
GTTTTATTAG TTATTCTGAT CACTCTTCAA GCCTTCTATA TAAATAAGTA
TTGGATGTGA AGTTGTTGCA TAACTTGCAT TGAACAATTA ATAGAAATAA
CAGAAAAGTA GAAAAGAAAT ATG.
```

18. Yhdistelmä-DNA-sekvenssi käytettäväksi patenttivaatimusten 1-12 mukaisissa menetelmissä, tunnettu siitä, että se sisältää sen geenin, jota halutaan ilmentää sekä minkä tahansa patenttivaatimuksen 12-17 mukaisen DNA-sekvenssin.

19. Plasmidi, jota voidaan käyttää patenttivaatimuksen 1 mukaisessa menetelmässä kloramfenikoli-asetyyli-transferaasin (CAT) valmistamiseksi, tunnettu siitä, että se on nimet-

ty YEP Lb CAT:ksi ja ilman CAT-geeniä sisältää promoottorisekvenssin ja signaalisekvenssin DNA-sekvenssissä, joka sisältää edeltävän soijapapuleghemoglobiinigeenin Lbc3 5'-alueen ja jonka rakenne on esitetty kaaviossa 6.

20. Plasmidi, jota voidaan käyttää patenttivaatimuksen 1 mukaisessa menetelmässä neomysiinifosfotransferaasi (NPT) II:n valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että se on nimetty YEP 5 Lb Km:ksi ja ilman NPT II-geeniä sisältää promoottorisekvenssin ja signaalisekvenssin DNA-sekvenssissä, joka sisältää edeltävän soijapapuleghemoglobiinigeenin Lbc3 5'-alueen ja jonka rakenne on esitetty kaaviossa 8.

Patentkrav

1. Förfarande för uttryckning av gener i jäst genom införing i jästcellen av en rekombinat-DNA-sekvens innehållande både genen som skall uttryckas och 5'-flankerande regionen innefattande promotorsekvensen, och odling av de transformerade jästcellerna i ett eget tillväxtmedium, **kännetecknat** av att man använder en 5'-flankerande region från växtleghemoglobin omfattande en första DNA-sekvens innehållande en promotorsekvens och en andra DNA-sekvens innehållande en signalsekvens, som regleras på post-transkriptionsnivå av hem, hemanaloger eller hemprekursorer, och att den intracellulära koncentrationen av hem ökar, och att till tillväxtmediet tillsätts sådana kolkällor, som förorsakar en ökad intracellulär koncentration av hem.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av att såsom en första DNA-sekvens används en från en bakterie isolerad DNA-sekvens eller en från växt-DNA in vitro syntetiserad DNA innehållande en promotorsekvens för kombination med den andra DNA-sekvensen.

3. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av att såsom en andra DNA-sekvens används en från en bakterie isolerad DNA-sekvens eller en från växt-DNA in vitro syntetise-

rad DNA innehållande en signalsekvens för kombination med den första DNA-sekvensen.

4. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av att kolkällan väljs bland glycerol, succinat och etanol.
5. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av att den intracellulära koncentrationen av hem ökas genom tillsats till tillväxtmediet av ett eller flera ämnen valda ur den grupp som utgöres av hem, hemanaloger och hemprekursorer.
6. Förfarande enligt patentkravet 5, **kännetecknat** av att såsom hemanalog används föreningen deuteroporfyrin IX och/eller såsom hemprekursor används föreningen δ -aminolevulin-syra.
7. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av användning av en DNA-sekvens som är identisk med 5'-flankerande regioner i sojabönleghemoglobin-gener.
8. Förfarande enligt patentkravet 7, **kännetecknat** av att den 5'-flankerande regionen är identisk med 5'-flankerande regioner i Lba-genen med sekvensen:

```
GAGATACATT ATAATAATCT CTCTAGTGTC TATTTATTAT TTTATCTGGT
GATATATACC TTCTCGTATA CTGTTATTTT TTCAATCTTG TAGATTTACT
TCTTTTATTT TTATAAAAAA GACTTTATTT TTTTAAAAAA AATAAAGTGA
ATTTTGAAA CATGCTCTTT GACAATTTTC TGTTTCCTTT TTCATCATTG
GGTTAAATCT CATAGTGCCT CTATTCAATA ATTTGGGCTC AATTTAATTA
GTAGAGTCTA CATAAAATTT ACCTTAATAG TAGAGAATAG AGAGTCTTGG
AAAGTTGGTT TTTCTCGAGG AAGAAAGGAA ATGTTAAAAA CTGTGATATT
TTTTTTTTGG ATTAATAGTT ATGTTTATAT GAAAAC TGAA AATAAATAAA
CTAACCATAT TAAATTTAGA ACAACACTTC AATTATTTTT TTAATTTGAT
TAATTA AAAA ATTATTTGAT TAAATTTTTT AAAAGATCGT TGTTTCTTCT
TCATCATGCT GATTGACACC CTCCACAAGC CAAGAGAAAC ACATAAGCTT
TGGTTTTCTC ACTCTCCAAG CCCTCTATAT AAACAAATAT TGGAGTGAAG
TTGTTGCATA ACTTGCATCG AACAAATTAAT AGAAATAACA GAAAATTAAA
AAAGAAATAT G.
```

9. Förfarande enligt patentkravet 7, **kännetecknat** av att den 5'-flankerande regionen är identisk med 5'-flankerande regioner i Lbc1-genen med sekvensen:

```

TTCTCTTAAT ACAATGGAGT TTTTGTTGAA CATACATACA TTTAAAAAAA
AATCTCTAGT GTCTATTTAC CCGGTGAGAA GCCTTCTCGT GTTTTACACA
CTTTAATATT ATTATATCCT CAACCCACACA AAAAAGAATA CTGTTATATC
TTTCCAAACC TGTAGATTTA TTTATTTATT TATTTATTTT TACAAAGGAG
ACTTCAGAAA AGTAATTACA TAAAGATAGT GAACATCATT TTATTTATTA
TAATAAACTT TAAAATCAAA CTTTTTTATA TTTTTTGTTA CCCTTTTCAT
TATTGGGTGA AATCTCATAG TGAAGCCATT AAATAATTTG GGCTCAAGTT
TTATTAGTAA AGTCTGCATG AAATTTAACT TAACAATAGA GAGAGTTTTC
GAAAGGGAGC GAATGTTAAA AAGTGTGATA TTATATTTTA TTTCGATTAA
TAATTATGTT TACATGAAAA CATACAAAAA AATACTTTTA AATTCAGAAT
AATACTTAAA ATATTTATTT GCTTAATTGA TTAAGTAAA ATTATTTGAT
TAGGATTTTG AAAAGATCAT TGGCTCTTCG TCATGCCGAT TGACACCCTC
CACAAGCCAA GAGAACTTA AGTTGTAAAC TTTCTCACTC CAAGCCTTCT
ATATAAACAT GTATTGGATG TGAAGTTATT GCATAACTTG CATTGAACAA
TAGAAAATAA CAAAAAAAAG TAAAAAAGTA GAAAAGAAAT ATG.

```

10. Förfarande enligt patentkravet 7, **kännetecknat** av att den 5'-flankerande regionen är identisk med 5'-flankerande regioner i Lbc2-genen med sekvensen:

```

TCGAGTTTTT ACTGAACATA CATTTATTAA AAAAACTCT CTAGTGTCCA
TTTATTCGGC GAGAAGCCTT CTCGTGCTTT ACACACTTTA ATATTATTAT
ATCCCCACCC CCACCAAAAA AAAAAAACT GTTATATCTT TCCAGTACAT
TTATTTCTTA TTTTACAAA GGAACTTCA CGAAAGTAAT TACAAAAAAG
ATAGTGAACA TCATTTTTTT AGTTAAGATG AATTTTAAAA TCACACTTTT
TTATATTTTT TTGTTACCCT TTTTATTATT GGGTGAAATC TCATAGTGAA
ACTATTAAT AGTTGGGCT CAAGTTTTAT TAGTAAAGTC TGCATGAAAT
TTAACTTAAT AATAGAGAGA GTTTTGGAAA GGTAACGAAT GTTAGAAAGT
GTGATATTAT TATAGTTTTA TTTAGATTAA TAATTATGTT TACATGAAAA
TTGACAATTT ATTTTTAAAA TTCAGAGTAA TACTTAAATT ACTTATTTAC
TTTAAGATTT TGAAAAGATC ATTTGGCTCT TCATCATGCC GATTGACACC
CTCCACAAGC CAAGAGAAAC TTAAGTTGTA ATTTTCTAA CTCCAAGCCT
TCTATATAAA CACGTATTGG ATGTGAAGTT GTTGCATAAC TTGCATTGAA
CAATAGAAAT AACAACAAAG AAAATAAGTG AAAAAAGAAA TATG.

```

11. Förfarande enligt patentkravet 7, **kännetecknat** av att den 5'-flankerande regionen är identisk med 5'-flankerande regioner i Lbc3-genen med sekvensen:

TATGAAGATT AAAAAATACA CTCATATATA TGCCATAAGA ACCAACAAAA
 GTACTATTTA AGAAAAGAAA AAAAAAACCT GCTACATAAT TTCCAATCTT
 GTAGATTTAT TTCTTTTATT TTTATAAAGG AGAGTTAAAA AAATTACAAA
 ATAAAAATAG TGAACATCGT CTAAGCATTT TTATATAAGA TGAATTTTAA
 AAATATAATT TTTTTGTCTA AATCGTATGT ATCTTGTCTT AGAGCCATTT
 TTGTTTAAAT TGGATAAGAT CACACTATAA AGTTCTTCCT CCGAGTTTGA
 TATAAAAAAA ATTGTTTCCC TTTTGATTAT TGGATAAAAT CTCGTAGTGA
 CATTATATTA AAAAAATTAG GGCTCAATTT TTATTAGTAT AGTTTGCATA
 AATTTTAACT TAAAAATAGA GAAAATCTGG AAAAGGGACT GTTAAAAAGT
 GTGATATTAG AAATTTGTCTG GATATATTAA TATTTTATTT TATATGGAAA
 CTAAAAAAAT ATATATTAAA ATTTTAAATT CAGAATAATA CTTAAATTAT
 TTATTTACTG AAAATGAGTT GATTTAAGTT TTTGAAAAGA TGATTGTCTC
 TTCACCATAC CAATTGATCA CCCTCCTCCA ACAAGCCAAG AGAGACATAA
 GTTTTATTAG TTATTCTGAT CACTCTTCAA GCCTTCTATA TAAATAAGTA
 TTGGATGTGA AGTTGTTGCA TAACTTGCAT TGAACAATTA ATAGAAATAA
 CAGAAAAGTA GAAAAGAAAT ATG.

12. DNA-sekvens, som kan användas i rekombinant-DNA-segment vid genomförandet av förfarandet enligt kraven 1-11, **kännetecknad** av att den innefattar en första DNA-sekvens innehållande en promotorsekvens, och en andra DNA-sekvens innehållande en signalsekvens, som regleras på post-transkriptionsnivå av hem, hemanaloger eller hemprekursorer, och som är identisk med den 5'-flankerande regionen i växtleghemoglobin.

13. DNA-sekvens, som används vid genomförande av förfarandet enligt patentkravet 12, **kännetecknad** av att den är identisk med signalsekvensen av sojabönleghemoglobin-gener.

14. DNA-sekvens enligt patentkravet 13, **kännetecknad** av att den är identisk med 5'-flankerande regioner av Lba-genen med sekvensen:

GAGATACATT ATAATAATCT CTCTAGTGTC TATTTATTAT TTTATCTGGT
 GATATATACC TTCTCGTATA CTGTTATTTT TTCAATCTTG TAGATTTACT
 TCTTTTATTT TTATAAAAAA GACTTTATTT TTTTAAAAAA AATAAAGTGA
 ATTTTGAAAA CATGCTCTTT GACAATTTTC TGTTTCCTTT TTCATCATTG
 GGTTAAATCT CATAGTGCCT CTATTCAATA ATTTGGGCTC AATTTAATTA
 GTAGAGTCTA CATAAAATTT ACCTTAATAG TAGAGAATAG AGAGTCTTGG
 AAAGTTGGTT TTTCTCGAGG AAGAAAGGAA ATGTTAAAAA CTGTGATATT
 TTTTTTTTGG ATTAATAGTT ATGTTTATAT GAAAACCTGAA AATAAATAAA
 CTAACCATAT TAAATTTAGA ACAACACTTC AATTATTTTT TTAATTTGAT
 TAATTAATAAA ATTATTTGAT TAAATTTTTT AAAAGATCGT TGTTTCTTCT
 TCATCATGCT GATTGACACC CTCCACAAGC CAAGAGAAAC ACATAAGCTT
 TGGTTTTCTC ACTCTCCAAG CCCTCTATAT AAACAAATAT TGGAGTGAAG
 TTGTTGCATA ACTTGCATCG AACAATTAAT AGAAATAACA GAAAATTAAA
 AAAGAAATAT G.

15. DNA-sekvens enligt patentkravet 13, **kännetecknad** av att den är identisk med 5'-flankerande regioner av Lbc1-genen med sekvensen:

```

TTCTCTTAAT ACAATGGAGT TTTTGTTGAA CATACATACA TTTAAAAAAA
AATCTCTAGT GTCTATTTAC CCGGTGAGAA GCCTTCTCGT GTTTACACA
CTTTAATATT ATTATATCCT CAACCCACACA AAAAAGAATA CTGTTATATC
TTTCCAAACC TGTAGATTTA TTTATTTTATT TATTTATTTT TACAAAGGAG
ACTTCAGAAA AGTAATTACA TAAAGATAGT GAACATCATT TTATTTATTA
TAATAAACTT TAAAATCAAA CTTTTTTTATA TTTTTTGTTA CCCTTTTCAT
TATTGGGTGA AATCTCATAG TGAAGCCATT AAATAATTTG GCCTCAAGTT
TTATTAGTAA AGTCTGCATG AAATTTAACT TAACAATAGA GAGAGTTTTC
GAAAGGGAGC GAATGTTAAA AAGTGTGATA TTATATTTTA TTTCGATTAA
TAATTATGTT TACATGAAAA CATACAAAAA AATACTTTTA AATTCAGAAT
AATACTTAAA ATATTTATTT GCTTAATTGA TTAAGTAAA ATTATTTGAT
TAGGATTTTG AAAAGATCAT TGGCTCTTCG TCATGCCGAT TGACACCCTC
CACAAGCCAA GAGAACTTA AGTTGTA AAC TTTCTCACTC CAAGCCTTCT
ATATAAACAT GTATTGGATG TGAAGTTATT GCATAACTTG CATTGAACAA
TAGAAAATAA CAAAAAAAAG TAAAAAAGTA GAAAAGAAAT ATG.

```

16. DNA-sekvens enligt patentkravet 13, **kännetecknad** av att den är identisk med 5'-flankerande regioner av Lbc2-genen med sekvensen:

```

TCGAGTTTTT ACTGAACATA CATTATTAA AAAAACTCT CTAGTGCCA
TTTATTCGGC GAGAAGCCTT CTCGTGCTTT ACACACTTTA ATATTATTAT
ATCCCCACCC CCACCAAAAA AAAAAAACT GTTATATCTT TCCAGTACAT
TTATTTCTTA TTTTACAAA GGAACTTCA CGAAAGTAAT TACAAAAAAG
ATAGTGAACA TCATTTTTTT AGTTAAGATG AATTTTAAA TCACACTTTT
TTATATTTTT TTGTTACCCT TTTCATTATT GGGTGAAATC TCATAGTGAA
ACTATTAAAT AGTTTGGGCT CAAGTTTTAT TAGTAAAGTC TGCATGAAAT
TTAACTTAAT AATAGAGAGA GTTTTGGAAA GGTAACGAAT GTTAGAAAGT
GTGATATTAT TATAGTTTTA TTTAGATTAA TAATTATGTT TACATGAAAA
TTGACAATTT ATTTTTTAAA TTCAGAGTAA TACTTAAATT ACTTATTTAC
TTTAAGATTT TGAAAAGATC ATTTGGCTCT TCATCATGCC GATTGACACC
CTCCACAAGC CAAGAGAAAC TTAAGTTGTA ATTTTTCTAA CTCCAAGCCT
TCTATATAAA CACGTATTGG ATGTGAAGTT GTTGCATAAC TTGCATTGAA
CAATAGAAAT AACACAAAG AAAATAAGTG AAAAAAGAAA TATG.

```

17. DNA-sekvens enligt patentkravet 13, **kännetecknad** av att den är identisk med 5'-flankerande regioner av Lbc3-genen med sekvensen:

```

TATGAAGATT AAAAAATACA CTCATATATA TGCCATAAGA ACCAACAAAA
GTACTATTTA AGAAAAGAAA AAAAAAACCT GCTACATAAT TTCCAATCTT
GTAGATTTAT TTCTTTTATT TTTATAAAGG AGAGTTAAAA AAATTACAAA
ATAAAAATAG TGAACATCGT CTAAGCATTT TTATATAAGA TGAATTTTAA
AAATATAATT TTTTGTCTA AATCGTATGT ATCTTGCTT AGAGCCATTT
TTGTTTAAAT TGGATAAGAT CACACTATAA AGTTCTTCCT CCGAGTTTGA
TATAAAAAAA ATTGTTTCCC TTTTGATTAT TGGATAAAAT CTCGTAGTGA
CATTATATTA AAAAAATTAG GGCTCAATTT TTATTAGTAT AGTTTGCATA
AATTTTAACT TAAAAATAGA GAAAATCTGG AAAAGGGACT GTTAAAAAGT
GTGATATTAG AAATTTGTCG GATATATTAA TATTTTATTT TATATGGAAA
CTAAAAAAT ATATATTAAA ATTTTAAATT CAGAATAATA CTTAAATTAT
TTATTTACTG AAAATGAGTT GATTTAAGTT TTTGAAAAGA TGATTGTCTC
TTCACCATAC CAATTGATCA CCCTCCTCCA ACAAGCCAAG AGAGACATAA
GTTTATTAG TTATTCTGAT CACTCTCAA GCCTTCTATA TAAATAAGTA
