

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

DD (11) 254 212 A5

4(51) C 12 N 15/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP C 12 N / 293 894 8	(22)	27.08.86	(44)	17.02.88
(31)	8521496	(32)	29.08.85	(33)	GB

(71) siehe (73)

(72) Hinnen, Albert, Dr., CH; Meyhack, Bernd, Dr., DE

(73) CIBA-GEIGY AG, Basel, CH

(54) Verfahren zur Herstellung eines Hefehybridvectors, der einen oder mehrere DNS-Inserts enthält

(55) Verfahren, Herstellung, Hefehybridvector, DNS-Insert, DNA-Insert, Hefe, heterologes Polypeptid, Transcriptionskontrolle, Hybridpromotor, Hefegen, codiert, verknüpft

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Hefehybridvectors, der einen oder mehrere DNS-Inserts enthält. Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß ein Hybridpromotor, der aus einem 5'-Upstream-Promotorelement mit UAS(n) des Hefegens PH05 und einem 3'-Downstream-Promotorelement von einem anderen Hefegen als dem PH05-Gen, das Transcriptions-Initiiierungsstellen einschließlich einer funktionellen TATA-Box aufweist, besteht, mit einem DNS-Segment, das für ein zu Hefe heterologes Polypeptid codiert, so verknüpft wird, daß das DNS-Segment unter der Transcriptionskontrolle des Hybridpromotors steht, und daß wahlweise eine oder mehrere erzeugte lineare DNSn in eine Vector-DNS eingebaut werden.

ISSN 0433-6461

32 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines Hefehybridvectors, der einen oder mehrere DNS-Inserts enthält, welche DNA-Inserts jeweils ein für ein zu Hefe heterologes Polypeptid kodierendes DNS-Segment enthalten, welches unter der Transcriptionskontrolle eines Hybridpromotors steht, der aus einem 5'-Upstream-Promotorelement mit UAS(n) des Hefegens **PHO5** und einem 3'-Downstream-Promotorelement von einem anderen Hefegen als dem **PHO5**-Gen, das Transcriptions-Initiierungsstellen einschließlich einer funktionellen TATA-Box aufweist, besteht, gekennzeichnet dadurch, daß ein Hybridpromotor, der aus einem 5'-Upstream-Promotorelement mit UAS(n) des Hefegens **PHO5** und einem 3'-Downstream-Promotorelement von einem anderen Hefegen als dem **PHO5**-Gen, das Transcriptions-Initiierungsstellen einschließlich einer funktionellen TATA-Box aufweist, besteht, mit einem DNS-Segment, das für ein zu Hefe heterologes Polypeptid codiert, so verknüpft wird, daß das DNS-Segment unter der Transcriptionskontrolle des Hybridpromotors steht, und daß wahlweise eine oder mehrere erzeugte lineare DNSn in eine Vector-DNS eingebaut werden.
2. Verfahren zur Herstellung eines Hefehybridvectors gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß der Hybridpromotor aus einem 5'-Upstream-Promotorelement mit UAS(n) des Hefegens **PHO5** und einem 3'-Downstream-Promotorelement des Hefe-Gens GAPDH, das an den Nucleotiden –300 bis –180 des GAPDH-Gens beginnt und an dem Nucleotid –1 des GAPDH-Gens endet, besteht.
3. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß der Hybridvector einen bis vier DNS-Inserts enthält.
4. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß der Hybridvector einen DNS-Inserts enthält.
5. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß der Hybridplasmid oder ein linearer DNS-Vector ist.
6. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß der Hybridvector eine DNS-Sequenz enthält, die für ein Polypeptid höherer eukaryotischer Herkunft codiert.
7. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß der Hefehybridpromotor direkt mit der Codierungsregion des reifen Polypeptids verknüpft wird, wobei ein ATG an der Verbindungsstelle eingefügt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Polypeptid-Codierungsregion für ein Polypeptid mit einer Signalsequenz codiert.
9. Verfahren zur Herstellung eines Hybridvectors nach Anspruch 1, der die Fähigkeit zur Replikation und phenotypischen Selektion in einem Hefewirtsstamm besitzt und der einen Hefehybridpromotor und eine für ein heterologes Polypeptid codierende DNS-Sequenz aufweist, gekennzeichnet dadurch, daß die DNS-Sequenz zusammen mit dem Transcriptions-Start- und -Terminationssignal sowie dem Translationsstart- und -Stoppsignal in dem Hybridvector unter der Kontrolle des Hybridpromotors derart angeordnet ist, daß in einem transformierten Hefestamm das Polypeptid exprimiert wird.
10. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß es sich bei dem 5'-Upstream-Promotorelement um das 368 bp BamHI-BstEII-Fragment der 5'-Region des Hefegens **PHO5** handelt.
11. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß es sich bei dem 5'-Upstream-Promotorelement um das 268 bp BamHI-Clal-Fragment der 5'-Region des Hefegens **PHO5** handelt.
12. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß es sich bei dem 5'-Upstream-Promotorelement um das 100 bp Clal-BstEII-Fragment der 5'-Region des Hefegens **PHO5** handelt.
13. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß es sich bei dem 5'-Upstream-Promotorelement um die 31 bp DNS der Formel
GAAATATATATTAAATTAGCACGTTTCGCA
CTTTATATATAATTAAATCGTGAAAAGCGT
handelt.

14. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß der Hybridmotor UAS1 (PHO5) und UAS2 (PHO5) enthält.
15. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß der Hybridmotor UAS1 (PHO5) enthält.
16. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß der Hybridmotor UAS2 (PHO5) enthält.
17. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß das 3'-Downstream-Promotorelement von dem Promotor eines Hefegens abgeleitet ist, das für ein glycolytisches Enzym codiert.
18. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß das 3'-Downstream-Promotorelement von dem Hefegen GAPDH abgeleitet ist.
19. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß das 3'-Downstream-Promotorelement die Nucleotide -199 bis -1 des Hefegens GAPDH aufweist.
20. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß das 3'-Downstream-Promotorelement die Nucleotide -263 bis -1 des Hefegens GAPDH aufweist.

Hierzu 10 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Hefehybridvectors, der einen oder mehrere DNS-Inserts enthält, welche DNA-Inserts jeweils ein für ein zu Hefe heterologes Polypeptid kodierendes DNS-Segment enthalten, welches unter der Transcriptionskontrolle eines Hybridpromotors steht, der aus einem 5'-Upstream-Promotorelement mit UAS(n) des Hefegens PHO5 und einem 3'-Downstream-Promotorelement von einem anderen Hefegen als dem PHO5-Gen, das Transcriptions-Initiierungsstellen einschließlich einer funktionellen TATA-Box aufweist, besteht.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

In den letzten Jahren wurden auf dem Gebiet der Gentechnik große Fortschritte erzielt, und einige Systeme, bei denen genetisch manipulierte Mikroorganismen, vor allem Stämme des Enterobakteriums *Escherichia coli* und von Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) angewandt werden, sind jetzt erfolgreich. Es besteht aber ein Bedarf an zusätzlichen und verbesserten Systemen, vor allem eukaryotischen Systemen wie Hefen, die sich für die wirtschaftliche und Großproduktion von Proteinen in der Industrie eignen. Gegenwärtig stehen verschiedene Hefevectoren für die Gen-Clonierung zur Verfügung. Für die wirkungsvolle Expression von Fremdgenen in Hefe müssen strukturelle Hefecodierungssequenzen mit starken Hefepromotoren kombiniert werden, die möglichst Regulatormerkmale zeigen sollten, die die exogene Kontrolle der Gen-Expression erlauben. Da man annimmt, daß der Wirkungsgrad der Expression (Produktbildung) eine Funktion der Stärke des verwendeten Promotors und proportional dazu ist, widmen die Fachleute auf dem Gebiet der Gentechnik ihre spezielle Aufmerksamkeit der Entwicklung kräftiger Promotorsysteme.

Eine *in vitro* Mutagenese von clonierten, für Proteine codierenden Hefegenen und ihr Wiedereinbau zurück in Hefezellen zur Funktionsanalyse haben die Identifizierung verschiedener essentieller cis-wirkender Promotorelemente ermöglicht (hinsichtlich Referenz siehe L. Guarente, Cell 36, 799 [1984]). Beginnt man mit den die Proteincodierungsregion am 5'-Ende des Gens unmittelbar flankierenden Elementen, so umfassen diese Elemente:

- eine 5'-transkribierbare Führerregion, ziemlich A-T reich, die manchmal ein CAACAAACAA- (oder verwendetes Sequenz)-Motiv enthält.
- Transcriptions-Initiierungspunkte, die etwa 40 bis 60 bp (Basenpaare) (manchmal mehr) vom Translations-Start-Codon ATG entfernt liegen, was gewöhnlich auf eine Multiplizität von mRNS-Startstellen verschiedener Stärke hindeutet,
- eine TATA-Box (manchmal mehr als eine), die etwa 40 bis 60 bp von den Transcriptions-Initiierungspunkten entfernt liegt und vermutlich als essentielle RNS-Polymerase II Erkennungsstelle dient,
- Upstream-Aktivierungsstelle(n) (UAS), präsumptive Target-Stellen für Regulator-Proteine, die etwa 100 bis 300 bp vor der (upstream) TATA-Box liegen.

Die UAS wirkt in einer anderen Weise als die Regulatorstellen, die in Prokaryoten gefunden wurden, und ähneln eher den Verstärkerstellen der Säugetiersysteme. Ziemlich ausführliche Angaben stehen über die Hefe **GAL1**, **GAL7**, **GAL10**-Ansammlung zur Verfügung, wonach ein positiv wirkendes Regulator-Protein (**GAL4** Genprodukt) direkt mit der UAS von **GAL1-GAL10** zusammenwirkt (Giniger, u. a., Cell 40, 767 [1985]).

Durch Fusion von Promotorsegmenten, die die UAS von **GAL1-GAL10** vor der TATA-Box des Hefegens **CYC1** codieren, wurde ein Hybridmotor erzeugt, dessen Transcription jetzt unter der Kontrolle der UAS von **GAL1-GAL10** steht, d.h. **GAL4** gen-abhängig [L. Guarente, u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7410 [1984]]. Eine ähnliche Konstruktion erfolgte durch Verschmelzen von Promotorelementen von **CYC1** und **LEU2** [L. Guarente, u. a., Cell 36, 503 [1984]]. Diese beiden Beispiele enthalten Promotorelemente und Proteincodierungssequenzen von Hefe, und es gibt keinen Beweis, daß diese Systeme auch mit in bezug auf Hefe fremden Genen funktionieren.

In einer kürzlich veröffentlichten Patentanmeldung (PCT 84/4757) wird ein UAS-Element des Hefegens **PGK** beschrieben. Es wird das Vorhandensein eines wichtigen Promotorelementes, das zwischen den Positionen -324 und -455 (von dem ATG) liegt, gezeigt. Es wird behauptet, daß die Stärke jedes anderen Hefepromotors durch den Zusatz dieses Elementes vor anderen Promotoren potenziert würde. Es wird jedoch kein Beispiel zum Beweis dieser Behauptung angeführt, die Argumente basieren lediglich auf negativen Daten (Zerstörung eines Promotors). Es ist durchaus möglich, daß das Element ein wesentlicher Teil des **PGK** Promotors ist, es ist aber zweifelhaft, ob ein solches Element als Teil eines Hybridpromotors wirken könnte. Außerdem ist die UAS von **PGK** nicht mit dem Regulatorsignal assoziiert, d.h. es ermöglicht keine Expressionskontrolle (Transcription) der davor gelegenen (Downstream-) Codierungssequenz durch ein spezifisches physiologisches Signal.

Einige der Promotoren glycolytischer Gene werden in Gegenwart von Glucose induziert. Sie können potentiell unterdrückt (turned off) werden, wenn die Zellen in einem glucose-freien Medium gezüchtet werden. Das bedeutet, daß Hefewirzellen transformiert und in einem Medium regeneriert werden müssen, in dem Glucose durch andere Kohlenstoffquellen (Acetat, Glycerol, Lactat usw.) ersetzt ist, um die Zellen gegen ein potentiell schädliches oder tödliches Genprodukt, das sich in der Zelle ansammelt, zu schützen. Da die Regeneration von Protoplasten [A. Hinnen, u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929 (1975)] oder von mit Salz behandelten ganzen Zellen [Ito, u. a., J. Bacteriol. 153, 163 (1983)] im allgemeinen in einem reichen Medium vorgenommen wird, um eine rasche Regeneration der Zellen und die Bildung von Kolonien zu ermöglichen, setzen alle derzeit benutzten Transformationsprotokolle Glucose als Kohlenstoffquelle ein. Es wird erwartet, daß die Regeneration und Gewinnung in einem glucose-freien Medium sehr schlecht vor sich geht (wenn überhaupt).

Im Fachgebiet ist allgemein bekannt, daß der zeitliche Ablauf der Expression reguliert werden muß, damit das Protein auch wirklich nur in großen Mengen erzeugt wird, wenn die Zelle die großen Mengen von Fremdproteinen am besten tolerieren kann, d. h. außerhalb der Wachstumsperiode. Es empfiehlt sich auch, die Regulierung der Expression nicht von dem Vorhandensein oder dem Fehlen der für mikrobiologisches Wachstum wichtigsten Kohlenstoffquelle, d. h. Glucose, abhängig zu machen. Regulierbare und kräftige Promotorsysteme, die diesen Bedingungen herkömmlicher und technisch durchführbarer Expression von Fremdgenen durch Hefe entsprechen, sind im Fachgebiet kaum bekannt. Es besteht daher die Notwendigkeit, solche Promotorsysteme zu entwickeln.

Überraschenderweise wurde jetzt gefunden, daß die Kombination der TATA-Boxregion von Promotoren, die die Expression von am glycolytischen Ablauf beteiligten Enzymen kontrollieren und von denen allgemein angenommen wird, daß sie zu den stärksten derzeit bekannten Promotoren gehören, mit Upstream-Promotorelementen eines regelbaren Promotors, dessen Repression oder Derepression nicht vom Vorhandensein oder Fehlen einer wichtigen Komponente des Nährsubstrates, wie einer essentiellen Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle, abhängig ist, zu starken Hybridpromotoren führt, die die für technisch anwendbare Promotorsysteme festgelegten Bedingungen erfüllen.

Ziel der Erfindung

Durch die Erfindung wird ein verbessertes Verfahren zur Herstellung eines Hefehybridvectors, der einen oder mehrere DNS-Inserts enthält, zur Verfügung gestellt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Hybridpromotoren anzuwenden, vor allem Promotoren glycolytischer Gene, die für die wirksame Expression von Fremdgenen in Hefe unter die Kontrolle der UAS des Säurephosphatasegens **PHO5** gebracht werden.

Die neuerdings isolierten UAS-Signale des Hefegens **PHO5**, von Hybridpromotoren, die die **PHO5-UAS**-Signale aufweisen, Hybridvectoren, die solche Hybridpromotoren enthalten, und mit solchen Hybridvectoren transformierter Hefewirze sind weitere Gegenstände der Erfindung.

Weitere erfindungsgemäßige Aufgaben betreffen Verfahren für die Erzeugung der UAS-Signale, der Hybridpromotoren, der Hybridvectoren und der transformierten Hefewirze und die Anwendung der transformierten Hefewirze für die Herstellung von Polypeptiden.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung:

1. Upstream-Aktivierungs-Sequenzen des Säurephosphatase-Hefegens (**PHO5**) und von Hybridpromotoren

Die Erfindung betrifft Upstream-Aktivierungs-Sequenzen, die von dem Hefegen **PHO5** abgeleitet sind, sowie deren Anwendung für die Herstellung von Hybridpromotoren.

Bis zu der Erfindung war es im Fachgebiet nicht bekannt, ob es eine oder mehrere Upstream-Aktivierungsstellen (oder Sequenzen „UAS“) gibt, die die Transkription des Hefegens **PHO5** modulieren. Das **PHO5**-Gen codiert für eine unterdrückbare Hefesäurephosphatase. Ihre Repression erfolgt bei einer hohen Konzentration in anorganischem Phosphat und ihre Derepression unter Mangel an anorganischem Phosphat [B. Meyhack, u. a., EMBO-J. 1, 675 (1982)].

Die Analyse der 5'-Region des **PHO5**-Gens hat jetzt zur Identifizierung von cis-wirkenden Elementen geführt, die die Transkription des **PHO5**-Gens modulieren. Ein 623 bp BamHI-SalI-Fragment der 5'-Region des in den Phagenvektor M 13mp9 (Rekombinantvektor M 13mp9/**PHO5** Bam-Sal, siehe EU-PA 143-081) clonierten **PHO5**-Gens wird mit Exonuclease Bal 31 digeriert, wobei von der Bam-Stelle aus begonnen wird, und in einem anderen Versuch, von der Sal-Stelle aus. Dadurch wird ein Satz verkürzter **PHO5**-Promotorfragmente erzeugt, die der Sequenzanalyse unterzogen und mit synthetischen EcoRI-Linkern an den verkürzten Enden versehen werden. Durch die Kombination von an der Sal-Stelle verkürzten Fragmenten („linker Arm Promotor-Fragmenten“) mit an der Bam-Stelle verkürzten Fragmenten („rechter Arm Promotor-Fragmenten“) wird ein Satz von Deletionsmutanten der **PHO5**-Promotor-Region geschaffen, die auf ihre Fähigkeit zur Auslösung der Expression des **PHO5**-Strukturgens hin geprüft werden. Es wurde ermittelt, daß die Deletion zwischen den Nucleotiden -225 bis -263 zu einer fünfachen Verringerung der Säurephosphatase-Aktivität führt, und Deletionen zwischen den Nucleotiden -361 bis -392 oder zwischen den Nucleotiden -346 bis -369 eine zehnfache Verringerung der Säurephosphatase-Aktivität ergeben (hinsichtlich der Numerierung der Nucleotide siehe Figur 1 der beigefügten Zeichnungen). Diese Wirkungen werden den Upstream-Aktivierungsstellen (UAS) zugeschrieben, die für die **PHO5**-Expression von Bedeutung sind. Die UAS in der Nachbarschaft von Nucleotid -365 ist in einem 268 bp BamHI-Clal-Fragment (Nucleotide -274 bis -541) der 5'-Region des **PHO5**-Gens enthalten und wird als UAS1(**PHO5**) bezeichnet, während eine UAS-Region in der Nachbarschaft von Nucleotid -245 in dem 100 bp Clal-BstEII-Fragment (Nucleotide -174 bis -273) der 5'-Region des **PHO5**-Gens enthalten ist und als UAS2(**PHO5**) bezeichnet wird.

Die Erfindung betrifft vor allem die Upstream-Aktivierungs-Sequenzen UAS1(**PHO5**) und UAS2(**PHO5**), die in dem BamHI-BstEII-Fragment zwischen den Nucleotiden -174 und -541 des **PHO5**-Gens enthalten sind.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Upstream-Aktivierungs-Sequenz UAS1(**PHO5**), die in dem BamHI-Clal-Fragment zwischen den Nucleotiden -274 bis -541 des **PHO5**-Gens enthalten ist, und die Upstream-Aktivierungs-Sequenz UAS2(**PHO5**), die in dem Clal-BstEII-Fragment zwischen den Nucleotiden -174 bis -273 des **PHO5**-Gens enthalten ist.

Besonders bevorzugt wird die Upstream-Aktivierungs-Sequenz UAS 1(**PHO5**). Die genaue Lage des UAS 1-Regulatorsignals innerhalb des BamHI-Clal-Fragmentes konnte bestimmt werden. Danach ist das UAS 1-Regulatorsignal in einem 31 bp DNS-Fragment (Position –381 bis –351) der **PHO5**-Promotor-Region enthalten. Vorzugsweise ist das Fragment auf beiden Seiten mit stumpfenden Linkern, die geeignete Restriktionsstellen enthalten, oder mit abgestuften Enden versehen, die spezifisch für eine Restriktions-Endonuclease wie EcoRI sind. Das 31 bp Fragment hat die folgende Sequenz:

GAAATATATAATTAAATTAGCACGTTTCGCA
CTTATATATAATTAAATCGTGCAGAAGCGT

Das Verfahren zur Herstellung von die UAS 1(**PHO5**) und/oder UAS 2(**PHO5**)-Sequenzen enthaltenden DNS-Fragmenten besteht in der Spaltung einer das **PHO5**-Gen, das **PHO Gen** oder den 5' Terminalteil davon enthaltenden DNS mit geeigneten Restriktions-Endonucleasen und der Isolierung der verlangten Fragmente. Zum Beispiel wird das 623 bp BamHI-Fragment von **PHO5** (supra), einschließlich des **PHO5**-Promotors und eines Teiles der **PHO5**-Codierungsregion, mit den Restriktions-Endonucleasen BamHI und BstEII digeriert, und das resultierende, beide Upstream-Aktivierungsstellen enthaltende 368 bp Subfragment wird isoliert. In analoger Weise ergibt die Spaltung des obigen BamHI-Sall-Fragmentes mit BamHI und Clal, oder mit Clal und BstEII des 268 bp BamHI-Clal-Subfragment, das UAS 1(**PHO5**) enthält, bzw. das 100 bp Clal-BstEII-Subfragment, das UAS 2(**PHO5**) enthält. Die Isolierung und Reinigung der Fragmente und Subfragmente wird durch herkömmliche Maßnahmen vorgenommen, z.B. durch Agarosegel-Elektrophorese oder Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

Die die erfindungsgemäßen Upstream-Aktivierungsstellen enthaltenden DNS-Fragmente können in einer an sich bekannten Art verkürzt werden, z. B. durch partielle Digestion mit einer Exonuclease, beispielsweise Bal31, in einer solchen Weise, daß die UAS-Funktion in dem verkürzten Fragment erhalten bleibt. Die Verkürzung kann an dem 5'-Ende oder an dem 3'-Ende der Fragmente oder an beiden Seiten vorgenommen werden. Die Selektion derjenigen Subfragmente, in denen die UAS-Funktion erhalten geblieben ist, erfolgt wie oben, und zwar durch Ersetzen der ursprünglichen, die UAS(n) enthaltenden Sequenzen durch die verkürzten Fragmente und Testen der resultierenden **PHO5**-Promotor-Deletions-Mutanten hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Expression des **PHO5**-Strukturgens auszulösen. Die erfindungsgemäßen Fragmente und die verkürzten Derivate davon, die eine oder beide der Upstream-Aktivierungsstellen des **PHO5**-Gens enthalten, können mit synthetischen Linker-Sequenzen, die an beide Enden angefügt werden, versehen werden, um die Konstruktion von Hybridpromotoren und die Anfügung an einen Vector zu erleichtern.

Die DNS-Fragmente sowie die verkürzten Derivate davon, die die Upstream-Aktivierungsstelle(n) von **PHO5** enthalten, können auch durch chemische DNS-Synthese unter Anwendung herkömmlicher Techniken, die im Fachgebiet allgemein bekannt sind, erzeugt werden. Entsprechende Techniken sind von S.A. Narang [Tetrahedron 39, 3 [1983]] zusammengestellt worden. Es können vor allem die in EU-PA Nr. 146.785 beschriebenen Verfahren angewandt werden, die hier unter Bezugnahme einbezogen sind.

Weitere erfindungsgemäße Aspekte betreffen die Anwendung der Upstream-Aktivierungsstellen des **PHO5**-Gens für die Erzeugung von Hybridpromotoren und Hybridpromotoren, die Upstream-Aktivierungsstellen des **PHO5**-Gens aufweisen. Die Erfindung ist speziell auf Hefehybridpromotoren gerichtet, einschließlich eines, vor allem bestehend aus einem, 5'-Upstream-Promotorelement mit Upstream-Aktivierungsstelle(n) des Hefegens **PHO5**, und eines (einem) 3'-Downstream-Promotorelement eines anderen Hefegens als dem Hefegen **PHO5**, das Transcription-Initiierungsstellen aufweist, die eine funktionelle TATA-Box enthalten und dicht am Translations-Start-Codon enden.

Bei dem 5'-Upstream-Promotorelement handelt es sich vor allem um eines der oben spezifizierten DNS-Fragmente, besonders um die 368 bp BamHI-BstEII-Fragmente, die UAS 1(**PHO5**) und UAS 2(**PHO5**) enthalten, oder das 268 bp BamHI-CII-Fragment, das UAS 1(**PHO5**) enthält, oder verkürzte Derivate davon, in denen die UAS Funktion erhalten geblieben ist, wie das 31 bp Fragment, das UAS 1(**PHO5**) enthält, oder noch kleinere Subfragmente davon.

Das 3'-Downstream-Promotorelement ist vorzugsweise von dem Promotor eines stark verwirklichten Hefegens abgeleitet, speziell von dem Promotor eines für ein glycolytisches Enzym codierenden Hefegens, wie dem Promotor des Enolase-Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase- (**GAPDH**), 3-Phosphoglycerokinase- (**PGK**), Hexokinase-, Pyruvatdecarboxylase-, Phosphofructokinase-, Glucose-6-phosphat-isomerase-, 3-Phosphoglyceratmutase-, Pyruvakinase- (**Pyk**), Triosephosphat-isomerase-, Phosphoglucose-isomerase- und Glucokinase-Gens. Die 3'-Promotorelemente enthalten die TATA-Box, die bei der Positionierung der Enzym-DNS-Polymerase II zur korrekten Transcription-Initiierung und der richtigen Startpunkte der Transcription (Haupt-mRNS-Startpunkte) eine Rolle spielt. Unterhalb (downstream) der TATA-Box erstreckt sich das 3'-Promotorelement in die Region zwischen dem Haupt-mRNS-Start- und dem Translations-Startcodon (ATG), vorzugsweise bis dicht an das Translations-Startcodon. An der Upstream-Seite der TATA-Box enthalten die 3'-Promotorelemente annähernd 50 bis 150 Original-Basenpaare. Die genaue Länge dieser Upstream-DNS-Sequenz ist nicht kritisch, weil eine gewisse Flexibilität in den Abständen zwischen des UASn und der TATA-Box vorhanden zusein scheint.

Das bevorzugte erfindungsgemäße 3'-Promotorelement ist von dem **GAPDH**-Promotor abgeleitet, von dem bekannt ist, daß einer der stärksten, im Fachgebiet bekannten Hefepromotoren ist. (Das Enzym **GAPDH** kann bis zu 5% der Trockenmasse von **S. cerevisiae** erreichen, siehe E. G. Krebs, J. Biol. Chem. 200, 471 [1953]). Vorzugsweise beginnt das 3'-**GAPDH**-Promotorelement an Nukleotid –300 bis –180 und endet an Nukleotid –1 des **GAPDH**-Gens. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfaßt das 3'-Promotorelement die Nukleotide –199 bis –1 des **GAPDH**-Gens. In einem anderen bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsbeispiel umfaßt das 3'-Promotorelement die Nukleotide –263 bis –1 des **GAPDH**-Gens. Die erfindungsgemäßen Hybridpromotoren können ein einziges UAS(**PHO5**) oder mehrere UAS(**PHO5**) des gleichen Typs enthalten, wie UAS 1(**PHO5**), die vorzugsweise in Kopf-Schwanz-Orientierung angeordnet sind. Hinsichtlich des 3'-Promotorelementes kann (können) die UAS(n) die gleiche oder die umgekehrte Orientierung im Verhältnis zur Orientierung des ursprünglichen **PHO5**-Promotors aufweisen.

Die Bestandteile der erfindungsgemäßen Hybridpromotoren, und zwar des Promotorelements, das UAS(n) von **PHO5** enthält, und des in TATA-Box enthaltenden Promotorelements, sind durch synthetische Linker, durch stumpfende Ligation oder, wenn möglich, durch natürlich vorkommende verträgliche Restriktionsstellen verknüpft. Die 5'- und 3'-Enden der erfindungsgemäßen Hybridpromotoren sind vorzugsweise mit synthetischen Linkern versehen, die die Ligation an eine Vector-DNS und, am 3'-Ende, die Anfügung an eine heterologe Protein-Codierungsregion ermöglichen.

Die erfindungsgemäßen Hybridpromotoren erfüllen alle Bedingungen, die an Promotoren, die in der Biotechnologie angewandt werden können, gestellt werden. Sie sind stark, induzierbar durch Substanzen, die sich von den essentiellen Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen des Nährsubstrates unterscheiden und werden herkömmlich im Laboratoriums- und Industriemaßstab benutzt.

Die Erfindung betrifft auch das Verfahren zur Herstellung von Hybridpromotoren, die ein 5'-Upstream-Promotorelement mit Upstream-Aktivierungsstelle(n) des Hefegens **PHO5** und ein 3'-Downstream-Promotorelement eines anderen Hefegens als dem Hefegen **PHO5** enthalten, das Transcriptions-Initiierungsstellen einschließlich einer funktionellen TATA-Box aufweist und dicht an dem Translations-Startcodon endet, wobei die Methode darin besteht, daß ein 5'-Upstream-Promotorelement, das Upstream-Aktivierungsstelle(n) des Hefegens **PHO5** enthält, an ein 3'-Downstream-Promotorelement von einem anderen Hefegen als dem **PHO5**-Gen, das eine funktionelle TATA-Box enthält und dicht am Translations-Startcodon endet, verknüpft wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Ligation der Promotorelemente durch synthetische Linker. Die oben genannten Downstream-Promotorelemente von einem anderen Hefegen als dem **PHO5**-Gen werden durch partielle Digestion des 5'-Endes eines starken Hefepromotors, zum Beispiel eines der oben genannten, der sich zu der Region zwischen dem Haupt-mRNS-Start- und dem Translations-Starcodon erstreckt, mit einer Exonuclease, zum Beispiel Bal31, und durch Anfügung der resultierenden 5'-Stumpfenden an eine synthetische Linker-DNS hergestellt. Es werden Promotorelemente ausgewählt, die die Transcriptions-Startstelle(n) und die TATA-Box, die etwa 50 bis 150 Basenpaare der Sequenzen 5' bis zur TATA-Box aufweisen, beibehalten. Die Selektion wird beispielsweise durch Spaltung der resultierenden Promotorelemente mit der Restriktionsendonuclease, die die synthetische Linkersequenz an dem 5'-Ende erkennt, und mit der Restriktions-Endonuclease, die die synthetische Linker-Sequenz an dem 3'-Ende des Promotorelementes erkennt, und Bestimmung der Länge des resultierenden DNS-Fragmentes mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese vorgenommen. Die 3'-Promotorelemente können auch durch chemische Synthese unter Anwendung von im Fachgebiet allgemein bekannter Methoden erzeugt werden. Die erfindungsgemäßen Hybridpromotoren können für die verstärkte und regulierte Expression von Säugetier-Genen in Hefe verwendet werden.

2. Hybridvectorer, die ein heterologes Polypeptid unter der Kontrolle von Hybridpromotoren codierendes Gen enthalten

Die Erfindung betrifft auch Hefe-Hybridvectoren, die einen oder mehrere DNS-Inserts enthalten, von denen jeder ein DNS-Segment aufweist, das für ein zu Hefe heterologes Polypeptid unter der Transcriptionskontrolle eines Hybridpromotors codiert, der aus einem 5'-Upstream-Promotorelement mit UAS(n) des Hefegens **PHO5** und einem 3'-Downstream-Promotorelement von einem anderen Hefegen als dem **PHO5**-Gen besteht, das Transcriptions-Initiierungsstellen, einschließlich einer funktionellen TATA-Box aufweist.

Die erfindungsgemäßen Hybridvectoren werden aus der aus einem Hybridplasmid und einem linearen DNS-Vector bestehenden Gruppe ausgewählt.

Bei einem DNS-Segment, das für ein zu Hefe heterologes Polypeptid codiert, handelt es sich um eine DNS (Gen), die für eine große Vielzahl von Polypeptiden, einschließlich glycosylierter Polypeptide, codiert, vor allem höhere eukaryotische, speziell von Säugetieren abgeleitete, z.B. tierischer Herkunft oder speziell vom Menschen stammend, wie Enzyme, die beispielsweise für die Herstellung von Nährstoffen und für die Durchführung enzymatischer Reaktionen in der Chemie eingesetzt werden können, oder nicht-enzymatische Polypeptide, die für die Behandlung von Human- und Tiererkrankungen oder für deren Verhütung nützlich und wertvoll sind, zum Beispiel Hormone, Polypeptide mit immunomodulatorischen, Antivirus- und Anti-Tumor-Eigenschaften, Antikörper, Virus-Antigene, Vaccine, Gerinnungsfaktoren, Nährmittel und dergleichen.

Beispiele für derartige Polypeptide sind Insulin, Wachstumsfaktoren, wie epidermaler, insulin-artiger, Mastzellen-, Nerven- oder Transformations-Wachstumsfaktor, Wachstumshormone wie Human- oder Rinder-Wachstumshormone, Interleukin, wie Interleukin-1 oder -2, Human-Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktor (MIF), Interferone wie Human- α -Interferon, zum Beispiel Interferon- α A, α B, α D oder α F, β -Interferon, γ -Interferon oder ein Hybrid-Interferon, zum Beispiel ein α A- α D- oder ein α B- α D-Hybrid-Interferon, Hepatitisvirus-Antigene wie Hepatitis-B-Virus-Oberflächen- oder -Kern-Antigen oder Hepatitis-A-Virus-Antigen, Plasminogen-Aktivatoren, wie Gewebe-Plasminogen-Aktivator, oder Urokinase, Tumor-Necrose-Faktor, Somatostatin, Renin, β -Endorphin, Immunoglobuline, wie leichten und/oder schweren Ketten von Immunoglobulin D, E oder G, Immunoglobulin-Bindungsfaktoren, wie Immunoglobulin-E-Bindungsfaktor, Calcitonin, calcitonin-verwandtes Human-Peptid, Blutgerinnungsfaktoren, wie Faktor IX oder VIII c, Eglin, wie Eglin C, Desulphatohirudin, wie Desulphatohirudin-Variante HV1, HV2 oder PA, oder Human-Superoxiddismutase. Bevorzugte Gene sind diejenigen, die für ein Human- α -Interferon oder Hybrid-Interferon, Human-Gewebe-Plasminogen-Aktivator (t-PA), Hepatitis-B-Virus-Oberflächen-Antigen (HBVsAg), insulinartigen Wachstumsfaktor I, Eglin C und Desulphatohirudin-Variante HV1 codieren.

Der Hybridpromotor ist vor allem einer der oben spezifizierten.

Die erfindungsgemäßen Hybridvectoren können einen oder mehrere DNS-Insert(s) enthalten, von denen jeder unter anderem den Hybridpromotor und ein DNS-Segment aufweist, das für ein zu Hefe heterologes Polypeptid codiert. Wenn die Hybridvectoren mehrere DNS-Inserts, vorzugsweise 2 bis 4 DNS-Inserts, enthalten, dann können diese in einer Tandemanordnung oder an verschiedenen Stellen des Hybridvectors vorhanden sein. Bevorzugte Hybridvectoren enthalten einen DNS-Insert oder DNS-Inserts in einer Tandemanordnung.

In den erfindungsgemäßen Hybridvectoren ist der Hefehybridpromotor operierbar mit der Polypeptid-Codierungsregion verknüpft, um eine effektive Expression des Polypeptids zu gewährleisten. In einem bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsbeispiel ist der Hefehybridpromotor direkt mit der Codierungsregion des ausgereiften Polypeptids mit einem an der Verbindungsstelle eingesetzten Translationsstartsignal (ATG) verknüpft. Eine bevorzugte Region für die Vereinigung des Hefehybridpromotors mit der Polypeptidcodierungsregion ist die dem endogenen ATG unmittelbar benachbarte Region.

Bei einer anderen bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform ist eine Signalsequenz in der Konstruktion enthalten.

Geeignete Signalsequenzen sind beispielsweise die **PHO5**-Signalsequenz, die des Hefe-Invertase-Gens oder die α -pre-pro-Sequenz und Signalsequenzen, die natürlich mit der zu verwirklichen Polypeptidcodierungsregion verknüpft sind. Alternativ können verschmolzene Signalsequenzen konstruiert werden. Es werden diejenigen Kombinationen bevorzugt, die eine exakte Spaltung zwischen der Signalsequenz und der ausgereiften Polypeptid-Sequenz ermöglichen. Zusätzliche Sequenzen, wie Pro- oder Spacer-Sequenzen, die spezifische Verarbeitungssignale tragen können oder nicht, können gleichfalls in die Konstruktion zur Erleichterung der einwandfreien Verarbeitung von Vorläufermolekülen einbezogen werden. Alternativ können verschmolzene Proteine erzeugt werden, die interne Verarbeitungssignale enthalten, die eine angemessene Ausreifung *in vivo* oder *in vitro* gestatten. Vorzugsweise enthalten die Verarbeitungssignale einen Lys-Arg-Rest, der durch eine in der Sekretionsbahn liegende Hefeendopeptidase erkannt wird.

Nach der Expression des Gens gelangt das Genprodukt in die Sekretionsbahn und wird in den periplasmatischen Raum transportiert. Wenn eine weitere Exkretion durch die Zellwand in das Nährsubstrat erreicht werden kann, müßte eine beträchtliche Erhöhung der Ausbeutung möglich werden. Auch der Gewinnungsprozeß kann ohne Zerstörung von Zellen vereinfacht werden. Außerdem kann das Polypeptid ohne ein zusätzliches Methionin an dem N-Terminus gewonnen werden, weil kein ATG als Translations-Startsignal vor der ausgereiften Codierungssequenz erforderlich ist. Da die Glycosylierung mit der Sekretionsbahn in Beziehung steht, ist zu erwarten, daß das erzeugte Polypeptid glycosyliert wird (vorausgesetzt, daß Glycosylierungsstellen vorhanden sind). Es gibt verschiedene Merkmale, durch die glycosyierte Polypeptide gegenüber unglycosylierten Polypeptiden den Vorteil haben: die glycosyierte Polypeptide ähneln dem echten Polypeptid von Säugetierzellen mehr als es bei unglycosyliertem Polypeptid der Fall ist. Des weiteren ist die tertiäre Struktur solcher Proteine wahrscheinlich bis zu einem gewissen Grade von der Gegenwart von Glycosylresten abhängig.

Man nimmt an, daß in diesen Molekülen vorhandene Kohlenhydratreste einen günstigen Einfluß auf die chemische Beständigkeit und die pharmakologische Aktivität haben.

Vorzugsweise weisen die erfindungsgemäßen Hybridvectoren auch die 3'-Flankierungssequenz eines Hefegens auf, das die eindeutigen Signale für die Transcriptionstermination und Polyadenylation enthält. Die bevorzugte 3'-Flankierungssequenz ist die des Hefegens PHO5.

Die Erfindung betrifft speziell ein lineares DNS-Molekül, das im wesentlichen aus einem Hybridvector, der aus einem 5'-Upstream-Promotorelement mit UAS(n) des Hefegens PHO5 und einem 3'-Downstream-Promotorelement von einem anderen Hefegen als dem PHO5-Gen besteht, das Transcriptions-Initierungsstellen, einschließlich einer funktionellen TATA-Box aufweist, ein DNS-Segment, das für ein zu Hefe heterologes Polypeptid codiert, wobei das Segment durch den Hybridpromotor kontrolliert wird, und ein DNS-Segment, das die richtig angeordneten Transcriptions-Terminationssignale des Hefegens PHO5 enthält.

Aufgrund der homologen 3'- und 5'-Flankierungssequenzen ist der gesamte lineare DNS-Vector, einschließlich der Polypeptid-Codierungsregion, an der PHO5-Stelle fest in das Hefechromosom integriert.

Die Erfindung betrifft vor allem kreisförmige Hybridplasmide, die außer dem Hybridpromotor, der Polypeptid-Codierungsregion und den 3'-Flankierungssequenzen zusätzlich DNS-Sequenz(en) enthält, die unwesentlich oder weniger wichtig für die Funktion des Promotors sind, d. h. für die Expression der Polypeptidcodierungsregion, die aber wichtige Funktionen erfüllen können, zum Beispiel bei der Vermehrung der mit den Hybridvectoren transformierten Hefezellen. Die zusätzliche(n) DNS-Sequenz(en) können von prokaryotischen und/oder eukaryotischen Zellen abgeleitet sein und können chromosome und/oder extra-chromosome DNS-Sequenzen enthalten. Zum Beispiel können die zusätzlichen DNS-Sequenzen von Plasmid-DNS stammen (oder daraus bestehen), wie bakterieller oder eukaryotischer Plasmid-DNS, Virus-DNS und/oder Chromosomen-DNS, wie bakterieller, Hefe- oder höherer eukaryotischer Chromosomen-DNS. Bevorzugte Hybridplasmide enthalten zusätzliche DNS-Sequenzen, die von Bakterienplasmiden, vor allen *Escherichia coli* Plasmid pBR322 oder verwandten Plasmiden, Bakteriophage λ, Hefe 2 μ -Plasmid und/oder Hefechromosomen-DNS abgeleitet sind.

Die zusätzlichen DNS-Sequenzen tragen insbesondere einen Hefe-Replikations-Ursprung und einen selektiven generischen Markierer für Hefe. Hybridplasmide, die einen Hefe-Replikations-Ursprung, z. B. ein chromosome autonom replizierendes Segment (ars) tragen, werden nach der Transformation extrachromosomal innerhalb der Hefezelle gehalten und werden nach Mitose autonom repliziert. Hybridplasmide, die zu Hefe 2 μ -Plasmid-DNS homologe Sequenzen enthalten, können ebenfalls verwendet werden. Diese Hybridplasmide werden durch Rekombination in bereits innerhalb der Zelle vorhandene 2 μ -Plasmide integriert werden oder autonom replizieren. 2 μ -Sequenzen sind besonders für Hochleistungs-Transformations-Plasmide geeignet und führen zu hoher Kopieanzahl.

Als der selektive Gen-Markierer für Hefe kann jedes Markierer-Gen verwendet werden, das die Selektion für Transformanten infolge der phenotypischen Expression des Markierers vereinfacht. Geeignete Markierer für Hefe sind vor allem diejenigen, die antibiotische Resistenz verwirklichen, oder im Falle auxotroper Hefemutanten Gene, die Wirtslesionen ergänzen.

Entsprechende Gene verleihen zum Beispiel Resistenz gegenüber dem antibiotischen Cycloheximid oder schaffen Prototrophie in einem auxotrophen Hefemutanten dem URA3, LEU2, HIS3 oder TRP1-Gen. Es ist auch möglich, Strukturgene als Markierer zu verwenden, die mit einem autonom replizierenden Segment assoziiert sind, vorausgesetzt, daß der zu transformierende Wirt für das durch den Markierer zu verwirklichende Produkt auxotroph ist.

Es ist vorteilhaft, daß die zusätzlichen, in den erfindungsgemäßen Hybridplasmiden vorhandenen DNS-Sequenzen auch einen Replikations-Ursprung und einen selektiven genetischen Markierer für einen Bakterienwirt, vor allem *Escherichia coli*, enthalten. Es gibt nützliche Merkmale, die mit dem Vorhandensein eines *E. coli* Replikationsursprungs und eines *E. coli* Markierers in einem Hefeybridvector zusammenhängen: Erstens können große Mengen Hybridvector-DNS durch Züchtung und Vermehrung in *E. coli* gewonnen werden, und zweitens wird die Konstruktion von Hybridvectoren meist in *E. coli* unter Anwendung des gesamten Repertoires von auf *E. coli* basierender Clonierungstechnologie vorgenommen. *E. coli*-Plasmide, wie pBR322 und dergleichen, enthalten sowohl den *E. coli*-Replikationsursprung als auch generische *E. coli* Markierer, die Resistenz gegenüber Antibiotika, zum Beispiel Tetracyclin und Ampicillin, verleihen und vorteilhaft als Teil der Hefehybridvectoren verwendet werden.

Die zusätzliche DNS-Sequenz, die beispielsweise Replikationsursprung und genetische Markierer für Hefe und einen Bakterienwirt (siehe oben) enthält, wird anschließend als „Vector-DNS“ bezeichnet, die zusammen mit dem Hefepromotor und der Polypeptid-Codierungsregion ein erfindungsgemäßes Hybridplasmid bildet.

In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Hybridplasmide, die die Fähigkeit zur Replikation und phenotypischen Selektion in einem Hefewirtsstamm haben, der einen Hefehybridpromotor und eine ein heterologes Polypeptid codierende DNS-Sequenz aufweist, wobei die DNS-Sequenz zusammen mit dem Transcriptions-Start- und -Terminationssignalen sowie Translations-Start- und -Stoppsignalen in dem Hybridplasmid unter Kontrolle des Hybridpromotors so angeordnet ist, daß ihre Expression in einem transformierten Hefestamm zur Erzeugung des Polypeptids erfolgt.