TTGGATGTGA AGTTGTTGCA TAACTTGCAT TGAACAATTA ATAGAAATAA
CAGAAAAGTA GAAAAGAAAT ATG.

```

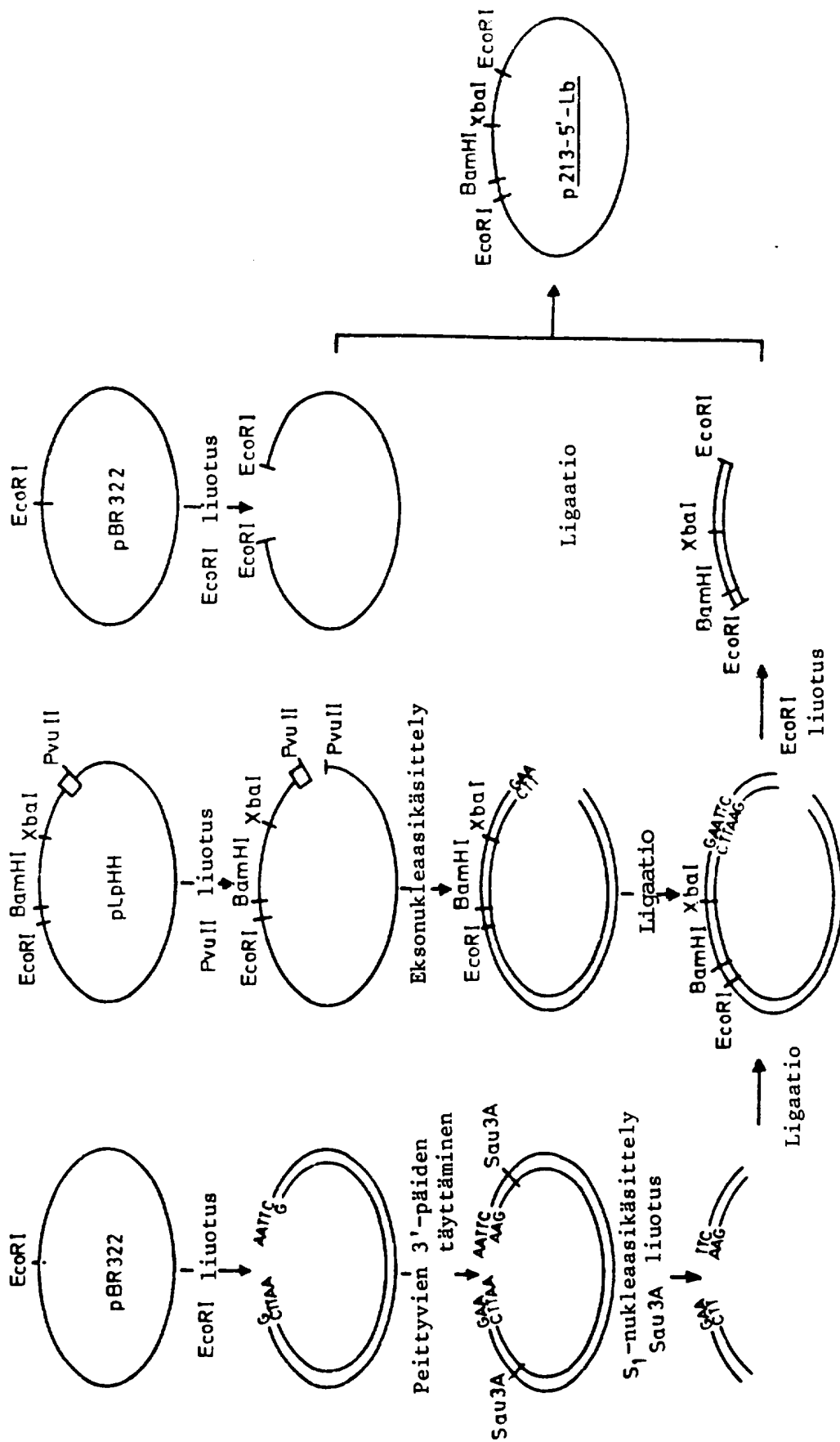
18. Rekombinant-DNA-sekvens, som kan användas i förfarandet enligt patentkraven 1-12, **kännetecknad** av att den innehåller den gen, som önskas uttryckas samt DNA-sekvensen enligt vilken som helst av patentkraven 12-17.

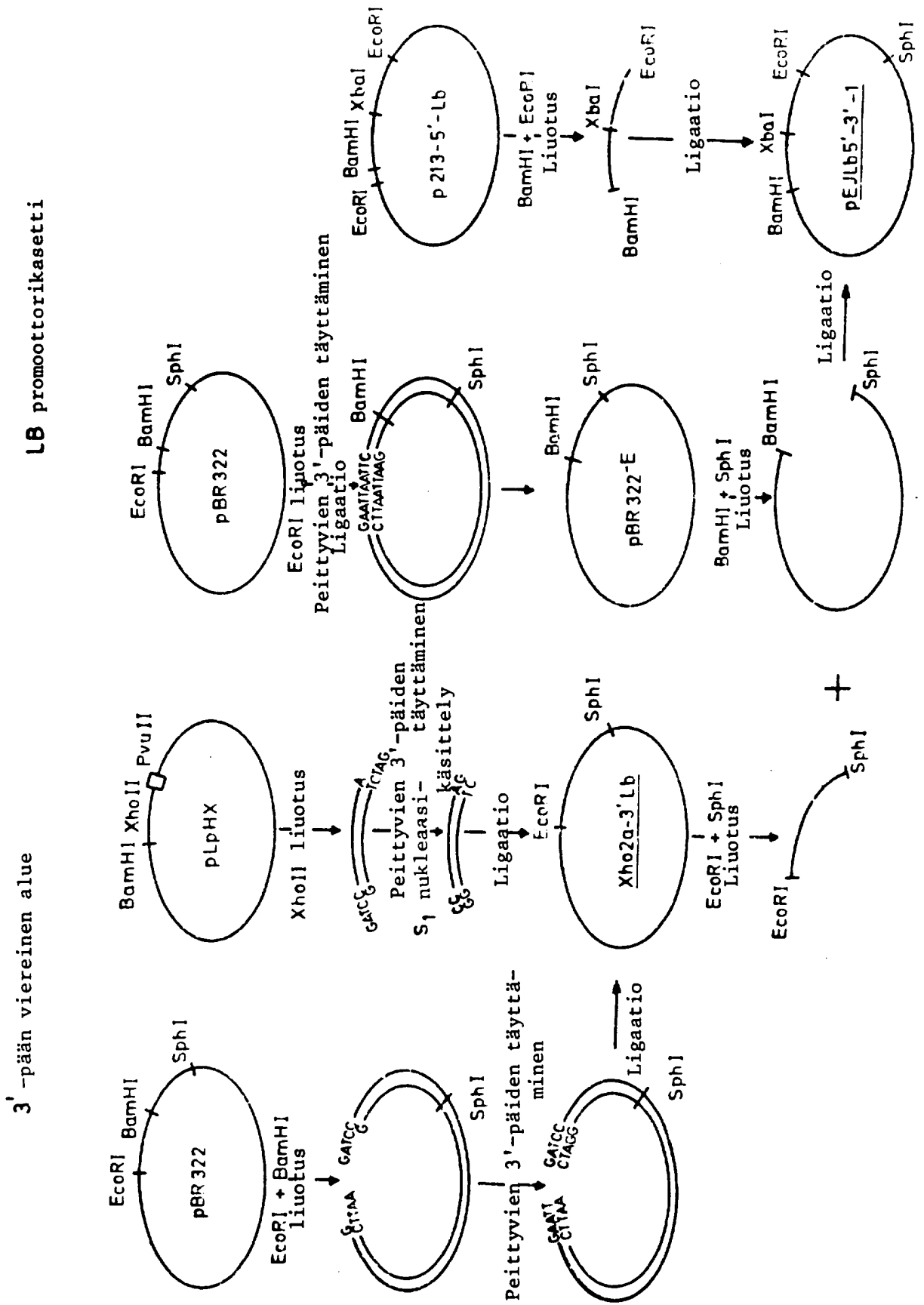
19. Plasmid som kan användas vid förfarandet enligt patentkravet 1 för framställning av kloramfenikol-acetyl-transferas (CAT), **kännetecknad** av att den har designerats YEP Lb CAT och utan CAT-genen innehåller en promotorsekvens och signalsekvens i en DNA-sekvens, som innehåller den 5'-flankerande regionen av sojabönleghemoglobin-genen Lbc3 och vars struktur har presenterats i schemat 6.