Die erfindungsgemäßen Hybridvectoren werden nach im Fachgebiet bekannten Methoden hergestellt, zum Beispiel durch Verknüpfen eines Hybridpromotors, der aus einem 5'-Upstream-Promotorelement mit UAS(n) des Hefegens PHO5 und einem 3'-Downstream-Promotorelement von einem anderen Hefegen als dem PHO5-Gen, das Transcriptions-Initierungsstellen, einschließlich einer funktionellen TATA-Box aufweist, besteht, eines DNS-Segments, daß für zu Hefe heterologem Polypeptid und 3'-Flankierungssequenzen eines Hefegens codiert, so daß das DNS-Segment unter Transcriptionskontrolle des Hybridpromotors steht, und wahlweise Einbau einer oder mehrerer erzeugter linearer DNSn in eine Vector-DNS.

Zweckmäßig verzeichnete, lineare oder vorzugsweise kreisförmige Vector-DNS, zum Beispiel Bakterien-Plasmid-DNS oder dergleichen (siehe oben) mit mindestens einer Restriktionsstelle, vorzugsweise zwei oder mehr Restriktionsstellen, kann verwendet werden. Es ist vorteilhaft, wenn die Vector-DNS bereits Replikationsursprünge und Genmarkierer für Hefe und/oder einen Bakterienwirt enthält. Die Vector-DNS wird unter Verwendung einer entsprechenden Restriktionsendonuclease gespalten. Die eingeschränkte DNS wird an das lineare DNS-Fragment, das unter anderem den Hefehybridpromotor enthält, und an das für das Polypeptid codierende DNS-Fragment ligiert. Vor oder nach der Verknüpfung des Hybridpromotors und der Polypeptid-Codierungsregion (oder ebenso gleichzeitig) ist es auch möglich, Replikationsursprünge und/oder Markierer für Hefe oder einen Bakterienwirt einzubauen. In allen Fällen sind die Restriktions- und Wärmebedingungen in einer solchen Weise zu wählen, daß keine Beeinträchtigung der wesentlichen Funktionen der Vector-DNS und des Hybridpromotors erfolgen kann. Der Hybridvector kann sequenziell oder durch Ligation von zwei DNS-Segmenten, die alle in Frage kommenden Sequenzen aufweisen, aufgebaut werden.

Es können verschiedene Techniken für die Vereinigung von DNS-Segmenten *in vitro* angewandt werden. Durch bestimmte Restriktionsendonucleasen erzeugte stumpfe Enden (vollständig basengepaarte DNS-Duplexe) können direkt mit T4-DNS-Ligase ligiert werden. Üblicher ist es, DNS-Segmente durch ihre einsträngigen kohäsiven Enden zu verknüpfen und durch eine DNS-Ligase kovalent zu schließen, z.B. durch T4-DNS-Ligase. Solche einsträngigen „kohäsiven Enden“ können durch Spaltung von DNS mit einer anderen Klasse von Endonucleasen, die abgestufte Enden erzeugen, gebildet werden (die beiden Strände von dem DNS-Duplex werden an verschiedenen Stellen in einem Abstand von wenigen Nucleotiden gespalten). Einzelne Strände können auch durch die Addition von Nucleotiden an stumpfe Enden oder abgestufte Enden unter Verwendung von Terminal-Transferase gebildet werden („homopolymeres Tailing“ [Verlängerung]) oder einfach durch Zurückziehen eines Stranges eines stumpfendenden DNS-Segmentes mit einer geeigneten Exonuclease wie λ -Exonuclease. Eine weitere bevorzugte Möglichkeit für die Erzeugung von abgestuften Enden besteht in der Ligation einer chemisch synthetisierten Linker-DNS, die eine Erkennungsstelle für ein Endonuclease bildendes, abgestuftes Ende enthält, an stumpfendende DNS-Segmente, und der Digestion der resultierenden DNS mit der betreffenden Endonuclease.

Damit eine wirksame Expression erfolgen kann, muß das Gen einwandfrei in bezug auf Sequenzen, die Transcriptions- (Hefehybridpromotor) und Translationsfunktionen enthalten, angeordnet sein. Erstens muß die Ligation des den Hybridpromotor aufweisenden DNS-Segmentes mit der Polypeptid-Codierungsregion in der richtigen Orientierung erreicht werden. Wenn zwei Orientierungen möglich sind, wird die richtige durch die herkömmliche Restriktionsanalyse bestimmt. Hybridvectoren, die einen falsch orientierten Polypeptid-Geninsert enthalten, werden durch Ausschneiden des Geninserts mit einer geeigneten Restriktionsendonuclease und erneute Ligation des Gens mit dem Hybridvectorfragment umorientiert. In jedem Fall wird eine falsche Orientierung durch die Ligation von zwei DNS-Fragmenten je mit unterschiedlichen Restriktionsstellen an ihren Enden vermieden. Außerdem sollte die Konstruktion des Hybridvectors in einer solchen Form vorgenommen werden, daß sie die korrekte Transcriptions-Initiierung und -Termination ermöglicht. Hinsichtlich des letzten Punktes sollte das Transcript vorzugsweise in einer DNS-Sequenz enden, die von Hefe-Chromosomen-DNS oder 2μ -Hefeplasmid abgeleitet ist. Am besten endet das Transcript in einer DNS-Sequenz, die Transcriptions-Terminationssignale eines Hefegens enthält, z.B. von PHO5 oder TRP1. Zweitens muß ein einwandfreies Orientierungsschema (reading frame) aufgestellt werden. Normalerweise sind die Nucleotid-Sequenz der Promotorregion und die Polypeptid-Codierungsregion vor der Ligase bekannt, oder sie können leicht bestimmt werden, so daß es keine Schwierigkeiten bei der Aufstellung des richtigen Orientierungsschemas gibt.

Wenn die direkte Expression des ausgereiften Polypeptids verlangt wird, müssen wahlweise der Hybridpromotorregion und/oder wahlweise der Codierungsregion für das ausgereifte Polypeptid vorausgehende Signalsequenzen oder Teile davon eliminiert werden, beispielsweise durch Digestion mit einer Exonuclease, z.B. mit Bal 131. Eine bevorzugte Region für die direkte Verbindung eines Hefepromotors mit der Polypeptid-Codierungsregion liegt zwischen dem Haupt-mRNA-Start- und dem ATG-Translations-Startcodon. Für eine Verbindung in dieser Region sollte die Polypeptid-Codierungssequenz ihr eigenes ATG zur Translationsinitiierung haben, oder sonst muß es mit einem zusätzlichen synthetischen Oligonucleotid versehen werden. Der Hefehybridpromotor kann auch mit Hilfe eines synthetischen Oligodesoxynucleotids als Verbindungsstück mit der Polypeptid-Codierungssequenz verknüpft werden. Daher kann die Hybridpromotorregion, wenn möglich, nach ihres 3'-Terminus so eingeschränkt werden, daß ihr eine vorbestimmte Anzahl von Basenpaaren fehlt. Analog kann die Polypeptid-Codierungssequenz nahe ihrem 5'-Terminus eingeschränkt werden. Ein synthetisches Oligodesoxynucleotid kann dann in einer solchen Weise konstruiert werden, daß die fehlenden Basenpaare bei der Vereinigung des Hefehybridpromotors und der Polypeptid-Codierungssequenz über das verbindende Oligodesoxynucleotid einschließlich eines ATG-Translations-Initiierungssignals wieder hergestellt werden und die Polypeptid-Codierungssequenz sich in bezug auf den Promotor in dem richtigen Orientierungsschema befindet.

Das den erwünschten Hybridvector enthaltende Ligationsgemisch wird in dem Transformationsschritt direkt verwendet oder vorher für den Hybridvector, z.B. durch Gel-Elektrophorese, angereichert und dann für die Transformation verwendet. Zwischenprodukte, wie Vectoren, denen noch eine oder mehrere wesentliche Funktionen fehlen, sowie die endgültigen erfindungsgemäßen Hybridvectoren werden wahlweise in einen Bakterienwirt, speziell *E. coli*, aus den oben genannten Gründen transformiert (z.B. Produktion von großen Mengen von Zwischenprodukten bzw. Hybridplasmiden). Bakterienvectoren, wie das *E. coli* Plasmid pBR322, und diejenigen Fragmente davon, die einen Bakterien-Replikations-Ursprung und Genmarkierer enthalten, sind die aus diesem Grund am meisten bevorzugten Vectoren. Bei der Verwendung eines solchen Bakterienvectors umfassen die letzten Schritte für die Herstellung der Hefehybridvectoren vorzugsweise auch den Einbau eines genetischen Markierers und eines Replikationsursprungs für Hefe.

3. Transformation von Hefe mit Hybridvectoren, die eine Polypeptid-Codierungssequenz enthalten

Ein anderer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von transformierten Hefezellen, die ein zu Hefe heterologes Polypeptid erzeugen können, wobei das Verfahren in der Transformation von Hefezellen mit einem Hybridvector besteht, der einen oder mehrere DNS-Inserts mit je einem DNS-Segment enthält, das für ein zu Hefe heterologes Polypeptid unter der Transcriptionskontrolle eines Hybridpromotors codiert, der aus einem 5'-Upstream-Promotorelement mit UAS(n) von dem Hefegen PHO5 und einem 3'-Downstream-Promotorelement von einem anderen Hefegen als dem PHO5-Gen, das Transcriptions-Initiierungsstellen, einschließlich einer funktionellen TATA-Box aufweist, besteht.

Nützliche Hefen umfassen Spezies der Gattung *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* und verwandter Gattungen (siehe J. Lodder, „The Yeasts“ [Die Hefen], Amsterdam 1971), speziell Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*.

Die Transformation von Hefe mit Hybridvectoren kann nach im Fachgebiet bekannten Verfahren vorgenommen werden, z.B. nach der von Hinnen, u.a., (Proc. Natl. Acad. Sci USA 75, 1929 [1978]) beschriebenen Methode. Diese Methode kann in drei Schritte unterteilt werden:

- (1) Entfernung der Hefezellenwand oder von Teilen davon
- (2) Behandlung der „nackten“ Hefezellen (Spheroplasten) mit der transformierenden DNS in Gegenwart von PEG (Polyethyenglycol) und Ca^{+2} -Ionen.
- (3) Regeneration der Zellwand und Selektion der transformierten Zellen in einer festen Agar-Schicht.

Bevorzugte Methoden:

Zu (1): Die Hefezellwand wird enzymatisch unter Anwendung verschiedener Präparate von Glucosidasen wie Schneckendarmsäfte (z.B. Glusulase® oder Helicase®) oder Enzymmischungen, die von Mikroorganismen (z.B. Zymolyase®) in osmotisch stabilisierten Lösungen (z.B. 1 M Sorbitol) gewonnen werden.

Zu (2): Die Hefephosphoplaste ballen sich in Gegenwart von PEG zusammen, und es werden örtliche Fusionen der cytoplasmatischen Membranen ausgelöst. Die Erzeugung von „fusions-artigen“ Bedingungen ist kritisch, und viele transformierte Hefezellen werden im Laufe des Transformationsprozesses diploid oder sogar triploid. Verfahren, die eine Selektion von verschmolzenen Spheroplasten ermöglichen, können zur Anreicherung von Transformanten angewandt werden, d.h. transformierte Zellen können leicht aus vorselektierten Fusionsprodukten ausgesiebt werden.

Zu (3): Da sich Hefezellen ohne Zellwand nicht teilen, muß die Zellwand regeneriert werden. Diese Regeneration erfolgt am besten durch Einbetten der Spheroplaste in Agar. Zum Beispiel wird geschmolzenes Agar (etwa 50°C) mit den Spheroplasten vermischt. Nach dem Abkühlen der Lösung auf Hefewachstumstemperaturen (etwa 30°C) wird eine feste Schicht gewonnen. Diese Agarschicht dient zur Verhinderung von schneller Diffusion und Verlust von wichtigen Makromolekülen aus den Spheroplasten und erleichtert dadurch die Regeneration der Zellwand. Die Zellwandregeneration kann aber auch dadurch erzielt werden (wenn auch mit einem geringeren Wirkungsgrad), daß die Spheroplaste auf die Oberfläche von vorgeformten Agarschichten aufgestrichen werden.

Das Regenerations-Agar wird vorzugsweise in einer Weise hergestellt, durch die die gleichzeitige Regeneration und Selektion transformierter Zellen möglich ist. Da Hefegene, die für Enzyme von biosynthetischen Aminosäuren codieren, allgemein als selektive Markierer (supra) verwendet werden, wird die Regeneration vorzugsweise in minimalem Hefe-Medium-Agar ausgeführt. Wenn sehr hohe Wirkungsgrade der Regeneration verlangt werden, dann ist ein Zwei-Stufen-Verfahren vorteilhaft: (1) Regeneration der Zellwand in einem reichen komplexen Medium, und (2) Selektion der transformierten Zellen durch wiederholtes Aufstreichen der Zellschicht auf selektive Agarplatten.

Wenn der Hybridvector keinerlei Markierer-Gen enthält, können die transformierten Zellen auch mit Hilfe alternativer Methoden identifiziert werden. Solche Methoden umfassen zum Beispiel die *in situ* Hybridisierung mit einem markierten DNS-Fragment, das Sequenzen des Hybridvectors homolog ist (z.B. nach Hinnen, u.a., supra), *in situ* Immunoanalysen, vorausgesetzt, daß ein Antikörper für das Produkt des eingeführten Gens vorhanden ist, oder andere Screening-Methoden, bei denen die durch die transformierenden Plasmide codierten Genprodukte gemessen werden.

Alternativ kann die Hefe mit einem erfindungsgemäßen Hybridvector und einem zweiten, einen genetischen Markierer für Hefe enthaltenen Vector co-transformiert werden. Wenn die beiden unterschiedlichen Vectoren gemeinsame DNS-Sequenzen haben (es können dies auf den Vectoren vorhandene Bakteriensequenzen sein), dann erfolgt Rekombination, die zu einem verschmolzenen selektierbaren Hybridmolekül führt.

Die Hefe kann auch mit einem linearen DNS-Vector, der aus dem Hefehybridpromotor, der heterologen Polypeptid-Codierungsregion, die durch den Hybridpromotor und die Transcriptions-Terminationssignale des Hefegens **PHO5** kontrolliert wird, und einen selektiven Markierer für Hefe enthält, co-transformiert werden. Durch die Cotransformation kann eine Anreicherung derjenigen Hefezellen erfolgen, die DNS, die nicht direkt selektiert werden kann, aufgenommen haben. Da kompetente Zellen jeden Typ von DNS aufnehmen, wird ein hoher Prozentanteil von mit einem selektiven Vector transformierten Zellen auch jede zusätzliche DNS enthalten (so die obige lineare DNS). Infolge von ausreichend langen homologen Sequenzen (z.B. etwa 20 bis 100 Desoxynucleotide lang) wird das Polypeptid-Gen fest in das Wirtschromosom integriert. Die spezifische erfindungsgemäße Konstruktion wird zu einer festen Integration des heterologen Gens an der Chromosomenstelle des **PHO5**-Gens, und zwar in das Hefe-Chromosom II, führen.

Die gewonnenen, die erfindungsgemäßen Hybridplasmide enthaltenden Hefestämme können bei der Herstellung heterologer Polypeptide durch Mutation und Selektion unter Anwendung von im Fachgebiet bekannten Methoden verbessert werden. Die Mutation kann zum Beispiel durch UV-Bestrahlung oder geeignete chemische Reaktionsmittel zustande gebracht werden. Es wurde gefunden, daß die Transformation mit den erfindungsgemäßen Hybridvectoren und die Regeneration der Zellwände in reichen Medien, die Glucose als Kohlenstoffquelle enthalten, in zweckmäßiger Form erfolgen können und wesentlich einfacher als durch die entsprechenden Schritte, die mit Hybridvectoren ausgeführt werden, die herkömmliche, durch Glucose induzierbare Promotoren enthalten, die in glucose-freien Medien zur Verhinderung der Ansammlung des möglicherweise letalen Genproduktes innerhalb der Zellen vorgenommen werden müssen.

Die Erfindung betrifft auch Hefewirte, die mit Hybridvectoren transformiert wurden, die einen oder mehrere DNS-Inserts aufweisen, von denen jeder ein DNS-Segment, das für ein zu Hefe heterologes Polypeptid unter der Transcriptionskontrolle eines Hybridpromotors codiert, der aus einem 5'-Upstream-Promotorelement mit UAS(n) des Hefegens **PHO5** und einem 3'-Downstream-Promotorelement von einem anderen Hefegen als dem **PHO5**-Gen, das Transcriptions-Initiierungsstellen einschließlich einer funktionellen TATA-Box aufweist, besteht, sowie Mutanten davon.

4. Züchtung der transformierten Hefezellen und Isolierung des verwirklichten Polypeptids

Die Erfindung betrifft des weiteren eine Methode zur Herstellung eines zu Hefe heterologen Polypeptids, die dadurch gekennzeichnet ist, daß ein Hefestamm, der mit einem Hybridvector transformiert wurde, der einen oder mehrere DNS-Inserts enthält, von denen jeder ein DNS-Segment aufweist, das für ein zu Hefe heterologes Polypeptid unter der Transcriptionskontrolle eines Hybridpromotors codiert, der aus einem 5'-Upstream-Promotorelement mit UAS(n) des Hefegens **PHO5** und einem 3'-Downstream-Promotorelement von einem anderen Hefegen als dem **PHO5**-Gen besteht, das Transcriptions-Initiierungsstellen einschließlich einer funktionellen TATA-Box aufweist, oder eine Mutante davon gezüchtet werden und das verwirklichte Polypeptid isoliert wird.

Die erfindungsgemäßen transformierten Hefezellen werden durch im Fachgebiet bekannte Verfahren in einem flüssigen Medium, das assimilierbare Quellen von Kohlenstoff, Stickstoff, anorganischen Salzen, und wenn erforderlich, Wuchsstoffen enthält, gezüchtet.

Verschiedene Kohlenstoffquellen können eingesetzt werden. Beispiele für bevorzugte Kohlenstoffquellen sind assimilierbare Kohlenwasserstoffe wie Glucose, Maltose, Mannitol oder Lactose, oder ein Acetat wie Natriumacetat, die entweder alleine oder in geeigneten Mischungen verwendet werden können. Geeignete Stickstoffquellen umfassen beispielsweise Aminosäuren, wie Casaminosäuren, Peptide und Proteine und deren Abbauprodukte wie Trypton, Pepton oder Fleischextrakte, außerdem Hefeextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser sowie Ammoniumsalze wie Ammoniumsalze wie Ammoniumchlorid, -sulfat, oder nitrat, die entweder alleine oder in geeigneten Mischungen verwendet werden können. Anorganische Salze, die verwendet werden können, umfassen zum Beispiel Sulfate, Chloride, Phosphate und Carbonate von Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium. Außerdem kann das Nährmedium auch noch Wuchsstoffe enthalten. Substanzen, die das Wachstum fördern, umfassen beispielsweise Wachstums promotoren, Spurenelemente wie Eisen, Zink, Mangan und dergleichen, oder einzelne Aminosäuren.

Da die erfindungsgemäßen Hybridpromotoren reguliert sind, muß die Zusammensetzung des Nährmediums den Wachstumsphasen angepaßt werden. Während der Wachstumsperiode werden die erfindungsgemäßen Hybridpromotoren unter hoher Phosphatkonzentration im wesentlichen unterdrückt. Zum Beispiel wird der am meisten bevorzugte erfindungsgemäße Hybridpromotor, der ein 5'-Upstream-Promotorelement von **PHO5** mit den UASn von **PHO5** und ein 3'-Downstream-Promotorelement von **GAPDH** mit der TATA-Box enthält, unter diesen Bedingungen etwa um das Fünfzigfache reduziert. Daher werden potentiell toxische Genprodukte nur mit sehr geringen Geschwindigkeiten synthetisiert und schädliche Einflüsse auf den Zellmetabolismus auf ein Mindestmaß reduziert. Wenn eine ausreichende Zeldichte erreicht ist, werden die Mengen des anorganischen Phosphats in dem Nährmedium vorzugsweise reduziert (schwaches P_i-Medium). Danach werden die erfindungsgemäßen Hybridpromotoren aktiviert (nicht mehr unterdrückt) und maximale Mengen von mRNS-Transkripts gewonnen.

Die Züchtung wird unter Anwendung herkömmlicher Techniken vorgenommen. Die Züchtungsbedingungen wie Temperatur, pH-Wert des Mediums und Fermentationsdauer werden so gewählt, daß maximale Mengen des verlangten Polypeptids erzeugt werden. Im allgemeinen wird die Züchtung unter aeroben Bedingungen in Submerskultur unter Schütteln oder Rühren bei einer Temperatur von etwa 25°C bis 35°C, bei einem zwischen 4 und 8 liegenden pH-Wert, zum Beispiel annähernd bei pH 7, und etwa 4 bis 20 Stunden lang, vorzugsweise bis maximale Mengen des verlangten Proteins erreicht sind, erfolgen.

Die Isolierung und Reinigung des verwirklichten Polypeptids werden, wenn verlangt, nach im Fachgebiet bekannten Methoden durchgeführt.

Nachdem die transformierten Zellen bis zu einer zufriedenstellenden Zeldichte gezüchtet worden sind, besteht der erste Schritt für die Gewinnung des verwirklichten Proteins in der Freisetzung des Proteins aus dem Zellinneren. Bei den meisten Verfahren wird die Zellwand zuerst durch enzymatische Digestion, z.B. mit Glucosidase, entfernt. Anschließend werden die resultierenden Spherozoplasten mit Detergentsien wie Triton behandelt. Alternativ sind auch mechanische Kräfte wie Scherkräfte (zum Beispiel X-Presse, Frensch-Presse) oder Schütteln mit Glasperlen für das Aufbrechen der Zellen geeignet. Das resultierende Gemisch wird hinsichtlich des gewünschten Polypeptids durch herkömmliche Maßnahmen angereichert, z.B. durch Entfernung des größten Teiles von nicht eiweißhaltigem Material durch Behandlung mit Polyethylenimin, Präzipitation der Proteine durch Sättigung der Lösung mit Ammoniumsulfat oder Trichloressigsäure, Gelelektrophorese, Dialyse, Chromatographie, zum Beispiel Ionenaustausch-Chromatographie, Größen-Ausschaltungs-Chromatographie, HPLC oder Umkehrphasen-HPLC, Molekül-Größenklassifizierung auf einer geeigneten Sephadex®-Säule oder dergleichen. Die endgültige Reinigung des vorgereinigten Produktes wird beispielsweise mit Hilfe einer Antikörperaffinitäts-Chromatographie erreicht.

In dem Falle, in dem das verlangte Polypeptid durch die Hefezelle in den periplasmatischen Raum ausgeschieden wird, kann ein vereinfachtes Protokollverfahren angewandt werden: Das Polypeptid kann ohne Zell-Lysis durch enzymatische Entfernung der Zellwand oder durch Behandlung mit chemischen Mitteln, z.B. Thiol-Reagenzien oder EDTA, die zu Zellwandschäden führen, die die Freisetzung des Polypeptids erlauben, gewonnen werden. In dem Falle, in dem das Polypeptid in das Nährsubstrat ausgeschieden wird, kann es direkt daraus gewonnen werden.

Ein Gemisch von gewonnenen, glycosylierten und unglycosylierten Proteinen kann beispielsweise durch Chromatographie auf einer Concanavalin-A Sepharose®-Säule getrennt werden. Unglycosylierte Produkte werden durch die Säule hindurchlaufen, während glycosylierte Produkte sich selektiv adsorbieren und mit Hilfe herkömmlicher Mittel eluiert werden können, z.B. α-Methylmannosid in Kombination mit einem chaotropen Mittel wie KSCN.

Clycosyl-Rückstände können auch enzymatisch entfernt werden, z.B. durch die Wirkung von Endoglycosidase H oder F. Durch diese Methode können unglycoxylierte Produkte in weitgehend reiner Form erzeugt werden.

Die Erfindung betrifft außerdem auch Polypeptide, wenn sie jeweils nach den erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden.

Die Erfindung befaßt sich speziell mit den Upstream-Aktivierungssequenzen von **PHO5**, den Hybridpromotoren, den Hybridvectoren, den transformierten Hefezellen und den Verfahren für deren Herstellung sowie der Methode zur Erzeugung von zu Hefe heterologen Polypeptiden nach der Beschreibung in den Beispielen.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Im folgenden experimentellen Teil werden verschiedene Ausführungsbeispiele der Erfindung unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben, in denen darstellen:

- Fig.: 1 die DNS-Sequenz des BamHI-Sall-Fragmentes oder **PHO5**-Promotorregion,
- Fig. 2: die DNS-Sequenz der Promotorregion von **GAPDH** (Clon 491, siehe G. A. Bitter, u. a., Gene 32 [1984]),
- Fig. 3: schematisch die Erzeugung von Plasmid pGAPDH-EL,
- Fig. 4: 3'-Promotorelemente des erfindungsgemäß verwendeten **GAPDH**-Gens,
- Fig. 5: ein Diagramm, das die Erzeugung von Plasmid pJDB207R/**PHO5**-EGL zeigt,
- Fig. 6: die Konstruktion von Plasmid pJDB 207/PAPEL-EGL(UAS1),
- Fig. 7: ein schematisches Diagramm, das die Isolierung eines für ausgereiftes Desulfatohirudin codierenden DNS-Fragmentes zeigt,
- Fig. 8: schematisch die Herstellung von Plasmid pJDB 207/**PHO5**-HIR,

Fig. 9: schematisch die Konstruktion von Plasmid pJDB207/PHO5(Eco)-HIR,

Fig. 10: ein schematisches Diagramm, das die Konstruktion von Plasmid pJDB207/PAPFL-TPA(UAS 1 + UAS2) zeigt.

Ausführungsbeispiel

Die folgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung, sollen aber nicht als eine Einschränkung derselben betrachtet werden.

Experimenteller Teil**Beispiel 1: Konstruktion von PHO5 Promotor-Deletionen****a) Bal31-Digestion**

Rekombinant-Phage M13mp9/PHO5-Bam-Sal, die das in Fig. 1 gezeigte BamHI-Sall-Fragment von PHO5 enthält, wird als Quelle für den PHO5-Promotor verwendet (siehe EU-PA 143.081). 20 µg der Phagen-DNS (RF: replikative Form) werden mit Restriktions-Endonuklease Sall digeriert, wodurch sich eine lineare DNS von annähernd 9 kb ergibt. Nach der Extraktion mit Phenol/Chloroform wird die DNS mit Ethanol ausgefällt. Die DNS wird erneut in 10 mM Tris, pH 8,0, mit einer Konzentration von 0,5 µg/ml suspendiert. 16 µg von Sall-gespaltener DNS werden mit 2U (Einheiten) von Exonuclease Bal31 (BRL) in 100 µl von 20 mM Tris, pH 8,0, 199 mM NaCl, 12 mM MgCl₂, 12 mM CaCl₂ und 1 mM EDTA digeriert. Aliquoten von jeweils 2 µg DNS werden nach einer Inkubationszeit von 1, 2, 3, 4, 5 und 6 min bei 30°C entnommen und sofort mit 50 µl Phenol und 60 µl TNE vermischt. Nach der Extraktion mit Phenol/Chloroform und der Ethanol-Präzipitation und die DNS erneut in 10 mM Tris, pH 8,0, mit einer Konzentration von 100 µg/ml suspendiert. Zur Analyse des Ausmaßes der exonucleolytischen Spaltung durch Bal31 werden 0,5 µg DNS von jedem Zeitpunkt mit Endonuklease BamHI digeriert und auf einem 1,5%igen Agarosegel in Tris-Boratpuffer, pH 8,3, analysiert (90 mM Tris · HCl, pH 8,3, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA). Durchschnittlich werden 100 bp von jedem Ende des Fragmentes je 1 min der Bal31-Digestion entfernt.

b) Addition von EcoRI-Linkern zu der Bal31-behandelten DNS

Zwei A₂₆₀ Einheiten von EcoRI-Linkern (5'-GGAATTCC-3', BRL) werden erneut in 250 µl von 10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA suspendiert. Zwei µg von EcoRI-Linkern werden in 75 µl von 60 mM Tris, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 15 mM DDT, 10 µM ATP und 33 U von T4-Polynukleotid-Kinase (Boehringer) kinasiert. Nach 1 h bei 37°C wird das Gemisch auf Raumtemperatur abkühlen gelassen und danach bei -20°C aufbewahrt.

Die wärmebehandelten, doppelsträngigen EcoRI-Linker werden mit ihren stumpfen Enden an die Bal31-behandelten DNS Fragmente ligiert. Ein halbes Mikrogramm von Bal31-behandelter DNS (siehe Beispiel 1a) wird 16 Stunden lang bei Raumtemperatur mit einem 50fachen Überschuss von kinasierten EcoRI-Linkern in 20 µl 60 mM Tris, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DDT, 4 mM ATP und 600 U von T4-DNS-Ligase (Biolabs) inkubiert. Nach der Inaktivierung der T4-DNS-Ligase (10 min bei 65°C) wird der Überschuss von EcoRI-Linkern durch 50 U von EcoRI (Boehringer) in einem Volumen von 50 µl gespalten. Die DNS wird mit Phenol/Chloroform extrahiert, durch Ethanol ausgefällt und wieder in 10 mM Tris, 1 mM EDTA (= TE) suspendiert. Danach wird die DNS mit 5 Einheiten von BamHI (Biolabs) gespalten, und das Gemisch wird auf ein 1,5%iges, niedrig-schmelzendes Agarosegel (Sigma) in Tris-Boratpuffer (siehe oben) aufgegeben. Die Banden werden mit Ethidiumbromid gefärbt und unter langwelligem UV-Licht von 360 nm beobachtet. Die breiten diffusen Bänderungsmuster zwischen etwa 100 bp und 600 bp werden aus dem Gel ausgeschnitten, und die DNS wird wie folgt extrahiert: Das Stück Agarose wird bei 65°C verflüssigt, auf 500 mM NaCl eingestellt und 20 min lang bei 65°C inkubiert. Es wird ein Volumen Phenol (äquilibriert mit 10 mM Tris · HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl) zugesetzt. Die wäßrige Phase wird zweimal mit Phenol und einmal mit Chloroform reextrahiert. Die DNS wird mit 2,5 Volumen kaltem absolutem Ethanol ausgefällt und durch Zentrifugieren gesammelt. Das DNS-Pellet wird mit kaltem 80%igem Ethanol gewaschen und anschließend unter Vakuum getrocknet. Die DNS wird wieder in 10 µl TE suspendiert.

c) Ligation in M13mp9

3 µg RF von M13mp9 werden mit 15 Einheiten EcoRI (Biolabs) und 15 Einheiten BamHI (Boehringer) in einem Volumen von 50 µl digeriert. Nach der Phenolextraktion und der Ethanolauflösung wird die DNS wieder in 50 µl TE suspendiert. Fünf µl von ausgeschnittenen Vector-DNS (etwa 200 ng) werden mit 10 µl der obigen Proben (DNS-Fragmenten, die aus den verschiedenen Bal31-Digests nach der Beschreibung in Beispiel 1 b resultieren) vermischt und in einem Gesamtvolumen von 20 µl in Gegenwart von 60 mM Tris/HCl, pH 7,5, 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP und 200 U von T4-DNS-Ligase 15 Stunden lang ligiert. Die Transduktion von kompetenten Zellen des Stammes *E. coli* JM101 erfolgt nach dem Handbuch „M13 Cloning and sequencing system“ (M13 Clonierungs- und Sequenzierungssystem), veröffentlicht von New England Biolabs. Phagen von einer Anzahl weißer Plaques werden gezüchtet und hinsichtlich der Größe ihrer DNS-Inserts durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI analysiert.

d) Bestimmung von Bal31 Deletions-Endpunkten durch Sanger Sequenzierung (Deletionen von der Sall Stelle)

Die Sequenzierung wird unter Anwendung des Didesoxy-DNS-Sequenzierungssystems von Sanger, u.a. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 [1977]), wie sie in dem oben angeführten Buch beschrieben wird, vorgenommen. Die Deletionsendpunkte sind unten aufgeführt:

Clon	Position des letzten Nucleotids der PHO5-Sequenz (siehe Fig. 1)
------	--

A	-502
B	-471
C	-422
D	-400
E	-392
F	-369
G	-350

Clon Position des letzten Nucleotids
der PHO 5-Sequenz (siehe Fig. 1)

H	-328
I	-300
K	-283
L	-255
M	-226
N	-211
O	-187
P	-111
Q	-88
R	-57
S	-33

e) Bestimmung von Bal31 Deletions-Endpunkten durch Sanger Sequenzierung (Deletionen von der BamHI Stelle)

Eine ähnliche Reihe von Bal31-Deletionen wird wie unter a bis c beschrieben vorgenommen, nur wird M13mp9 PHO 5 Bam-Sal abgebrochen. Die Bal31-digerierten Moleküle werden durch EcoRI und SalI abgebrochen, und die erzeugten Fragmente werden in mit EcoRI und SalI digerierten M13mp9 cloniert. Die Deletionsendpunkte sind unten angeführt:

Clon Position des letzten Nucleotids
der PHO 5-Sequenz (siehe Fig. 1)

A'	-24
B'	-35
C'	-41
D'	-48
E'	-74
F'	-89
G'	-93
H'	-97
I'	-124
K'	-162
L'	-174
M'	-262
N'	-277
O'	-306
P'	-332
Q'	-346
R'	-361
S'	-382
T'	-393

f) Konstruktion von internen PHO 5-Promotor-Deletionen

Die unter d) beschriebene Bal31-Deletion erzeugt ein „linker Arm“ PHO 5-Promotorfragment, das mit einer EcoRI-Stelle endet, und die unter e) beschriebene Bal31-Deletion erzeugt ein „rechter Arm“ PHO 5-Promotorfragment, das mit einer EcoRI-Stelle endet. Durch die Kombination von „linken Armen“ und „rechten Armen“ von verschiedenen Positionen werden interne Deletionen geschaffen, die ein EcoRI-Linkersegment an der Stelle der ausgeschiedenen DNS enthalten. Die einzelnen internen Deletionen werden durch Abbrechen der „linken Arme“ und der „rechten Arme“ von den M13mp9-Derivaten durch die Restriktions-Endonukleaseen EcoRI und BamHI (linke Arme) oder EcoRI und SalI (rechte Arme) und Isolierung der entsprechenden Fragmente mit Hilfe der unter b) beschriebenen Weichagarosegel-Elektrophorese konstruiert. Äquimolare Mengen von „linken Armen“ und „rechten Armen“ und 200ng BamHI- und SalI-digertierte M14mp9-Vector-DNS werden wie unter c) beschrieben ligiert. Nach der Transduktion in *E. coli* JM 101 werden weiße Plaques gesammelt, RF wird erzeugt und durch Restriktionsanalyse (BamHI, SalI, EcoRI) analysiert. Die folgenden Arme werden zur Schaffung spezifischer interner Deletionen kombiniert (zur Numerierung der Nucleotide siehe Fig. 1):

„Linker Arm“	„Rechter Arm“	Deletion	von — bis	Anzahl der ausgeschlossenen Nucleotide
A	T'	Δ7	-501 bis -394	108
B	T'	Δ8	-470 bis -394	77
C	T'	Δ9	-421 bis -394	28
D	S'	Δ10	-399 bis -383	17
E	R'	Δ11	-391 bis -362	30
F	Q'	Δ12	-368 bis -347	22

„Linker Arm“	„Rechter Arm“	Deletion	von — bis	Anzahl der ausgeschlossenen Nucleotide
G	P'	Δ13	-349 bis -333	17
H	Q'	Δ14	-327 bis -307	21
I	N'	Δ15	-299 bis -278	22
K	M'	Δ16	-282 bis -263	20
L	L'	Δ17	-254 bis -175	80
M	L'	Δ18	-225 bis -175	51
N	L'	Δ19	-210 bis -175	36
O	L'	Δ20	-186 bis -175	12
O	K'	Δ21	-186 bis -163	24
O	I'	Δ22	-186 bis -125	62
O	H'	Δ23	-186 bis -98	89
P	H'	Δ24	-110 bis -98	13
P	G'	Δ25	-110 bis -94	17
P	F'	Δ26	-110 bis -90	21
Q	E'	Δ27	-87 bis -75	13
R	D'	Δ28	-56 bis -49	8
R	C'	Δ29	-56 bis -42	15
R	B'	Δ30	-56 bis -36	21
S	A'	Δ31	-32 bis -25	8

Beispiel 2: In vivo Analyse der internen Deletionen des PHO5-Promotors

Die verschiedenen, in Beispiel 1f) beschriebenen Deletionen in Plasmid pJDB207/PHO5 cloniert (R. Haguenauer-Tsapis und A. Hinnen, Molecular and Cellular Biology, 4, 2668–2675 [1984]), indem das Wildtyp-POH5-Bam-Sal-Fragment durch die ausgesonderte Version ersetzt wird. Nach der Transformation von Hefestamm *S. cerevisiae* AH216 (siehe EU-PA 143.081) wird die Säurephosphatase-Aktivität wie von Toh-e, u. a. beschrieben (J. Bacteriol. 113, 727 [1973]) bestimmt. Die Deletionen Δ11 und Δ12 zeigen eine etwa zehnfache Verringerung der PHO5-Aktivität und definieren eine Upstream-Region („Upstream-Aktivierungsstelle“, UAS), die für die PHO5-Expression von Bedeutung ist. Eine ähnliche verminderte Wirkung ist bei Deletion Δ17 (etwa 5fache Verringerung) und für die TATA-Box-Deletionen Δ23 bis Δ26 festzustellen (etwa 30fache Verringerung). Alle anderen Deletionen zeigen Aktivitäten von annähernd Wildtyp-Ausmaß. Diese Ergebnisse zeigen, daß drei Bereiche mit wichtiger Information für die PHO5-Expression an den folgenden Positionen vorhanden sind:

1. Zwischen den Positionen -349 und -383 (UAS1)
2. Zwischen den Positionen -225 und -263 (UAS2)
3. Zwischen den Positionen -87 und -125 (TATA-Box)

DNS-Fragmente, die die UAS 1 oder UAS 2 oder UAS1 und UAS2 von PHO5 enthalten, können von Rekombinant-Phage M13mp9/PHO5-Bamsal (siehe Beispiel 1) durch Spaltung mit entsprechenden Restriktions-Endonukleasen erzeugt werden.

UAS 1 ist in einem 268 bp BamHI-Clai-I-Fragment vorhanden, das folgende Formel hat:

```
GATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCACAGTATTGGAAGTCATCTTATGTG  
CGCTGCTTAATGTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGCTATAAACTCAAACGAAGGTAAAAGGTT  
CATAGCGCTTTCTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAAATTAGCACGCTTCGCATAGAACG  
CAACTGCACAATGCCAAAAAAAGTAAAAGTGTAAAGAGTTAATTGAATAGGCAATCTCAAAT  
GAAT, UAS 2 ist in einem 100 bp Clai-I-BstEII-Fragment mit folgender Formel vorhanden:  
CGATACAACCTGGCACTCACACGTGGGACTAGCACAGACTAAATTATGATTCTGGCCCTGTTT  
CGAAGAGATCGCACATGCCAAATTATCAAATTG.
```

und beide UAS 1 und UAS 2 sind in dem 368 bp BamHI-BstEII-Fragment mit folgender Formel vorhanden:

```
GATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCACAGTATTGGAAGTCATCTTATGTG  
GCTGCTTAATGTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGCTATAAACTCAAACGAAGGTAAAAGGTTCA  
TAGCGCTTTCTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAAATTAGCACGCTTCGCATAGAACGCAA  
CTGCACAATGCCAAAAAAAGTAAAAGTGTAAAGAGTTAATTGAATAGGCAATCTCAAATGAAT  
CGATACAACCTGGCACTCACACGTGGGACTAGCACAGACTAAATTATGATTCTGGCCCTGTTT  
CGAAGAGATCGCACATGCCAAATTATCAAATTG.
```

Beispiel 3: Konstruktion von verschmolzenen PHO5 — GAPDH-Hybridpromotoren

Durch Beispiel 1 und 2 werden eine Region um Position -365 [UAS1(PHO5)] und eine andere Region um Position -180 [UAS2(PHO5)] des PHO5-Gens zu möglichen Kandidaten für UAS mit regulierenden Funktionen. UAS1(PHO5) ist in einem 268 bp BamHI-Clai-I-Fragment enthalten, während beide UAS1(PHO5) und UAS2(PHO5) in einem 368 bp BamHI-BstEII-Fragment enthalten sind. Diese beiden Fragmente sind je mit zwei unterschiedlichen GAPDH-Downstream-Promotorelementen, die die TATA-Box und Transcriptions-Initiierungsstellen von GAPDH enthalten, verschmolzen.

a) Konstruktion einer Hefegen-Sammlung

DreiBig µg von totaler Hefe-DNS mit hoher relativer Molekulmasse (M. V. Olsen, u. a., J. Mol. Biol., 132, 387 [1979]) vom Wildtyp-Stamm S 288C von *Saccharomyces cerevisiae* werden 30 min lang bei 37°C mit 2 Einheiten von EcoRI-Methylase (New England Biolabs) in 250 µl von EcoRI-Methylationspuffer nach Empfehlung des Lieferanten inkubiert. DNS wird durch Ethanol ausgefällt, in 500 µl von 25 mM Tris · HCl, pH 8,5, 2 mM MgCl₂ (EcoRI⁺ Puffer) (H. Meyer, FEBS Lett. 90, 341 [1979]) resuspendiert und mit EcoRI (Boehringer) digeriert, bis die Größenverteilung der DNS-Fragmente ein im Bereich von 30 bis 50 kb liegendes Maximum aufweist (ein Xhol Digest von λDNS ergibt entsprechend 33 kb und 17 kb Markierer). Die unter EcoRI⁺ Bedingungen digerierte Hefe-DNS wird 6 h lang mit 38 000 U/min in einem SW40 Rotor auf einem Saccharose-Gradienten (5 bis 20% Saccharose in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA) grösßenfraktioniert. DreiBig Fraktionen von je 0,4 ml werden oben von dem Gradienten

gesammelt. Fraktion 16 enthält DNS-Fragmente mit einer Größe von 30 bis 40 kb. Die DNS dieser Fraktion (3 µg) wird mit Ethanol ausgefällt und 16 Stunden lang bei 15°C in einem Gesamtvolume von 15 µl bis 1 µl Cosmid-Vector pYcl (B. Hohn, u. a., in „Genetic Engineering“, Bd. 2, S. 169, New York 1980), linearisiert durch EcoRI, ligiert. Die Ligation wird mit 300 U T4-DNS-Ligase (New England Biolabs) unter Verwendung des vom Lieferanten beschriebenen Puffer-Systems ausgeführt. Die DNS wird *in vitro* in Bakteriophage λ eingebaut. (B. Hohn in „Methods in Enzymology“, Bd. 68, S. 299, New York 1979) und die vereinigten Phagen werden zur Umwandlung von *E. coli* Stamm HB101 verwendet (R_k^{\ominus} , m_k^{\ominus} , leu^{\ominus} , pro^{\ominus} , $recA$). Der Wirkungsgrad der Umwandlung beträgt etwa 5000 ampicillin-resistente Kolonien je µg pYcl-Vector. 3000 amp^R Kolonien werden gesammelt und einzeln in den Vertiefungen von Mikrotiter-Schalen in LB-Medium (10g Bacto-Tryptone [Difco], 5g Bacto Yeast Extract [Difco], 10g NaCl), das 100 µg/ml Ampicillin enthält, gezüchtet.

b) Isolierung des Hefegens GAPDH

Die oben beschriebene Gen-Sammlung wird mit einem synthetischen Oligonucleotid (hergestellt unter Anwendung der Phosphotriester-Methode: K. Itakura, u. a., J. Am. Chem. Soc. 97, 7327 [1975]; J. F. M. de Rooij, u. a., Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 98, 537 [1979]) der folgenden Struktur: 5'-GCTCCATCTTCCACCGCCCC-3' gescreent. 10 µg des Oligonucleotids werden unter Verwendung von 10 µl $\gamma^{32}P$ -ATP (3000 Ci/mMol, 10 µCi/µl Amersham) mit T4-Polynukleotid-Kinase (Boehringer) in einem Gesamtvolume von 50 µl nach der Beschreibung von Maniatis, u. a., („Molecular Cloning“, Cold Spring Harbor Lab., 1982, Seite 125) kinasiert. Die Kolonie-Hybridisierung wird wie vom gleichen Autor beschrieben (Seite 312) vorgenommen. Positive Clone werden durch Autoradiographie unter Anwendung von Kodak Röntgenfilm X-5 nachgewiesen. Die Plasmid-DNS-Isolierung (siehe EU-PA 100.561) ergibt ein Hybridclon, das ein für GAPDH codierendes 2100 bp HindIII-Fragment enthält (J. P. Holland, u. a., J. Biol. Chem. 254, 9839 [1979]). Der endgültige Beweis für die Authentität der chlonierten DNS kommt aus dem DNS-Sequenzierungsexperiment unter Anwendung des oben genannten Oligonucleotids in Verbindung mit dem Didesoxy-Sequenzierungsprotokoll nach der Beschreibung von G. F. Hong (Bioscience Reports 1, 243 [1981]) für doppelsträngige DNS. Das clonierte GAPDH-Gen hat die gleiche Sequenz wie pgap 491, veröffentlicht von Holland, u. a. (J. Biol. Chem. 255, 2596 [1980]).