20. Plasmid som kan användas vid förfarandet enligt patentkravet 1 för framställning av neomycinfosfotransferas (NPT) II, **kännetecknad** av att den har designerats YEP 5 Lb Km och utan NPT II-genen innehåller en promotorsekvens och signalsekvens i en DNA-sekvens, som innehåller den 5'-flankerande regionen av sojabönleghemoglobin-genen Lbc3 och vars struktur har presenterats i schemat 8.

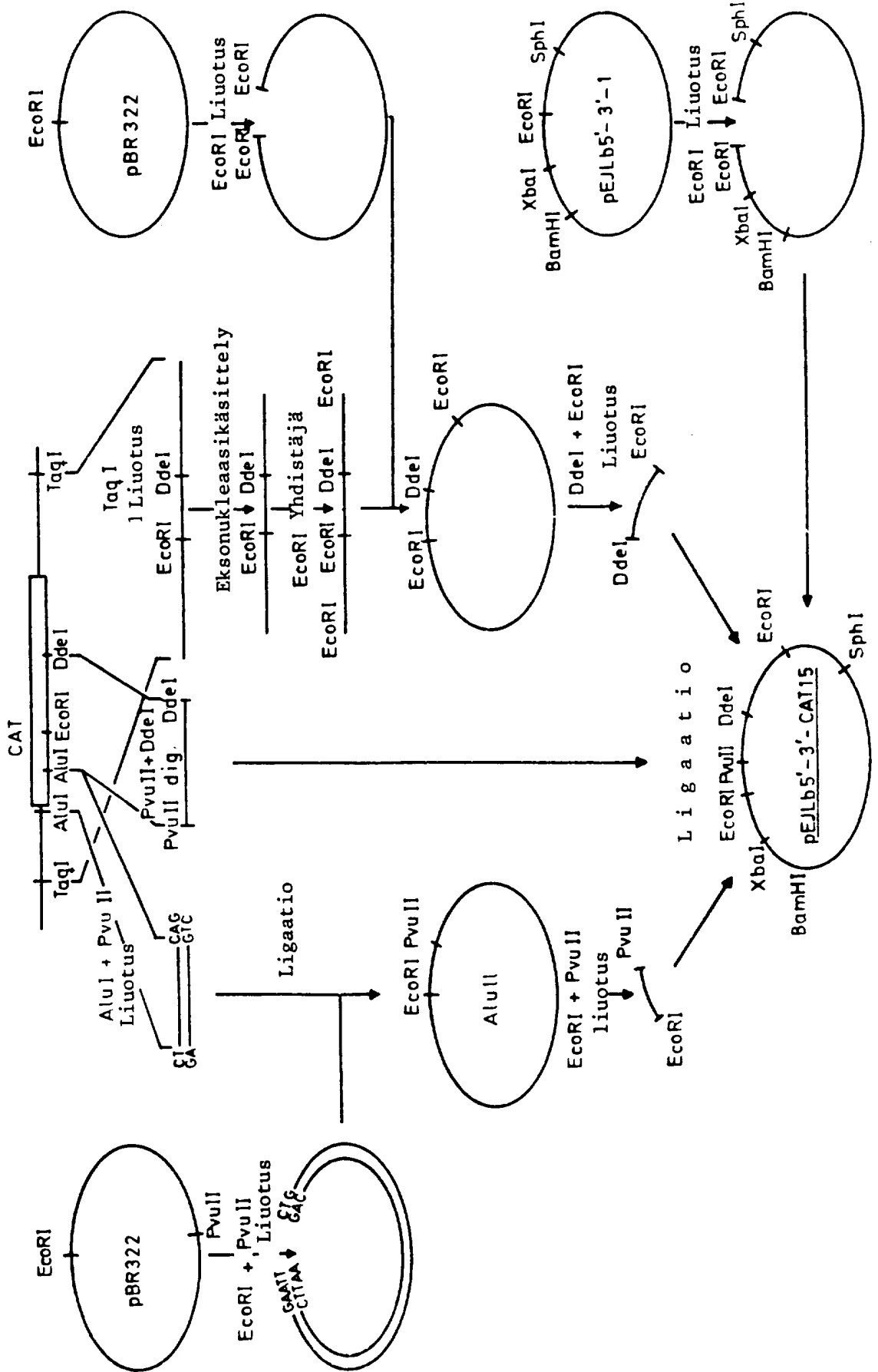
Kaavio 3

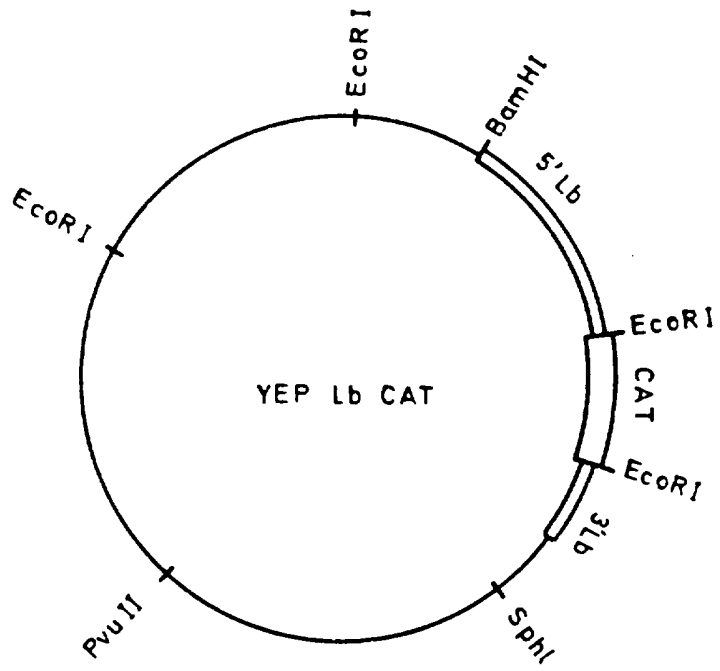
5' pään viereinen alue

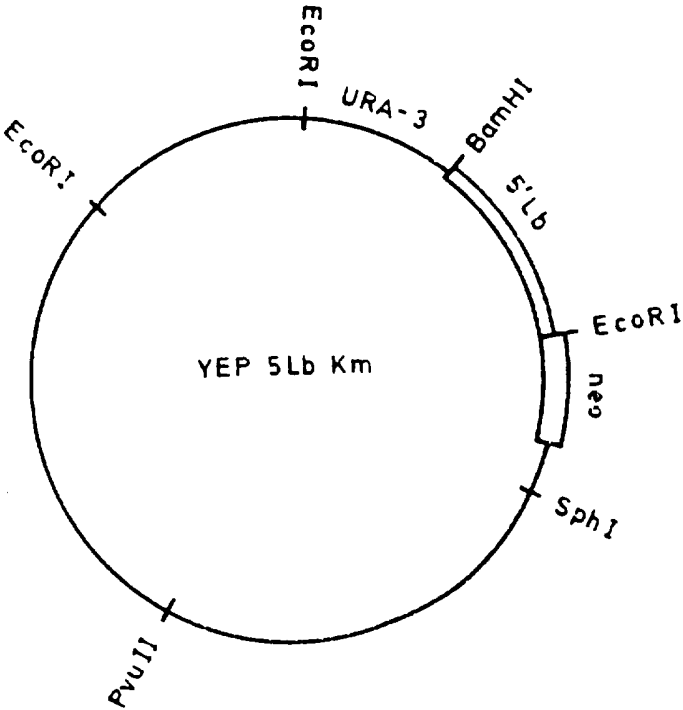




Kimeerinen CAT/LB-geeni







Suoraan linjaan saattaminen - Versio 1

Näiden kahden sekvenssin saattaminen suoraan linjaan

lbcat15 941 emäkset emäksestä 650

lbcat101 953 emäkset emäksestä 650