c) Herstellung der GAPDH Downstream-Promotorelemente (siehe Fig. 2 und 3)

Das 649 bp TaqI-Fragment, das die Positionen –27 bis –657 von dem ATG des GAPDH-Gens enthält (siehe Fig. 2), wird durch Digerieren des oben genannten Hybridplasmids mit TaqI (New England Biolabs), Trennen der DNS-Fragmente auf einem 1,2%igen weichen Agarosegel und Extrahieren der DNS durch heißes Phenol (siehe Beispiel 1) isoliert. Die Clonierung des TaqI-Fragmentes wird in die ClaI-Stelle von pBR322 vorgenommen: 1 µg pBR322 wird mit drei Einheiten von ClaI (New England Biolabs) nach der Beschreibung des Lieferanten gespalten. 300 ng des phenolisierten und abgebrochenen Vectors werden mit etwa 300 ng von Insert-DNS (649 bp Taq Fragment) unter Verwendung von 200 U von T4-DNS-Ligase in einem Gesamtvolume von 20 µl (siehe Beispiel 1 b) ligiert. Die Transformation erfolgt in *E. coli* HB101 für Ampicillin-Resistenz, Plasmid-DNS wird hergestellt und durch Restriktionsanalyse [TaqI, DraI] analysiert. Die Orientierung des TaqI-Fragmentes wird unter Verwendung von Restriktions-Endonuklease DraI in Kombination mit der BamHI-Stelle der Plasmide vorgenommen, und es wird ein Plasmid ausgewählt, das die TaqI-Stelle von Position –675 nahe der HindIII-Stelle von pBR322 hat. Dieses pBR322/GAPDH bezeichnete Plasmid wird unter Verwendung von BamHI (New England Biolabs) linearisiert, und es wird eine Digestion mit Bal31 wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt, nur werden BglII-Linker (5'-CAGATCTG-3', New England Biolabs) verwendet, und das digerierte Plasmid wird direkt mit einer Konzentration von 5 µg/ml in einem Gesamtvolume von 20 µl zirkuliert. Die Größe des Bal31-verkürzten TaqI-Fragmentes wird durch Restriktionsanalyse (unter Verwendung von BglII und HindIII) bestimmt. Es werden zwei Clone ausgewählt, die DNS-Fragmente enthalten, die sich etwa 200 bp und 265 bp von dem ATG aufwärts in den GAPDH-Promotor erstrecken. Beide Fragmente enthalten die vermutliche TATA-Box von etwa –140 bp. Diese Clone enthalten noch den Replikationsursprung in dem von pBR322 abgeleiteten Teil der DNS und werden als pGAPDH-F bzw. pGAPDH-E bezeichnet.

d) Kombinieren des Downstream-GAPDH-Elementes mit UAS1 (PHO5) von PHO5 und der Protein-Codierungsregion von Eglin C.

I) GAPDH-Elemente (siehe Fig. 3)

Um die GAPDH-Promotorelemente von der TaqI-Stelle an der Position –27 zu einer unmittelbar neben dem ATG des GAPDH-Gens gelegenen Stelle zu verlängern, werden zwei synthetische komplementäre Oligonucleotide der folgenden Struktur synthetisiert:

5' CGAATAAACACACATAAATAAAG 3'

3' TTATITGTGTATTATTCTTAA 5'

Diese Oligonucleotide liefern die echte GAPDH-Promotorsequenz von Position –26 bis Position –5 unter Erzeugung einer terminalen EcoRI-Stelle. Jeweils zwei µg der Plasmide pGAPDH-E und -F werden mit 6 Einheiten von TaqI in 50 µl digeriert, und die resultierenden Mischungen werden phenolisiert, mit Ethanol ausgefällt und in 10 µl Wasser resuspendiert. Die synthetischen Oligonucleotide werden gehärtet, indem 2 µl jedes Einzelstranges in 100 µl einer Lösung, die 10 mM Tris · HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl enthält, vermischt werden, 3 min lang auf 90°C erhitzt werden und die Lösung langsam auf Raumtemperatur abgekühlt wird (innerhalb von etwa 3 Stunden). Ein µg von jedem der TaqI-digerierten Plasmide wird mit einem etwa zwanzigfachen Molüberschuss der gehärteten Oligonucleotide in einem Volumen von 20 µl etwa 18 Stunden lang unter Verwendung von 800 U von T4-DNS-Ligase vermischt. Die gesamte Mischung wird mit 3 Einheiten von BglII (New England Biolabs) digeriert. Die DNS-Fragmente werden auf einem 1,5%igen weichen Agarosegel getrennt. Die BglII-EcoRI-Fragmente von etwa 200 bp bzw. 265 bp werden aus dem Gel ausgeschnitten, extrahiert und mit Ethanol ausgefällt.

Plasmid pGAPDH-E wird mit BglII und EcoRI digeriert, und das große (etwa 3,5 kb) Fragment wird isoliert. Dieses Fragment wird als Vector zur Clonierung der 265 bp und 200 bp BglII-EcoRI-Fragmente unter Anwendung von Ligations-, Transformations- und Plasmid-Isolierungsbedingungen nach obiger Beschreibung verwendet. Die erzeugten Plasmide werden als pGAPDH-EL und pGAPDH-FL bezeichnet. Die DNS-Sequenzen der in pGAPDH-EL und pGAPDH-FL chlonierten BglII-Fragmente werden in Fig. 4 gezeigt. Die genaue Größe der Fragmente beträgt 266 bp bzw. 201 bp.

II) Das UAS(PHO5)-Regulatorelement

3 µg von Plasmid p31/Y (siehe EU-PA Nr. 100.561) werden mit 6 Einheiten von ClaI (New England Biolabs) digeriert. Die vertieften 3'-Enden werden in einer Reaktion mit dem Klenow-Fragment von *E. coli* DNS-Polymerase I (Bethesda Research Laboratories) nach Maniatis (supra) gefüllt. BglII-Linker (5'-CAGATCTG-3') werden wie in Beispiel 1 beschrieben hinzugefügt. Die DNS wird mit SalI und BglII (New England Biolabs) digeriert und auf einem 1%igen weichen Agarosegel zum Laufen

gebracht. Das 548 bp Fragment wird aus dem Gel ausgeschnitten, phenolosiert und mit Ethanol ausgefällt, wie oben beschrieben wird.

III) Konstruktion von Plasmid pJDB207R/PHO5-EGL (Siehe Fig. 5)

Dieses Plasmid ist eine Quelle eines DNS-Fragmentes, das aus der Eglin C-Codierungsregion und dem PHO5 Transcriptionsterminator zusammengesetzt ist.

A) Isolierung des pJDB207 Vectorfragments

Sechs μg von Plasmid pJDB207R/IF(α -3) (EU-PA Nr. 100.561) werden bis zur Vollständigkeit mit Restriktions-Endonuclease BamHI digeriert. Die resultierenden DNS-Fragmente mit einer Größe von 6,85 kb und 1,15 kb werden durch Ethanol ausgefällt und in 400 μl von 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, resuspendiert. 4,5 Einheiten von alkalischer Kalbssarmphosphatase (Boehringer, Mannheim) werden zugesetzt. Das Gemisch wird 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Phosphatase durch einstündige Inkubation bei 65°C inaktiviert. Die Lösung wird auf 150 mM NaCl eingestellt. Die DNS-Lösung wird auf ein 100- μl -Bett von DE52 (Whatman) Ionenaustauscher aufgegeben, mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 äquilibriert, die 150 mM NaCl und 1 mM EDTA enthält. Nach dem Waschen mit dem gleichen Puffer wird die DNS mit 400 μl von 1,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA eluiert und durch Ethanol ausgefällt. Das große 6,85 kb BamHI-Fragment wird von dem kleinen Fragment auf einem 0,6%igen niedrig-schmelzenden Agarosegel in Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH 8,3, getrennt.

B) Isolierung eines 534 bp PHO5-Promotorfragments

Zehn μg von Plasmid p31/R (EU-PA Nr. 100.561) werden mit den Restriktions-Endonucleasen EcoRI und BamHI digeriert. Die resultierenden 3 Fragmente werden auf einem 0,6%igen niedrig-schmelzenden Agarosegel in Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH 8,3, getrennt. Ein 534 bp BamHI-EcoRI-Fragment wird isoliert, das den PHO5-Promotor einschließlich der mRNS-Startstellen enthält.

C) Isolierung eines 221 bp DNS-Fragmentes, das die Codierungssequenz für Eglin enthält

Acht μg von Plasmid pML 147 (EU-PA Nr. 146.785) werden mit den Restriktions-Endonucleasen BamHI und EcoRI digeriert. Die resultierenden zwei DNS-Fragmente werden auf einem 0,6%igen niedrig-schmelzenden Agarosegel in Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH 8,3, getrennt. Das 221 bp Fragment wird isoliert.

D) Ligation von DNS-Fragmenten

Drei oben beschriebene DNS-Fragmente (Beispiele 3d III A-C) mit entsprechenden klebrigen Enden werden in einer Reaktion ligiert: 0,1 pMol (0,45 μg) des 6,58 kb BamHI-Vectorfragments, 0,2 pMol (70 ng) des 534 bp BamHI-EcoRI-PHO5-Promotorfragments und 0,2 pMol (29 ng) des 221 bp EcoRI-BamHI-Fragments von pML 147 werden ligiert. Alle drei DNS-Fragmente sind in einem kleinen Gelblock von niedrig-schmelzender Agarose enthalten. Die drei Stücke Agarosegel werden zusammengekommen, bei 65°C verflüssigt und zweimal verdünnt. Die Ligation erfolgt in einem Gesamtvolume von 270 μl von 60 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP mit 16 Einheiten von T4-DNS-Ligase (Boehringer, Mannheim) 16 Stunden lang bei 15°C. Eine 10- μl -Aliquote des Ligationsgemisches wird zu 100 μl mit Calcium behandelten kompetenten Transformationszellen von *E. coli* HB 101 gegeben.

24 transformierte amp^R Kolonien werden einzeln in LB-Medium gezüchtet, das 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin enthält. Plasmid-DNS wird nach der Methode von Holmes, u.a. (Anal. Biochem. 114, 193 [1981]) hergestellt und durch HindIII/EcoRI-Doppeldigestion analysiert. Das Erscheinen eines 600 bp EcoRI-HindIII-Fragments zeigt, daß das betreffende Clon das PHO5-Promotor-Eglin C-DNS-Fragment in den Expressionsvector in der richtigen Orientierung eingefügt hat. Wie erwartet haben etwa 50% der Clone einen Insert in der richtigen Orientierung. Einer dieser Clone wird isoliert und als pJDB207R/PHO5-EGL bezeichnet.

Sechs μg Plasmid pJDB207R/PHO5-EGL werden bis zur Vollständigkeit mit den Restriktions-Endonucleasen HindIII und Sall digeriert. Das große 6,1 kb (Vectorteil) Fragment wird durch Weichagarosegel-Elektrophorese, Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation isoliert. Die Vector-DNS wird in 20 μl Wasser resuspendiert. Das Eglin-Fragment wird durch Digestion von pJDB207R/PHO5-EGL mit HindIII und EcoRI geschaffen. Das resultierende 600 bp Fragment wird durch Weichagarosegel-Elektrophorese getrennt, mit Phenol extrahiert und mit Ethanol ausgefällt. Das Eglin-Fragment wird in 20 μl H₂O resuspendiert.

IV) Ligation der Fragmente unter Verwendung von UAS1(PHO5)-Elementen (siehe Fig. 6)

Die Ligation wird unter Anwendung der folgenden vier Komponenten vorgenommen: 0,5 μg des 6,1 kb HindIII-Sall-Vectorfragments, 100 ng des 600 bp EcoRI-HindIII-Eglin C-Fragmentes, 200 ng des 266 bp BglII-EcoRI-Fragments von pGAPDH-EL und 100 ng des 548 bp Sall-BglII-Fragments, das UAS1(PHO5) aufweist. Die Ligation wird wie oben ausgeführt. Die Transformation von *E. coli* HB 101 für Ampicillin-Resistenz, die Plasmidisolierung und die Restriktionsanalyse von positiven Clonen werden nach obiger Beschreibung vorgenommen, wobei die Restriktions-Endonucleasen HindIII, EcoRI, BglII und Sall verwendet werden. Es wird ein positives Clon ausgewählt und als pJDB207/PAPEL-EGL (UAS 1) bezeichnet.

Es wird eine analoge Konstruktion mit dem 201 bp BglII-EcoRI-Fragment von pGAPDH-FL ausgeführt. Das erzeugte Plasmid wird pJDB207/PAPEL-EGL(UAS 1) genannt.

V) Konstruktion von Hybriden mit UAS1(PHO5) und UAS2(PHO5)-Elementen

3 μg der obigen Plasmide (siehe IV) werden mit BglII digeriert. Nach der Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation wird die DNS in Wasser resuspendiert. Die vertieften 3'-Enden werden mit Klenow-DNS-Polymerase wie unter II) beschrieben ausgefüllt. Die Plasmide werden 10 min lang auf 70°C erhitzt, um das Enzym zu inaktivieren. Nach der Digestion mit Sall (Biolabs) werden die großen Fragmente (etwa 7,2 kb) durch Weichagarosegel-Elektrophorese und Phenolextraktion isoliert, und die durch Ethanol ausgefällte DNS wird in Wasser resuspendiert.

In einer ähnlichen Weise wird Plasmid p31/Y mit BstEII digeriert, mit DNS-Polymerase (Klenow Fragment) behandelt und mit Sall gespalten. Das 651 bp Fragment wird nach obiger Beschreibung isoliert. Die Ligation von 200 ng der obigen Vector-DNSn mit dem 651 bp Fragment ergibt die folgenden Plasmide:

pJDB207/PAPEL-EGL (UAS 1 + UAS 2) (das das 266 bp BglII-EcoRI-Fragment von pGAPDH-EL aufweist)

pJDB207/PAPFL-EGL (UAS 1 + UAS 2) (das das 201 bp BglII-EcoRI-Fragment von pGAPDH-FL aufweist).

Beispiel 4:

a) Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* GRF18

Die vier Plasmide von Beispiel 3dIV und 3dV werden, jeweils in den *Saccharomyces cerevisiae* Stamm GRF18 (α , his3-11, his3-15, leu2-3, leu2-112, can^R) unter Anwendung des von Hinnen, u.a. beschriebenen Transformationsprotokolls (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929 [1978]) eingefügt. Transformierte Hefezellen werden auf Hefe-Minimalmedium-Platten mit Leucin-Mangel ausgewählt. Einzelne transformierte Hefekolonien werden isoliert und als *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207/PAPEL-EGL (UAS 1),/PAPFL-EGL (UAS 1),/PAPEL-EGL (UAS1 + UAS2) und/PAPFL-EGL (USA1 + UAS2) bezeichnet.

b) Fermentation der Transformanten

Zellen der vier *S. cerevisiae* GRF18 Transformanten werden jeweils in 10 ml von Hefe-Minimalmedium (Difco Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, dem 2% Glucose und 20 mg/l L-Histidin zugesetzt wurden) in einem Erlenmeyerkolben 24 Stunden lang bei 30°C unter Schütteln bis zu einer Dichte von 3×10^7 Zellen/ml gezüchtet. Die Zellen werden in 0,9%igem NaCl gewaschen und zum Inokulieren von 50 ml eines starken Pi-Mediums (wie oben) und eines schwachen Pi-Minimalmediums, hergestellt nach der Rezeptur von Difco Yeast Nitrogen Base Medium (ohne Aminosäuren) mit 0,03 g/l KH₂PO₄, 1 g/l KCl, 10 g/l L-Asparagin anstelle von (NH₄)₂SO₄, 2% Glucose und 1 g/l L-Histidin verwendet. Das Medium wird bis zu einem Ausgangs OD₆₀₀ von 0,03 inokuliert. Die Zellen werden in einem 500-ml-Kolben 24 Stunden lang bei 30°C gezüchtet (OD_{600 nm} = 1,8 für schwaches Pi-Medium, OD_{600 nm} = 3,0 für starkes Pi-Medium).

c) Bestimmung von Eglin C-Titern

Wenn die Zellen eine wie oben angegebene Zelldichte (OD) erreicht haben, werden die Zellen geerntet, zentrifugiert und durch Glasperlen zerrissen. Die Mischungen werden auf Eglin-Aktivität hin analysiert, indem die Inhibition von Human-Leukozyten-Elastase nach der Methode von U. Seemueller, u.a. (Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1105 [1971]) gemessen wird. Die folgenden Aktivitäten wurden ermittelt:

Extrakt von <i>S. cerevisiae</i>	Eglin C Aktivität (mg/1/OD der Kultur)	
	induziert schwaches Pi)	nicht induziert (starkes Pi)
pJDB207/PAPEL-EGL(UAS1)	14	0,7
pJDB207/PAPFL-EGL(UAS1)	17	0,7
pJDB207/PAPEL-EGL(UAS1 + UAS2)	14	1
pJDB207/PAPFL-EGL(UAS1 + UAS2)	11	0,7

Beispiel 5: Expression von Desulfatohirudin unter der Kontrolle eines PHO5-GAPDH-Hybridpromotors

I. Einstellung der Nucleotid-Sequenz an dem 5'-Ende des Desulfatohirudin-HV1-Gens

Die für Desulfatohirudin codierende Nucleotid-Sequenz (siehe EP-PA 168.342) beginnt mit GTT, das für NH₂-Terminal-Valin in dem fertigen Genprodukt steht. Zur zweckmäßigen Subclonierung und Expression in *E. coli* wurde die Codierungssequenz an dem 5'-Ende durch acht Nucleotide, einschließlich einer EcoRI-Restriktionsstelle und eines ATG-Initiierungscodons verlängert. Für die exakte In-Frame-Fusion der Hirudin-Codierungssequenz zu der für das PHO5-Signalpeptid codierenden Sequenz müssen diese zusätzlichen Nucleotide entfernt werden. Das wird durch die Umwandlung der EcoRI-Restriktionsstelle in eine fluchtgerechte Endstelle, Hinzufügen eines synthetischen Oligonucleotids, das eine Hgal-Erkennungsstelle in einer solchen Position enthält, daß die anschließende Spaltung mit Hgal unmittelbar vor (upstream) dem GTT-Codon erfolgt, erreicht.

Einfügung einer Hgal-Restriktionsstelle vor dem Desulfatohirudin-Gen (siehe Fig. 7)

8 µg von Plasmid pML310 (siehe EP 168.342) werden bis zur Vollständigkeit mit der Restriktions-Endonuclease EcoRI digeriert. Die DNS (pML310/EcoRI) wird mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol ausgefällt. Überhängende 5'-Enden werden durch Nuclease S₁ entfernt. 4 µg von pML310/EcoRI-DNS werden in 100 µl von 250 ml NaCl, 1 mM ZnSO₄, 30 mM Natriumacetat, pH 4,6, mit 20 U/ml Nuclease S₁ (Sigma) 45 min lang bei 37°C digeriert.

Die DNS wird mit Phenol/Chloroform extrahiert und durch Ethanol ausgefällt. Die DNS (pML310/EcoRI/S₁) wird in 100 µl von 50 mM Tris.HCl, pH 8,0, resuspendiert und mit 2 Einheiten alkalischer Kalbssdarm-Phosphatase (CIAP, Boehringer) eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Das Enzym wird 1,5 Stunden lang bei 65°C inaktiviert.

Die NaCl-Konzentration in dem Inkubationsmedium wird auf 150 mM eingestellt. Die dephosphorylierte DNS (pML310/EcoRI/S₁/CIAP) wird durch Adsorption auf einer Ionenaustauschsäule DE 52 (Whatman) in einem schwachen Salzpuffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris.HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) gereinigt und danach mit einer starken Salzpufferlösung (1,5 M NaCl, 10 mM Tris.HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) eluiert. Die DNS wird mit Ethanol ausgefällt und in H₂O mit einer Konzentration von 0,8 mg/ml resuspendiert.

Ein Oligonucleotid der Formel

5'-AGCGTCGACGCT-3'

wird mit Hilfe der Phosphatriester-Methode synthetisiert (Itakura, u.a., J. Am. Chem. Soc. 103, 706 [1981]). Die Sequenz des Oligonucleotids ist selbst-komplementär und enthält die Erkennungsstelle -GACGC- für Restriktions-Endonuclease Hgal.

Härtung von zwei Einzelsträngen führt zu einem doppelsträngigen DNS-Linker von 12 Basenpaaren.

1,2 µg des synthetischen ein-strängigen Oligodesoxynucleotids werden in 10 µl von 60 mM Tris.HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 30 µCi von [γ - ³²P] ATP (3000 Ci.mMol⁻¹, Amersham) und 6 Einheiten von T4-Polynukleotid-Kinase (Boehringer) 30 min lang bei 37°C phosphoryliert, worauf ein „Treiben“ (? chase) von 15 Minuten bei 37°C in Gegenwart von 0,5 mM ATP folgt. Die Mischung wird weiterhin 10 min lang bei 75°C inkubiert, um das Enzym zu inaktivieren, und wird dann zum Abkühlen auf Raumtemperatur zum Härteten stehen gelassen.

0,6 µg (170 pMol) der ³²P-markierten Linker-DNS werden mit 2,4 µg (1,75 pMol-Enden) von pML310/EcoRI/S₁/CIAP vermischt und in 20 µl von 60 mM Tris.HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 3,5 mit ATP, 800 Einheiten von T4-DNS-Ligase (Biolabs)

20 Stunden lang bei 15°C ligiert. Die Ligase wird 10 min lang bei 85°C inaktiviert, und der Überschuß an Linkermolekülen wird durch Präzipitation der DNS in Gegenwart von 10 mM EDTA, pH 7,5, 300 mM Natriumacetat, pH 6,0, und 0,54 Volumen Isopropanol entfernt. Nach 30 min bei Raumtemperatur wird die DNS pelletiert, in 45 µl Ligationsgemisch (oben spezifiziert) resuspendiert und 6 Stunden lang bei 15°C zur Bildung von kreisförmiger DNS ligiert.

Aliquoten von 1 µl und 3 µl des Ligationsgemisches werden zu 100 µl mit Calcium behandelten kompetenten Transformations *E. coli* HB101-Zellen (hergestellt nach der Methode von D. Hanahan, J. Biol. Chem. 166, 557 [1983]) gegeben. Die Zellen werden 30 min lang auf Eis stehen gelassen, danach 3 min lang bei 42°C inkubiert, 2 min lang auf Eis gekühlt und anschließend eine Stunde lang bei 37°C in 400 µl SOC-Medium inkubiert. Die Zellen werden in jeweils 100 µl konzentriert und auf LB-Agarplatten, die 50 µg/ml Ampicillin enthalten, aufgestrichen.

12 transformierte amp^R-Kolonien werden einzeln in LB-Medium, das 100 µg/ml Ampicillin enthält, gezüchtet. Plasmid-DNS wird nach der Methode von D. S. Holmes, u.a. (Anal. Biochem. 114 193 [1981]) hergestellt. Das Vorhandensein des synthetischen Oligonucleotid-Linkers wird durch DNS-Sequenzierung bestätigt, wobei ein einsträngiges DNS-Fragment als Primer verwendet wird, das zu dem Codierungsstrang von Hirudin hybridisiert. Ein Clon, das die Linker-DNS an der richtigen Stelle vor dem Hirudin-Gen enthält, wird als pML310L bezeichnet.

II. Fusion der PHO5-Signalsequenz und des Desulfatohirudin-Strukturgens

a) Isolierung des 0,2 kb Desulfatohirudin-Fragmentes (siehe Fig. 7)

12 µg von Plasmid pML310L werden bis zur Vollständigkeit mit den Restriktions-Endonukleasen BamHI und PvuI digeriert. Nach der Extraktion der DNS durch Phenol/Chloroform und Ethanolpräzipitation werden die beiden Restriktionsfragmente auf einem 1,2%igen Agarosegel in Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH 8,3, getrennt. Das mit Ethidiumbromid gefärbte 0,84 kb PvuI-BamHI-Fragment wird in einer Gelscheibe isoliert. Die DNS wird in einem mit 3 ml 0,2 × TBE-Puffer gefüllten Dialysebeutel elektroeluiert. Der geschlossene Beutel wird in TBE-Puffer, pH 8,3 (90 mM Tris-Base, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA) eingetaucht. Nach 30 min bei 100 mA wird die Polarität des Stromes 45 sec lang umgekehrt, um die DNS von der Dialysemembran abzustoßen. Der die Gelscheibe in dem Dialysebeutel umgebende Puffer wird zurückgewonnen, auf 150 mM NaCl eingestellt und durch eine Ionenaustauschersäule DE 52 (Whatman) geleitet. Die DNS wird mit einem starken Salzpuffer (1,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) eluiert, mit Ethanol ausgefällt und wieder in H₂O mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml gelöst.

Das 0,84 kb PvuI-BamHI-Fragment von pML310L wird weiter mit Restriktions-Endonuklease HgaI digeriert. Dieses Digest erzeugt ein 198 bp HgaI-BamHI-Fragment, das die vollständige Codierungssequenz für ausgereiftes Desulfatohirudin enthält.

Zusätzliche AluI-Digestion berührt das 198 bp HgaI-BamHI-Fragment nicht, eliminiert aber ein anderes HgaI-Fragment von ähnlicher Größe.

Das 0,2 kb HgaI-BamHI-Fragment wird auf einem 1,5%igen Agarosegel in TBE-Puffer von anderen Fragmenten getrennt und durch Elektroeluiierung (nach obiger Beschreibung) isoliert. Die DNS wird durch DE 52-Ionenaustausch-Chromatographie und Ethanolpräzipitation gereinigt. Die DNS wird in H₂O mit einer Konzentration von 30 µg/ml (0,2 pMol/µl) resuspendiert.

b) Isolierung der PHO5-Promotorregion mit einem Teil der PHO5-Signalsequenz (siehe Fig. 8)

Plasmid p31/PHO5-TPA18 (siehe EU-PA Nr. 143.081) weist den PHO5-Promotor und die PHO5-Signalsequenz „in Frame“ verschmolzen mit einem fremden Strukturgen (t-PA) auf. Ein 584 bp BamHI-Ball-Fragment enthält den PHO5-Promotor und die gesamte PHO5-Signalsequenz, jedoch acht Nucleotide an dem 3'-Ende.

8 µg von p31/PHO5-TPA18-DNS werden mit der Restriktions-Endonuklease BallI digeriert (16 Stunden lang bei 37°C). Die DNS wird durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation gereinigt. Die DNS wird in H₂O mit einer Konzentration von 0,7 mg/ml resuspendiert.

Die einwärdfreie Verbindung zwischen der PHO5-Signalsequenz und der Codierungsregion für Desulfatohirudin wird durch einen synthetischen Linker der folgenden Formel geschaffen

(1) 5'-CCAATGCA-3'

(2) 3'-GGTTACGTCAACA-5'

Acht Nucleotide an dem 5'-Ende des Linkers (5'-CCAATGCA) stellen einen Teil der PHO5-Signalsequenz von der BallI-Stelle bis zur Bearbeitungsstelle dar. Die 5' überhängenden fünf Nucleotide von Oligonukleotid (2) passen in die HgaI-Spaltungsstelle an dem 5'-Ende der Desulfatohirudin-Codierungssequenz.

Die einzelnen einsträngigen Oligonukleotide (1) und (2) werden mit Hilfe der Phosphotriester-Methode (Itakura, u. a., supra) synthetisiert. 1,1 µg und 1,8 µg der Oligonukleotide (1) bzw. (2) werden an ihren 5'-Enden einzeln phosphoryliert, in äquimolaren Mengen vermischt und wie in Beispiel 5I beschrieben gehärtet.

1,3 µg (200 pMol) der phosphorylierten, doppelsträngigen Linker-DNS wird zu 7 µg (1,8 pMol) von BallI-gespaltenem p31/PHO5-TPA18 in 40 µl von 60 mM Tris · HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 3,5 mM ATP, 5 mM DTT und 1400 Einheiten von T₄-DNS-Ligase (Biolabs) 16 Stunden lang bei 15°C ligiert. Die Ligase wird 10 min lang bei 85°C inaktiviert. Der Überschuß an Linkern wird durch Präzipitation der DNS in Gegenwart von 10 mM EDTA, 300 mM Natriumacetat, pH 6,0, und 0,54 Volumen Isopropanol entfernt. Die DNS wird resuspendiert und weiter mit Restriktions-Endonuklease BamHI digeriert. Nach der Extraktion der DNS durch Phenol/Chloroform und Ethanol-Präzipitation werden die beiden Restriktionsfragmente auf einem 1,2%igen Agarosegel in Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH 8,3, getrennt. Das 0,6 kb Fragment wird von dem Gel isoliert. Die DNS wird elektroeluiert und weiter durch DE 52-Ionenaustausch-Chromatographie und Ethanolpräzipitation gereinigt. Das 0,6 kb BamHI-HgaI-DNS-Fragment wird in H₂O mit einer Konzentration von 40 µg/ml resuspendiert.

c) Isolation eines pJDB207-Hefevectorfragmentes (siehe Fig. 8)

9 µg von Plasmid pJDB207R/PHO5-TPA(12-2) DNS (siehe EU-PA 143.081) werden mit der Restriktions-Endonuklease BamHI digeriert. Nach vollständiger Digestion wird die DNS durch Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol ausgefällt. Die DNS wird in 50 mM Tris · HCl, pH 8,0, mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml resuspendiert und mit 7 Einheiten alkalischer Kalbsdarm-Phosphatase eine Stunde lang bei 37°C digeriert. Die Phosphatase wird 1,5 Stunden lang bei 65°C inaktiviert, und die DNS wird durch DE 52-Ionenaustausch-Chromatographie (siehe Beispiel 5I) und Ethanolpräzipitation gereinigt. Das 6,8 kb große BamHI-Fragment wird auf einem 1,2%igen Agarosegel in Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH 8,3, getrennt. Die DNS wird elektroeluiert und durch DE 52-Ionenaustausch-Chromatographie und Ethanol-Präzipitation gereinigt. Die DNS wird in H₂O mit einer Konzentration von 0,4 mg/ml (0,1 pMol/µl) gelöst.

d) Ligation des PHO5-Promotorfragmentes und des Desulfatohirudin-Strukturgens an das pJDB207 Hefevectorfragment (siehe Fig. 8)

Der pJDB207 Hefevector, das PHO5-Promotorfragment mit der PHO5-Signalsequenz und das Desulfatohirudin-Strukturgens werden alle als DNS-Fragmente isoliert (siehe Beispiel 5II a-c), die zur Bildung eines Expressions-Plasmids ligiert werden.

0,3 pMol des 0,6 kb BamHI-HgaI-Fragmentes von p31/PHO5-TPA18 und 0,3 pMol des 0,2 kb HgaI-BamHI-Fragmentes von pML310L werden mit 0,1 pMol eines 6,8 kb BamHI-Fragmentes von pJDB207R/PHO5-TPA(12-2) in 10 µl von 60 mM Tris · HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM ATP und 400 Einheiten von T₄-DNS-Ligase 20 Stunden lang bei 15°C ligiert.

Eine 1-µl-Aliquote des Ligationsgemisches wird zu 100 µl Transformation-kompetenten *E. coli* HB101-Zellen gegeben, die nach Hanahan (supra) hergestellt wurden. Das Transformationsprotokoll wird gleichfalls aus dieser Veröffentlichung übernommen. Die Zellen werden auf LB-Agarplatten, die 50 µg/ml Ampicillin enthalten, aufgestrichen.

24amp^R Kolonien werden einzeln in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gezüchtet. Plasmid-DNS wird durch Spaltung mit Restriktions-Endonuklease PstI hinsichtlich Größe und Orientierung des Inserts analysiert. Ein einzelnes Clon mit der richtigen Orientierung des Inserts wird als pJDB207/PHO5-HIR bezeichnet.

III) Herstellung von Plasmid pJDB207/PHO5(Eco)-HIR (siehe Fig. 9)

Zur einfachen Verbindung der UAS(PHO5)-GAPDH-Hybridpromotorelemente mit der Codierungsregion von Desulfatohirudin, das die PHO5-Signalsequenz enthält (wie in Plasmid pJDB207/PHO5-HIR), wird eine EcoRI-Restriktionsstelle in die nicht-umgewandelte 5'-Region zwischen den mRNS-Startstellen und dem ATG der Codierungsregion eingefügt.

15 µg von Plasmid pJDB207/PHO5-HIR werden mit Restriktions-Endonuclease Drai (Boehringer) digeriert. Die resultierenden 4 Fragmente werden auf einem 0,8%igen Agarosegel in Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH8,3, getrennt. Das 4,2 kb DNS-Fragment wird aus dem Gel zurückgewonnen, elektroeluiert und durch Ethanol ausgefällt. Die DNS wird in H₂O mit einer Konzentration von 0,6 mg/ml resuspendiert.

Zwei synthetische Oligonucleotide der Formel

5'-AATTCGATTACCAATGTTT-3'

3'- GCTAATGGTTACAAA-5'

(2,3 µg bzw. 2,9 µg) werden jeweils in 20 µl von 60 mM Tris, pH7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0,5 mM ATP und 20 U von T4-Polynukleotid-Kinase (Boehringer) kinasiert. Nach 45 min bei 37°C werden die beiden Reaktionsmischungen zusammengezogen, 10 min lang auf 75°C erhitzt und zum Abkühlen auf Raumtemperatur stehen gelassen. Der gehärtete Oligonukleotid-Linker wird bei -20°C aufbewahrt.

6,5 µg (2,3 pMol) des 4,2 kb Drai-DNS-Fragmentes werden 16 h lang bei 15°C mit einem 70fachen Überschuß des kinasierten und gehärteten Oligonukleotid-Linkers in 50 µl von 60 mM Tris, pH7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 3,5 mM ATP und 800 Einheiten von T4-DNS-Ligase (Biolabs) inkubiert. Nach der Inaktivierung der T4-DNS-Ligase über einen Zeitraum von 10 min bei 85°C werden die überschüssigen Linker durch Präzipitation der DNS in Gegenwart von 10 mM EDTA, 300 mM Natriumacetat, pH 6,0, und 0,54 Volumen Isopropanol entfernt. Die DNS wird mit EcoRI und HindIII digeriert. Die resultierenden Fragmente werden auf einem 1%igen Agarosegel in Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH8,3, getrennt. Das 643 bp Fragment wird aus dem Gel durch Elektroeluiierung und Ethanolpräzipitation zurückgewonnen. Die DNS wird mit einer Konzentration von 0,1 pMol/µl resuspendiert. Das EcoRI-HindIII-Fragment enthält die PHO5-Signalsequenz, die Codierungssequenz von Desulfatohirudin und den PHO5-Transkriptions-Terminator.

Das 534 bp PHO5-Promotorfragment wird von Plasmid p31/R isoliert (EU-PA 100.561).

Zehn µg p31/R werden mit den Restriktions-Endonukleasen EcoRI und BamHI digeriert. Die resultierenden 3 Fragmente werden auf einem 0,6%igen niedrigschmelzenden Agarosegel in Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH8,3, getrennt. Ein 534 bp BamHI-EcoRI-Fragment wird isoliert, das den PHO5-Promotor einschließlich der mRNS-Startstellen enthält.

Das Vectorfragment wird von Plasmid pJDB207/PHO5-HIR isoliert.

6 µg dieses Plasmids werden mit BamHI und HindIII digeriert. Das große 6,5 kb BamHI-HindIII-Fragment wird auf einem 0,6%igen niedrig-schmelzenden Agarosegel in Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH8,3, von dem kleinen Fragment getrennt.

Drei oben beschriebene DNS-Fragmente mit den entsprechenden klebrigen Enden werden in folgender Reaktion ligiert: 0,2 pMol (70 ng) des 534 bp BamHI-EcoRI PHO5-Promotorfragments, 0,2 pMol (85 ng) des 643 bp EcoRI-HindIII-Fragments (Hirudin-Codierungssequenz) und 0,1 pMol (0,4 µg) des 6,5 kb BamHI-HindIII Vectorfragments werden in 10 µl von 60 mM Tris, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM ATP und 400 U von T4-DNS-Ligase 6 h lang bei 15°C ligiert. Eine 1-µl-Aliquote des Ligationsgemisches wird zu 100 µl mit Calcium behandelten Transformations-kompetenten *E. coli* HB101 Zellen gegeben.

12 transformierte amp^R Kolonien werden einzeln in LB-Medium, das 100 µg/ml Ampicillin enthält, gezüchtet. Plasmid-DNS wird nach der Methode von Holmes, u. a. (Anal. Biochem. 114 [1981] 193) hergestellt und durch die EcoRI und BamHI Restriktionsdigests analysiert. Ein Clon mit den erwarteten Restriktionsfragmenten wird isoliert und als pJDB207/PHO5 (Eco)-HIR bezeichnet.

IV) Ligation der UAS1PHO5-GAPDH-Hybridpromotoren an die Protein-Codierungsregion von Desulfatohirudin

15 µg von Plasmid pJDB207/PHO5(Eco)-HIR werden mit EcoRI und HindIII digeriert. Die DNS-Fragmente werden auf einem 1%igen Agarosegel in Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH8,3, getrennt. Das 643 bp Fragment wird von dem Gel isoliert, elektroeluiert und mit Ethanol ausgefällt. Die DNS wird in H₂O mit einer Konzentration von 0,1 pMol/µl resuspendiert.

6 µg von Plasmid pJDB207/PHO5-HIR werden bis zur Vollständigkeit mit den Restriktions-Endonukleasen HindIII und Sall digeriert. Das große 6,3 kb Fragment (Vectorteil) wird durch Weichagarosegel-Elektrophorese, Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation isoliert. Das Vector-DNS-Fragment wird in H₂O mit einer Konzentration von 0,05 pMol/µl resuspendiert.

10 µg von Plasmid pGAPDH-EL (siehe Beispiel 3dI) werden mit BglII und EcoRI digeriert. Das 266 bp BglII-EcoRI-Fragment wird auf einem 1,2%igen Agarosegel in Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH8,3, getrennt, von dem Gel elektroeluiert und mit Ethanol ausgefällt. Die DNS wird in H₂O mit einer Konzentration von 0,3 pMol/µl resuspendiert.

0,3 pMol des 548 bp Sall-BglII-Fragments, das UAS1(PHO5) aufweist (Beispiel 3dII), 0,3 pMol des 266 bp BglIII-EcoRI-Fragments von pGAPDH-EL, 0,3 pMol des 643 bp EcoRI-HindIII-Fragments von pJDB207/PHO5(Eco)-HIR und 0,12 pMol des 6,3 kb Sall-HindIII-Vectorfragments werden in 20 µl von 60 mM Tris, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM ATP und 400 U von T4-DNS-Ligase (Biolabs) 6 h lang bei 15°C ligiert. Aliquoten von 1 µl und 3 µl des Ligationsgemisches werden zu 100 µl mit Calcium behandelten *E. coli* HB101 Zellen gegeben. Die Plasmid-Isolierung von amp^R-Kolonien und die Restriktionsanalyse mit Sall, BglII, EcoRI und HindIII werden nach obiger Beschreibung vorgenommen (siehe Beispiel 3dIII). Es wird ein positives Clon ausgewählt und als pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1) bezeichnet. Eine analoge Konstruktion wird mit dem aus pGAPDH-FL isolierten 201 bp BglII-EcoRI-Fragment ausgeführt. Ein ausgewähltes Plasmid wird pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1) genannt.

V) Ligation des UAS1(PHO5)-UAS2(PHO5)-GAPDH-Hybridpromotors an die Protein-Codierungsregion von Desulfatohirudin

3 µg von jedem der Plasmide pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1) und pJDB207/PAPFL-HIR(UAS1) werden mit BglI digeriert. Nach der Phenolextraktion und der Ethanolpräzipitation werden die vertieften 3'-Enden der DNS in einer Reaktion mit *E. coli* DNS-Polymerase (Klenow Fragment; Bethesda Research Laboratories) nach Maniatis, u. a. (supra) gefüllt. Das Enzym wird bei 70°C 10 min lang inaktiviert. Die DNSn werden weiter mit Sall digeriert, und die großen 7,2 kb Fragmente werden durch

Weichagarosegel-Elektrophores, Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation isoliert. Jedes Fragment wird in H₂O mit einer Konzentration von 0,05 pMol/µl resuspendiert. Die Fragmente enthalten die Hirudin-Codierungsregion, den größten Teil der Vectorsequenzen und eines der beiden unterschiedlichen aus pGAPDH-EL oder pGAPDH-FL isolierten GAPDH-Promotorelemente.

Plasmid p31/Y (EU-PA 100.561) wird mit BstEII digeriert, mit *E. coli* DNS-Polymerase (Klenow-Fragment) nach obiger Beschreibung inkubiert und mit Sal gespalten. Das 649 bp Fragment wird auf einem Weichagarosegel abgetrennt und durch Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation zurückgewonnen.

0,3 pMol des 649 bp Fragmentes von p31/Y, daß das UAS1-UAS2(PHO5)-Promotorelement aufweist, und 0,15 pMol von einem der 7,2-kb-Fragmenten werden ligiert und in *E.coli* HB 101 nach obiger Beschreibung transformiert. Plasmide werden von *amp^R* Kolonien hergestellt und durch Restriktionsdigests analysiert.

Einzelne Clone werden ausgewählt und ihre Plasmid-DNSn werden als pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1 + UAS2) und pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1 + UAS2) bezeichnet.