```

10      20      30      40      50      60      70      80
GTTTATTAGTTATTCTGATCAGCTCTTCAAGCCTTCTATATAAATAAGTATTGGATGTTGAAGTTGTTGCA
*****
GTTTATTAGTTATTCTGATCAGCTCTTCAAGCCTTCTATATAAATAAGTATTGGATGTTGAAGTTGTTGCA
*****
GTTTATTAGTTATTCTGATCAGCTCTTCAAGCCTTCTATATAAATAAGTATTGGATGTTGAAGTTGTTGCA
*****
GGTGGTACCCTG
      kpnI
  
```

```

90      100     110     120     130     140     150     160
--TAACTTGCATTGAACAATTAATAGAAATAACAGAAAAAGTA---GAATTCTAAAATGAGAGAAAAAATCAGTGGATATA
*****
SATAACTTGCATTGAGCAATTAATAGAAATAACAGAAAAAGTAGCAGATCTGTAAATGAGAAAAAATCAGTGGATATA
      BgIII
  
```

```

170     180     190     200     210     220     230     240
CCACCGTTGATATATCCCAATGCCATCGTAAGAGAACATTTGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACAGACCGTTCAGCTG
*****
CCACCGTTGATATATCCCAATGCCATCGTAAGAGAACATTTTGAAGGCATTTTCAGTCAAGTTGCTCAATGTACCTATAACAG
  
```

Suoraan linjaan saattaminen - Versio 1

Näiden kahden sekvenssin saattaminen suoraan linjaan

lbcatk 991 emäket emäksestä 600

lbcatbd 991 emäket emäksestä 600

```

      10      20      30      40      50      60
GGTAGCAAATTTGGAATCGCATGAAAAGAAAAAATAATATCAAAGAAAAGAGTCATCT
*****
GGTAGCAAATTTGGAATCGCATGAAAAGAAAAAATAATATCAAAGAAAAGAGTCATCT

      70      80      90      100      110      120
CAAACATA-----CCTGCA
*****
CAAACATATGTTGTCAGATACTTCATTATCAGCTTTGAAAACCTTTGTTGTTGCTGCTTT

      130      140      150      160      170      180
TAACTTGCATTGAACAATTAATAGAAATAACAGAAAAGTAGCAGATCTGTAAAATGGAGA
* * * ** * *****
GAGTTCTTTCTTGTGTGAGTGCTACAAGCCACATTTAACTAAGATCTGTAAAATGGAGA

      190      200      210      220      230      240
AAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTG
*****
AAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTG

      250      260      270      280      290      300
AGGCATTTGAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAAGACCGTTGAGCTGGATATTACGG
*****
AGGCATTTGAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAAGACCGTTGAGCTGGATATTACGG

      310      320      330      340      350      360
CCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTACATTC
CCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTACATTC
    
```