Beispiel 6: Eine 31-bp-DNS-Sequenz reicht aus, um als ein Phosphat-Kontrollelement zu wirken

Eine 31 bp Sequenz von der Upstream-Region des PHO5-Promotors (Positionen -381 bis -351), definiert durch die beiden flankierenden Deletionen Δ 10 und Δ 13 (siehe Beispiel 1f) könnten möglicherweise ein Regulatorsignal enthalten. Das kann durch chemische Synthesierung zweier komplementärer Oligonucleotide der folgenden Struktur getestet werden:

5'-AATTCGAAATATAATTAAATTAGCACGTTTCGAG-3'

3'- GCTTATATATAATTAAATCGTGCAGAGCGTCAA-5'

Diese Sequenz enthält die 31 bp Sequenz, flankiert von EcoRI-Restriktionsstellen. Die EcoRI-Stellen ermöglichen eine einfache Polymerisation der Sequenz zur Bildung von Multimeren.

a) Clonierung des 31 bp Elementes in Vector LT98

50 pMol der beiden synthetischen Oligonucleotide werden jeweils in 20 ml von 60 mM Tris, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0,5 mM ATP und 20 U von T4-Polynukleotid-Kinase (Boehringer) kinasiert. Nach 45 min bei 37°C werden die beiden Reaktionsgemische zusammengenommen, 10 min lang auf 75°C erhitzt und zum Abkühlen auf Raumtemperatur stehen gelassen. Die gehärteten Oligonucleotide werden bei -20°C aufbewahrt. 7,5 pMol der kinasierten und gehärteten Oligonucleotide werden 30 min lang nach obiger Beschreibung (Beispiel 5III) in einem Gesamtvolume von 15 μ l ligiert. Danach werden 5 μ l von EcoRI-unterbrochener LT98 Vector-DNS (Dixon, u. a., Gene 25, 189 [1983]) zugegeben (0,075 pMol), und die Inkubation wird über insgesamt 6 Stunden fortgesetzt. Nach der Transformation in *E.coli* HB 101 werden Plasmide isoliert und durch Digestion mit BamHI analysiert. Durch diese Analyse werden Daten über die Gesamtlänge des Inserts gewonnen und die Schätzung der Anzahl von clonierte EcoRI-Fragmenten ermöglicht. Einzelne Plasmide mit 1, 2, 3, 4, oder 5 EcoRI-Fragmenten werden ausgewählt, und die DNS-Sequenzierung (Sanger-Methode) zeigt, daß die multiplen 31 bp Elemente in Kopf-Schwanz-Orientierung cloniert wurden.

b) Clonierung in pJDB207

Die 31 bp Oligomere werden hinsichtlich ihrer Promotor-Kontrollfunktion getestet, indem sie oberhalb (upstream) des F-Elementes von dem GAPDH-Promotor eingefügt werden. Plasmid pJDB207/PAPEL-EGL(UAS1) wird verkürzt, um ein Plasmid zu erzeugen, bei dem das UAS1-Element deletiert ist: Das Plasmid wird mit Sall und BglII digeriert, auf Gel gereinigt, und das große Vectorfragment wird isoliert. In einem unabhängigen Reaktionsgemisch wird das gleiche Plasmid mit BamHI digeriert. Die vertieften 3'-Enden werden mit Klenow-DNS-Polymerase unter Verwendung aller vier dNTP's gefüllt. Die stumpfenden Stellen werden mit phosphorylierten Bgl II-Linkern (CAGATCTG, Biolabs) verlängert, und nach der Digestion mit Sall und BglII wird ein DNS-Fragment mit einer annähernden Länge von 400 bp durch Gelreinigung isoliert. Das große Vectorfragment wird mit dem annähernden 400 bp Sall-BglII-Fragment unter Verwendung von T4-DNS-Ligase ligiert. Nach *E.coli* HB 101 Transformation und Plasmid-Isolierung wird ein Plasmid ohne eine PHO5 UAS gewonnen. Dieses Plasmid wird pJDB207/GAPFL-EGL genannt. Dieses Plasmid wird mit BglII digeriert und dient als Vector zur Clonierung der 31 bp Oligomere. LT98, das 1, 2, 3, 4, oder 5 Oligonukleotid-Inserts enthält, wird mit BamHI digeriert. Die Fragmente verschiedener Größen werden mit Hilfe der Gelreinigung isoliert und unabhängig mit dem BglII-unterbrochenen pJDB207/GAPFL-EGL ligiert. Das Ligationsgemisch wird mit BglII digeriert, um unerwünschten religierten Vector ohne DNS-Insert zu entfernen, und wird danach zur Transformation von *E.coli* HB 101 verwendet. Die gewonnenen Plasmide werden durch Restriktionsanalyse mit Sall und DraI (einer Stelle innerhalb des GAPDH-Promotorteiles) analysiert. Nach der Transformation von Hefestamm GRF18 werden Eglin C Titer nach der Beschreibung in Beispiel 4c bestimmt. Die folgenden spezifischen Aktivitäten werden nach einer Fermentationszeit von 46 Stunden gemessen:

Clon pJDB207/	Anzahl von 31 bp Inserts	Orientie- rung*	Eglin C Titer schwaches P _i	(mg/1/OD) starkes P _i
PAPFL(+)-EGL	1	→	9,2	5,2
PAPFL(-)-EGL	1	←	10,2	2,1
PAPFLII(+)-EGL	2	→	10,2	3,5
PAPFLIII(-)-EGL	3	←	11,2	1,4
PAPFLIV(+)-EGL	4	→	10,7	1,5
PAPFLIV(-)-EGL	5	←	12,6	1,4

* → gleiche Orientierung wie in PHO5-Promotor

← umgekehrte Orientierung wie in PHO5-Promotor

Beispiel 7: Expression von insulinartigem Wachstumsfaktor I (IGF-I) aus einem PAPFL-Promotor

In der EU-PA 123.228 beschriebenes Plasmid pAB113-IGF-1 wird mit PstI digeriert. Zwei synthetische Oligonukleotide (50 pMol) je mit der Formel

AATTGATGAGATTCCTCAATTTTACTGCA
GTACTCTAACAGGAAGTTAAAAATG

werden jeweils kinasiert und nach obiger Beschreibung gehärtet. Der gehärtete doppelsträngige Adapter wird mit dem PstI-unterbrochenen Plasmid ligiert, mit EcoRI und BamHI digeriert, und das etwa 800 bp EcoRI-BamHI-Fragment wird durch Gelreinigung isoliert. Plasmid pJDB207/PAPFL-EGL (UAS1) wird mit Sall und EcoRI digeriert, und das etwa 700 bp Fragment wird durch Gelreinigung isoliert. Bei einer dreimaligen Ligation werden 0,5 μ g von Plasmid pC1/1 (EU-PA 123.288; digeriert mit BamHI und Sall, Vector gelgereinigt) mit 100 ng von jedem der beiden kleineren Gene bzw. Promotorteile ligiert. Nach der *E.coli* Transformation werden die Plasmide durch EcoRI, BamHI und Sall Digestion analysiert. Durch die Transformation von Hefestamm AB103 [hinterlegt bei ATCC unter Nr. 20673; Abortion von pYIGF-1-10/1 durch gezüchtete Hefezellen in einem Komplexmedium über Nacht und Prüfen einzelner Kolonien auf das Vorhandensein des IGF-1-Plasmids durch Kolonie-Hybridisierung nach der Beschreibung von Hinnen, u. a. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929 (1929)]] werden Transformatoren gewonnen, die IGF-1 nur unter induzierten (schwaches P_i) Bedingungen (1 mg/l) erzeugen, wie durch die herkömmliche

kompetitive Radioimmunoanalyse unter Verwendung von radiomarkiertem IGF-1 bestimmt wird (Anderson, u. a., in: Somatomedins/Insulin-Like Growth Factors [Somatomedine/insulinartige Wachstumsfaktoren], Spencer, E. M. Herausg., Walter de Gruyter, Berlin). Die Clones werden als pC1/1/PAPFL-IGF-1(UAS1) bezeichnet.

Beispiel 8: Expression von Gewebe-Plasminogen-Aktivator (t-PA) unter der Kontrolle eines PHO5-GAPDH-Hybridpromotors (siehe Fig. 10)

12 µg von Plasmid pJDB207/PHO5-TPA-18 (EU-PA 143.081) werden bis zur Vollständigkeit mit den Restriktions-Endonukleaseen Sall und Hind III digeriert. Die beiden resultierenden DNS-Fragmente werden auf einem 0,8%igen Agarosegel in Tris-Borat-EDTA-Sall und Hind III digeriert. Die Puffer, pH 8,3, getrennt. Das kleine 2,6 kb Sall-Hind II-Fragment wird durch Elektroeluiierung, Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation isoliert. Die DNS wird weiterhin mit Ball digeriert. Das 1,8 kb Fragment mit einem Teil der PHO5-Signalsequenz, der Codierungssequenz t-PA und dem PHO5-Terminator wird isoliert und wie oben gereinigt und in H₂O mit einer Konzentration von 0,1 pMol/µl resuspendiert.

Das Hybridpromotorfragment wird von Plasmid pJDB207/PAPFL-HIR (UAS1 + UAS2) isoliert (siehe Beispiel 5V). 12 µm Plasmid-DNS werden mit Sal und Hind III digeriert. Das resultierende 1,5 kb Fragment wird weiter mit Ball digeriert. Ein den

Hybridpromotor und einen Teil der PHO5-Signalsequenz aufweisendes 920 bp Fragment wird auf einem 1,5%igen Agarosegel isoliert. Die DNS wird elektroeluiert, mit Phenol extrahiert und mit Ethanol ausgefällt und in H₂O mit einer Konzentration von 0,1 pMol/µl resuspendiert.

0,2 pMol des 920 bp Sall-I-Ball-I-Fragmentes, 0,2 pMol des 1,8 kb Ball-I-Hind III-Fragmentes und 0,1 pMol des Sall-I, Hind III gespaltenen Vectors pJDB207 werden 16 h lang bei 15°C in einem Gesamtvolumen von 10 µl ligiert. Eine 1-µl-Aliquote des

Ligationsgemisches wird zu 100 µl mit Calcium behandelten Transformations-kompetenten *E. coli* HB101 Zellen gegeben. 12 transformierte amp^R Kolonien werden individuell in LB-Medium, das 100 µg/ml Ampicillin enthält, gezüchtet. Plasmid-DNS wird nach der Methode von Holmes, u. a. (Anal. Biochem. 114, 193 [1981]) hergestellt und mit Hilfe von PstI und BamHI/EcoRI-Restriktionsdigests analysiert. Ein Clón mit den erwarteten Restriktionsfragmenten wird isoliert und als pJDB207/PAPFL-TPA(UAS1 + UAS2) bezeichnet.

Eine analoge Konstruktion wird für das UAS1 (PHO5)-Element ausgeführt: Ein 820 bp Sall-Ball-I-Fragment von pJDB207/PAPFL-HIR(UAS1) (Beispiel 5IV) wird isoliert und mit dem 1,8 kb Ball-I-Hind II-Fragment und dem Sall-I, Hind III-gespaltenen Vector ligiert.

Das resultierende Plasmid wird als pJDB207/PAPFL-TPA(UAS1) bezeichnet. Analoge Konstruktionen werden mit entsprechenden Fragmenten, die von pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1) oder pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1 + UAS2) isoliert wurden, vorgenommen (Beispiel 5). Die resultierenden Plasmide werden als pJDB207/PAPEL-TPA(UAS1) und pJDB207/PAPEL-TPA(UAS1 + UAS2) bezeichnet.

Beispiel 9: Expression von Polypeptiden unter der Kontrolle von PHO5-GAPDH-Hybridpromotoren

a) Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* GRF18:

Stamm *Saccharomyces cerevisiae* GRF18 (α , his3-11, his3-15, leu2-3, leu2-112 can^R) wird transformiert mit den Plasmiden

pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1)

pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1)

pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1 + UAS2)

pJDB207/PAPFL-HIR(UAS1 + UAS2)

pJDB207/PAPFLI(+)-EGL

pJDB207/PAPFLI(-)-EGL

pJDB207/PAPFLII(+)-EGL

pJDB207/PAPFLIII(-)-EGL

pJDB207/PAPFLIV(+)-EGL

pJDB207/PAPFLV(-)-EGL

pJDB207/PAPEL-TPA(UAS1)

pJDB207/PAPEL-TPA(UAS1)

pJDB207/PAPEL-TPA(UAS1 + UAS2)

pJDB207/PAPFL-TPA(UAS1 + UAS2)

pCI/1/PAPFL-IGF-1(UAS1)

wobei das von Hinnen, u. a. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929 [1981]) beschriebene Transformationsprotokoll angewandt wird. Transformierte Hefezellen werden auf Hefe-Minimalmediumplatten, denen Leucin fehlt, ausgewählt. Einzelne transformierte Hefekolonien werden isoliert und bezeichnet als

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1)

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPFL-HIR(UAS1)

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1 + UAS2)

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPFL-HIR(UAS1 + UAS2)

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPFLI(+)-EGL

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPFLI(-)-EGL

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPFLII(+)-EGL

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPFLIII(-)-EGL

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPFLIV(+)-EGL

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPFLV(-)-EGL

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPEL-TPA(UAS1)

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPFL-TPA(UAS1)

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPEL-TPA(UAS1 + UAS2)

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PAPFL-TPA(UAS1 + UAS2)

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pCI/1/PAPFL-IGF-1(UAS1)

b) Fermentation der Transformanten

Zellen der *S. cerevisiae* GRF18 Transformanten werden jeweils in 10 ml Hefeminimalmedium (Difco, Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, der 2% Glucose und 20 mg/l L-Histidin zugesetzt werden) in einem 50-ml-Erlenmeyerkolben 24 Stunden lang bei 30°C unter Schütteln bis zu einer Dichte von 3×10^7 Zellen/ml gezüchtet. Die Zellen werden in 0,9%igem NaCl gewaschen und zum Impfen von 50 ml eines schwachen P_i Minimalmediums, verwendet, daß nach der Rezeptur des Difco Yeast Nitrogen Base Mediums (ohne Aminosäuren) hergestellt wurde, aber 0,03 g/l KH₂PO₄, 1 g/l KCl und 10 g/l L-Asparagin anstelle von (NH₄)₂SO₄, 2% Glucose und 1 g/l L-Histidin enthält. Die Kulturen werden bis zu einer Zelldichte von 4×10^6 Zellen/ml inkuliert und bis zu 42 Stunden lang bei 30°C mit 200 U/min bewegt.

c) Titer von verwirklichten Genprodukten

Hefe scheidet Desulfatohirudin-Verbindungen in der Nährflüssigkeit aus. Nach einer Fermentationsdauer von 22 h wird eine 10-ml-Probe von einem Kulturmedium entnommen und durch Entsalzen und Konzentrieren auf einer Bond Elut C-18 Säule (1 ml, Analytiohem International) in bezug auf Proteine angereichert. Die Säule wird zweimal mit 1,5 ml Wasser-Acetonitril (9:1) — 0,1% Trifluoressigsäure gewaschen. Desulfatohirudinverbindungen werden aus der Säule mit Wasser-Acetonitril-0,1% Trifluoressigsäure (6:4, V/V) eluiert. 2 ml Eluat werden auf einem Speed Vac Konzentrator (Savant) bis zu einem endgültigen Volumen von 400 µl eingeeengt. Desulfatohirudin wird durch HPLC-Analyse, durch Vergleich mit authentischem Desulfatohirudin und mit Hilfe der Thrombin-Inhibitionssanalyse identifiziert (siehe M. U. Bergmeyer [Hg.] Methods in Enzymatic Analysis, Bd. II, S. 314–316, Verlag Chemie, Weinheim [BRD] 1983).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Sekretion von Desulfatohirudin in die Nährflüssigkeit durch den mit verschiedenen Plasmiden transformierten Stamm *S. cerevisiae* GRF18

Plasmid	Desulfatohirudin (mg/l Nährflüssigkeit/OD ₆₀₀)
pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1)	2,0
pJDB207/PAPFL-HIR(UAS1)	2,2
pJDB207/PAPFL-HIR(UAS1 + UAS2)	3,0
pJDB207/PAPEL-HIR(UAS1 + UAS2)	2,8

Gewebe-Plasminogen-Aktivator (t-PA) sammelt sich in den Hefezellen an. Zellextrakte werden hergestellt, und die t-PA-Aktivität wird wie folgt bestimmt: Zellen von 35 ml schwachem P_i-Kulturmedium (B. Meyhak, u. a., EMBO-J. 1, [1982]) mit einer Zelldichte von 1 bis 2×10^7 /ml werden durch Zentrifugieren in einem Sorvall-Rotor SS34 über einen Zeitraum von 10 min bei 3000 U/min gesammelt. Die Zellen werden in einem Puffer, der die Salzkomponenten des Kulturmediums (d. h. ohne Aminosäuren, Glucose, Vitamine, Spurenelemente) enthält, gewaschen. Die Zellen werden 5 min lang bei Raumtemperatur mit 3000 U/min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen werden in einem Gesamtvolumen von 4 ml kaltem 66 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4, und 0,1% (V/V) Triton X-100 resuspendiert. Die Zellsuspension wird in ein 30-ml-Corex-Röhrchen übertragen, 8 g Glasperlen (Durchmesser 0,4 mm) werden zugegeben, und die Suspension wird auf einem Vortex Mixer 4 min lang bei voller Geschwindigkeit geschüttelt und anschließend in einem Eisbad abgekühlt. Mehr als 90% der Zellen werden durch diese Verfahrensweise zerbrochen. Zellbruchstücke und Glasperlen werden durch 10 min Zentrifugieren bei 4°C mit 8000 U/min in einem Sorvall-Rotor HB-4 sedimentiert. Die überstehende Flüssigkeit wird in Eppendorf-Röhrchen übertragen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -60°C aufbewahrt.

Die t-PA-Aktivität wird nach der Methode von Rånby (Biochem. Biophys. Acta 704, 461 [1982]) mit leichten Modifikationen bestimmt. D-Val-Leu-Lys-pNA (Kabi S-2251) wird als Substrat verwendet. Die Absorption bei 405 nm wird durch unspezifische Spaltung korrigiert und zu einem Urokinase-Standard in Beziehung gesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 enthalten

Tabelle 2: t-PA-Aktivität in *S. cerevisiae* Stamm GRF18, transformiert mit verschiedenen Plasmiden

Plasmid	t-PA-Aktivität (I. U./l Hefezellenkultur/OD ₆₀₀)
pJDB207/PAPFL-TPA(UAS1)	300
pJDB207/PAPFL-TPA(UAS1 + UAS2)	200

Beispiel 10: Isolierung und Charakterisierung von IGF-1 von einem transformierten Hefestamm

a) Isolierung von IGF-1 aus dem Kulturmedium:

Hefestamm pC1/1/PAPFL-IGF-1(UAS1) wird 60 h lang gezüchtet. 3 l Nährflüssigkeit werden geerntet und wie in Beispiel 9 beschrieben zentrifugiert. Die Analyse durch Umkehrphasen-HPLC von 2 ml überstehender Flüssigkeit (Konz. 1:10) ergibt einen Titer von 1 mg/l IGF-1. Die überstehende Flüssigkeit wird mit 20 ml SP-Sephadex C-24 (Pharmacia) bei einem pH von 3,0 behandelt und 60 min lang bei 4°C gerührt. Das adsorbierte IGF-1 wird durch einen Natriumacetat-Puffergradienten (50 mM, pH 3,0, bis pH 9,0) aus dem gewaschenen Harz eluiert und durch zwei Ionenaustauschschrifte weiter gereinigt: Der erste Schritt wird auf einer CM-52-Säule (Whatman, 1,5 cm × 8,5 cm, Gradient, Puffer A, 20 mM NH₄OAc, pH 4,0; Puffer B 100 mM NH₄OAc, pH 6,8) ausgeführt. Der zweite Schritt wird auf einer DE-53 Anionenaustauschsäule (Whatman) vorgenommen (Bedingungen: 1,5 cm × 10,5 cm Säule, Fließen 1 ml/min, Gradient, Puffer A 20 mM NH₄OAc, pH 9,0; Puffer B 200 mM NH₄OAc, pH 6,5). Die endgültige Reinigung wird auf einer semipräparativen RP-HPLC-Säule ausgeführt. Die aktive Fraktion eluiert mit einer Retentionszeit von 21,3 min und ergibt 1,1 mg 95% reines IGF-1.

Versuchsbedingungen: Vydac 218 TP 510 RP-HPLC-Säule, 10 × 250 mm; aliquote Portionen (200 µl 1:10 konzentriert) je Trennung: AUFS 0,5 bei 220 nm; Fließgeschwindigkeit: 3 ml/min. Eluierungsmittel: A: 0,1%ige Trifluoressigsäure, B: Acetonitril/Wasser 8:2 + 0,07%ige Trifluoressigsäure, 3 min 35% B, dann Zunahme im Laufe von 30 min auf 45% B. Die resultierenden Fraktionen werden 1:1 mit Wasser verdünnt und lyophilisiert.

b) Charakterisierung von IGF-1 aus der Fermentation des Stammes pC1/1/PAPFL-IGF-1(UAS1)

Nach der RP-HPLC-Analyse ist aus dem Kulturmedium isoliertes IGF-1 (siehe Beispiel 10a) mit authentischem IGF-1 aus Serum identisch.

Isoelektrischer Punkt pl: 8,6 (Isoelektrische Fokussierung, TCA Präzipitation des Proteins).

Bestimmung der Aminosäure-Zusammensetzung

Annähernd 2,5 µg des reinen IGF-1 werden 24 h lang mit 6N HCl bei 110°C hydrolysiert und dann nach der Beschreibung von Chang, u. a. (DABS-Cl-Methode; Methods in Enzymology 91, 41 [1983]) analysiert. Das Hydrolysat hat die folgende Zusammensetzung:

Aminosäure	Hydrolysat	Aminosäure	Hydrolysat
Asp	5,7 (5)	Ile	0,7 (1)
Thr	3,2 (3)	Leu	5,9 (6)
Ser	5,2 (5)	Tyr	2,8 (3)
Glu	6,5 (6)	Phe	3,9 (4)
Pro	5,3 (5)	His	— —
Gly	7,2 (7)	Lys	3,0 (3)
Ala	6,1 (6)	Arg	6,0 (6)
Val	2,7 (3)	Met	0,9 (1)
Cystin	2,2 (3)	gesamt	(70)

Partielle Sequenzanalyse

70 µg (10 nMol) des reinen IGF-1 werden einer herkömmlichen Sequenzanalyse nach Edman unterzogen. Die N-terminalen PTH-Aminosäuren werden mit Hilfe RP-HPLC bestimmt.

Ergebnisse:

Zyklus	1	5	10
Aminosäure	Gly-Pro-Glu-Thr-Leu-Cys ⁺ -Gly-Ala-Glu-Leu-		
Zyklus	11	15	20
Aminosäure	Val-Asp-Ala-Leu-Gln-Phe-Val-Cys ⁺ -Gly-Asp-		
Zyklus	21	25	30
Aminosäure	Arg-Gly-Phe-Tyr-Phe-Asn-Lys-Pro-Thr-Gly-		
Zyklus	31	35	40
Aminosäure	Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-		
Zyklus	41	45	50
Aminosäure	Thr-Gly-Ile-Val-Asp-Glu-n.d.-n.d.-Phe-Arg-		
n.d.:	Nicht bestimmt		

+: Cys (6) und Cys (18) wurden getrennt durch Carboxy-Methylierung mit Jodacetamid bestimmt.

Die Partalsequenz von Aminosäure 1 bis 50 ist somit mit der veröffentlichten Primärsequenz von authentischem IGF-1 identisch.
C-Terminal-Analyse

Das reine IGF-1 wird mit Carboxypeptidase Y digeriert, und die freigesetzten Aminosäuren werden in dem Aminosäure-Analyser bestimmt (siehe J. Y. Chang, R. Knedel, D. G. Braun. Biochem. J. 199, 547).

Ergebnisse:

Aminosäure 70
5 min Digestion: -Ala

120 min Digestion: Ser-Ala

Scheinbare relative Molekulmasse

Die IGF-1 (30 µg) wird auf einem SDS-Harnstoff-Gel (SUDS-Gel; siehe Kyte, u. a., Anal. Biochem. 133, 515 [1983]) analysiert. Es wird eine einzige, einer scheinbaren relativen Molekulmasse von 6000 bis 7000 Dalton entsprechende Bande beobachtet.

Bestimmung der relativen Molekulmasse durch FAB-MS

Das IGF-1 wird der positiven Ionen-Massenspektroskopie mit schneller Atombombardierung (FAB-MS) unterzogen. Instrument: ZAB-HF-Massenspektrometer von VG-Analytical Ltd. Manchester; Matrix: Thioglycerol; Xenon-Bombardierung; Ionenenergie 3 KeV; externe Kalibrierung: Cs₃₀J₂₉ (relative Molekulmasse: 7667,4)

Empirische Formel: C₃₃₁H₅₁₈N₉₄O₁₀₁S₇

Relative Molekulmasse (berechnet): 7 648,71

Relative Molekulmasse (gefunden): 7 648,07

Fig. 1: DNA sequence of the BamHI-SalI restriction fragment of PH05 including the PH05 promoter region

BamHI
↓
GG

-540	-530	-520	-510	-500	
ATCCGAAAGT TGTATTCAAC AAGAATGCAG AAATATGTCA ACGTATTGG					
-490	-480	-470	-460	-450	
AAGTCATCTT ATGTGCGCTG CTTTAATGTT TTCTCATGTA AGCGGACGTC					
-440	-430	-420	-410	-400	
GTCTATAAAC TTCAAACGAA GGTAAAAGGT TCATAGCGCT TTTTCTTTGT					
-390	-380	-370	-360	-350	
CTGCACAAAG AAATATATAT TAAATTAGCA CGTTTCGCA TAGAACGCAA					
-340	-330	-320	-310	-300	
CTGCACAATG CCAAAAAAAG TAAAAGTGAT TAAAAGAGTT AATTGAATAG					
-290	-280	ClaI -270	-260	-250	
GCAATCTCTA AATGAATCGA TACAACCTTG GCACTCACAC GTGGGACTAG					
-240	-230	-220	-210	-200	
CACAGACTAA ATTTATGATT CTGGTCCCTG TTTTCAAGA GATCGCACAT					
-190	-180	BstEII-170	-160	-150	
GCCAAATTAT CAAATTGGTC ACCTTACTTG GCAAGGCATA TACCCATTG					
-140	-130	-120	-110	-100	
GGATAAGGGT AAACATCTT GAATTGTCGA AATGAAACGT ATATAAGCGC					
-90	-80	-70	-60	-50	
TGATGTTTG CTAAGTCGAG GTTAGTATGG CTTCATCTCT CATGAGAATA					
-40	-30	-20	-10	-1	10
AGAACAAACAA CAAATAGAGC AAGCAAATTC GAGATTACCA <u>ATGTTAAAT</u>					
20	30	40	50	60	
CTGTTGTTA TTCAATTAA GCCGCTTCTT TGGCCAATGC AGGTACCATT					
70	80	SalI			
CCCTTAGGCA AACTAGCCGA TGTCGAC					

Fig. 2: The promoter region of the GAPDH gene

TaqI -670 -660 -650 -640
↓
TCGAGT TTATCATTAT CAATACTCGC CATTCAAAG AATACGTAAA
-630 -620 -610 -600 -590
TAATTAATAG TAGTGATTT CCTAACTTTA TTTAGTCAAA AAATTAGCCT
-580 -570 -560 -550 -540
TTTAATTCTG CTGTAACCCG TACATGCCAA AATAGGGGGC GGGTTACACA
-530 -520 -510 -500 -490
GAATATATAA CACTGATGGT GCTTGGGTGA ACAGGTTAT TCCTGGCATC
-480 -470 -460 -450 -440
CACTAAATAT AATGGAGCCC GCTTTTAAG CTGGCATCCA GAAAAAAA
-430 -420 -410 -400 -390
GAATCCCAGC ACCAAAATAT TGTTTCTTC ACCAACCATC AGTCATAGG
-380 -370 -360 -350 -340
TCCATTCTCT TAGCGCAACT ACAGAGAACCA GGGCACAAAC AGGCAAAAA
-330 -320 -310 -300 -290
CGGGCACAAAC CTCAATGGAG TGATGCAACC TGCCTGGAGT AAATGATGAC
-280 -270 -260 -250 -240
ACAAGGCAAT TGACCCACGC ATGTATCTAT CTCATTTCT TACACCTTCT
-230 -220 -210 -200 -190
ATTACCTCTCTG GCTCTCTCTG ATTTGGAAAA AGCTGAAAAA AAAGGTTGAA
-180 -170 -160 -150 -140
ACCAAGTTCCC TCAAATTATT CCCCTACTTG ACTAATAAGT ATATAAAGAC
-130 -120 -110 -100 -90
GGTAGGTATT GATTGTAATT CTGTAATCT ATTTCTAAA CTTCTTAAAT
-80 -70 -60 -50 DraI -40
TCTACTTTA TAGTTAGTCT TTTTTTAGT TTTAAAACAC CAAGAACTTA
-30 TaqI -20 -10 -1
↓
GTTTCAATA AACACACATA AATAAACAAA ATG

Fig. 3: Construction of plasmid pGAPDH-EL

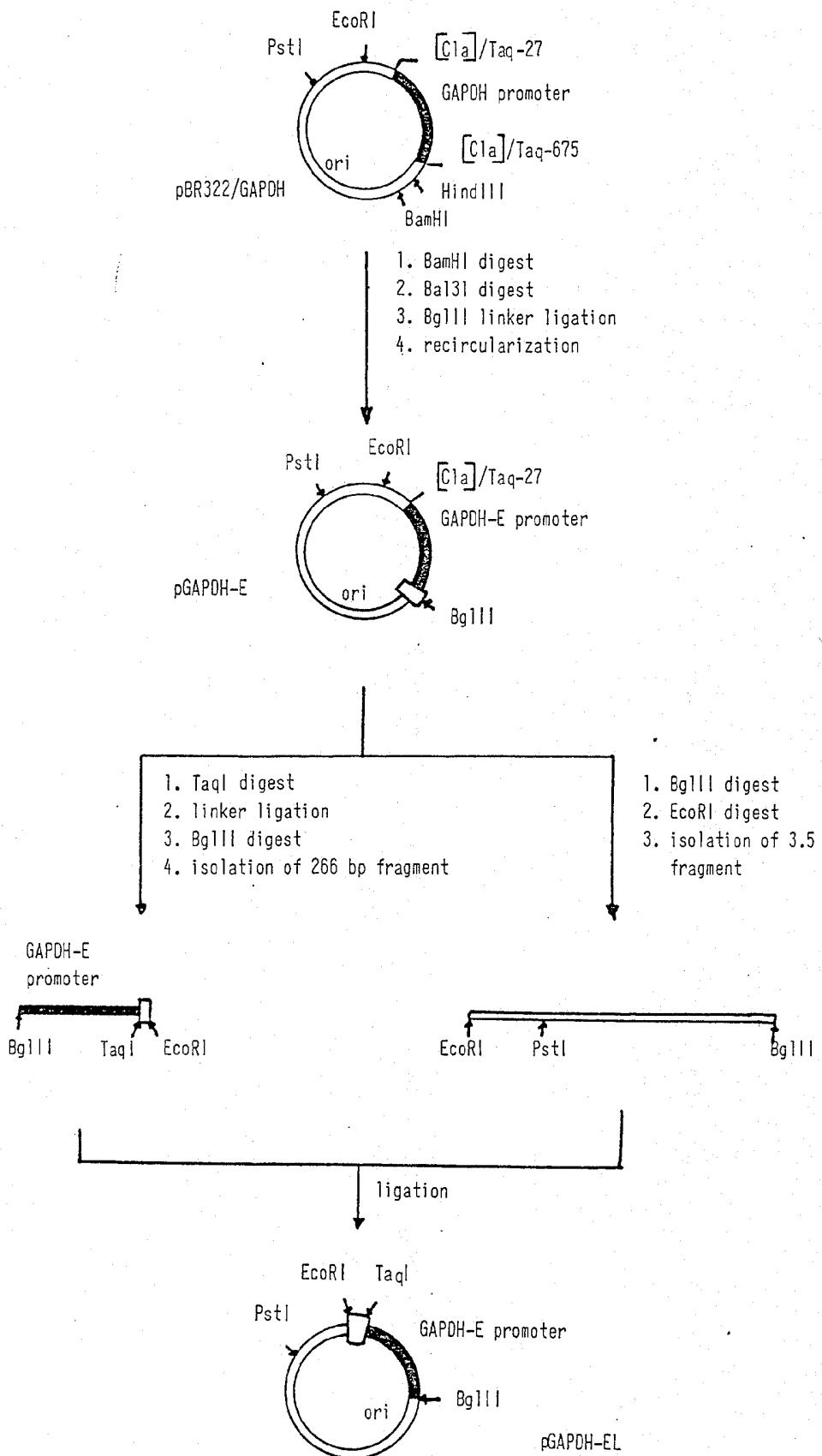


Fig. 4: Sequence of BglII-EcoRI fragments from plasmids pGAPDH-FL and pGAPDH-EL, respectively, comprising part of the GAPDH promoter

a. pGAPDH-FL

5'-GATC TGCTGAAAAA AAAGGTTGAA
ACCAGTCCCC TCAAATTATT CCCCTACTTG ACTAATAAGT ATATAAAGAC
GGTAGGTATT GATTGTAATT CTGAAATCT ATTTCTTAAA CTTCTTAAAT
TCTACTTTA TAGTTAGTCT TTTTTTAGT TTTAAACAC CAAGAACTTA
GTTTCAATA AACACACATA AATAAAG-3'

b. pGAPDH-EL

5'-GATCTGCAG ATGTATCTAT CTCATTTCT TACACCTTCT
ATTACCTTCT GCTCTCTCTG ATTTGGAAAA AGCTGAAAAA AAAGGTTGAA
ACCAGTCCCC TCAAATTATT CCCCTACTTG ACTAATAAGT ATATAAAGAC
GGTAGGTATT GATTGTAATT CTGAAATCT ATTTCTTAAA CTTCTTAAAT
TCTACTTTA TAGTTAGTCT TTTTTTAGT TTTAAACAC CAAGAACTTA
GTTTCAATA AACACACATA AATAAAG-3'

Fig. 5: Construction of plasmid pJDB207R/PHO5-EGL

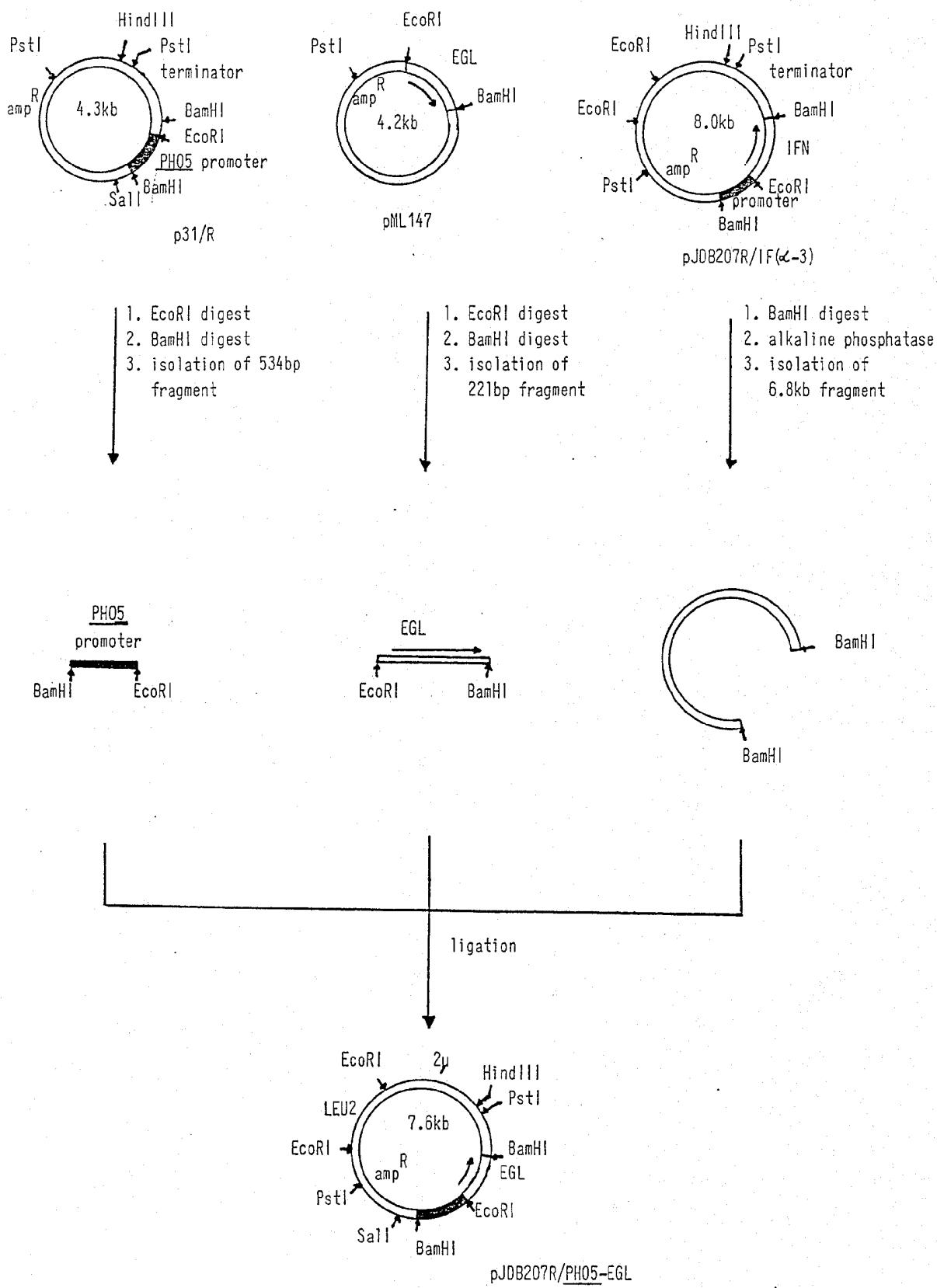


Fig. 6: Construction of plasmid pJDB207/PAPEL-EGL(UAS1) comprising a hybrid PHO5/GAPDH promoter

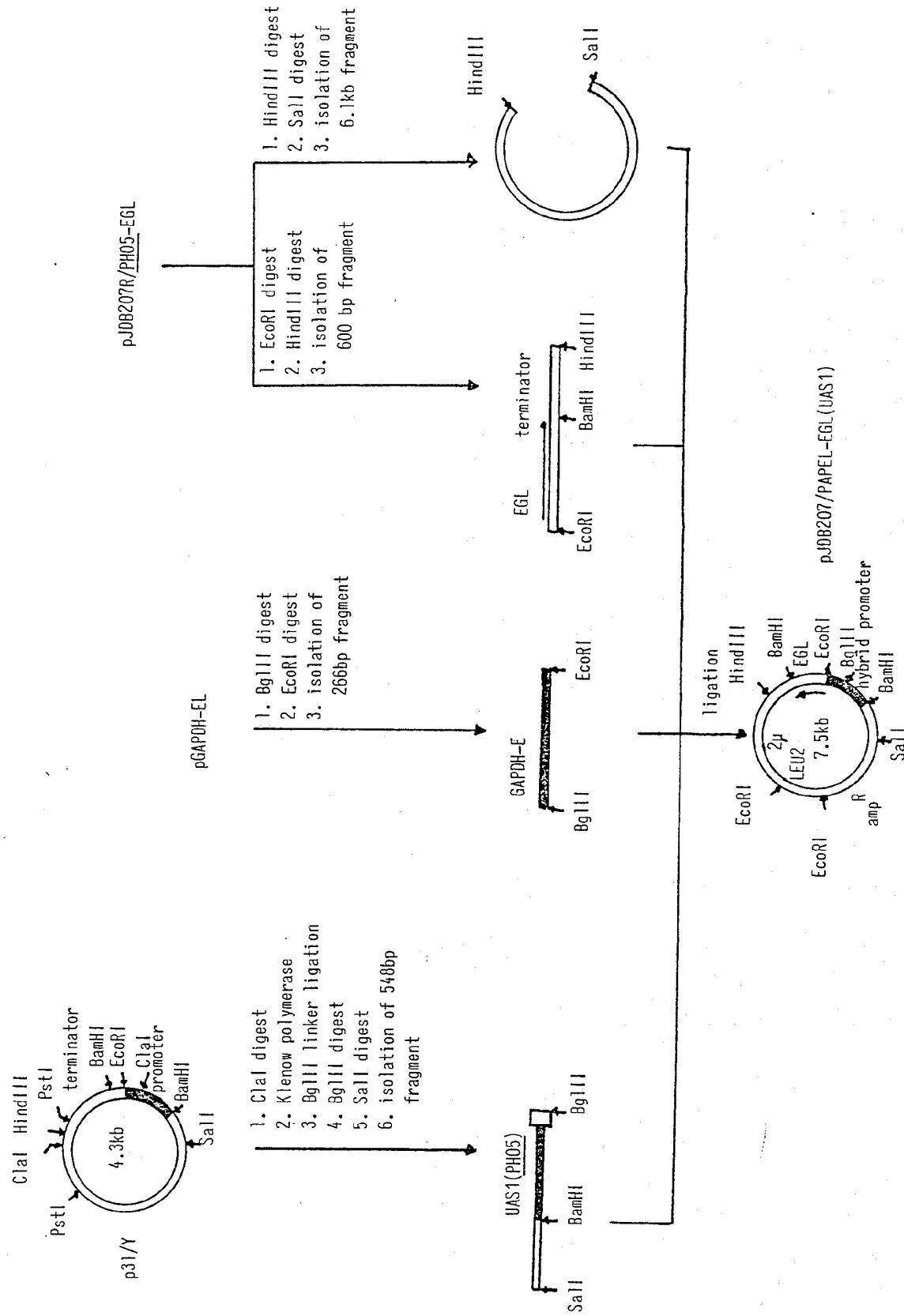
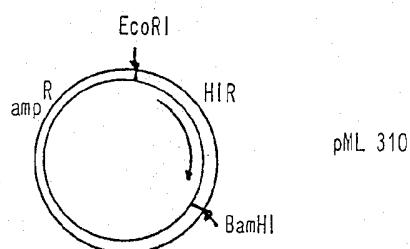
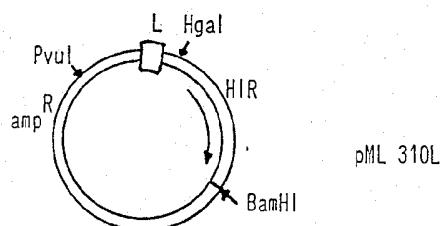


Fig. 7: Isolation of a DNA fragment coding for mature desulphatohirudin



1. EcoRI digest
2. nuclease S₁
3. alkaline phosphatase
4. ligation of linker (L)
Hgal
5'-AGCGTCGACGCT-3'
TCGCAGCTGCGA
5. isopropanol precipitation
6. circularization



1. BamHI digest
2. PvuI digest
3. Hgal digest
4. isolation of 0.2kb
Hgal-BamHI fragment

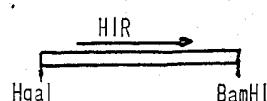


Fig. 8: Construction of expression plasmid pJDB207/PH05-HIR

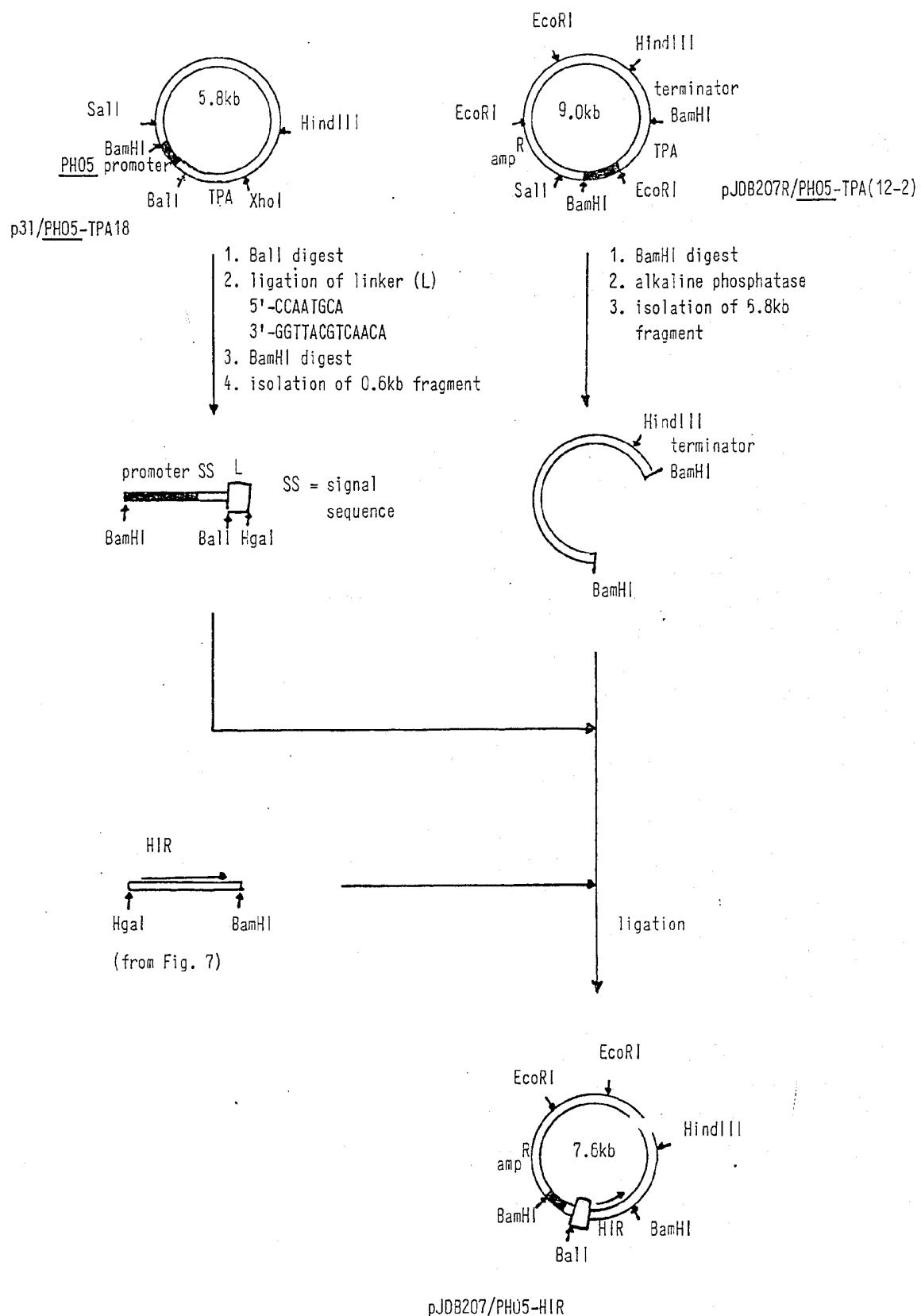


Fig. 9: Construction of plasmid pJDB207/PH05(Eco)-HIR

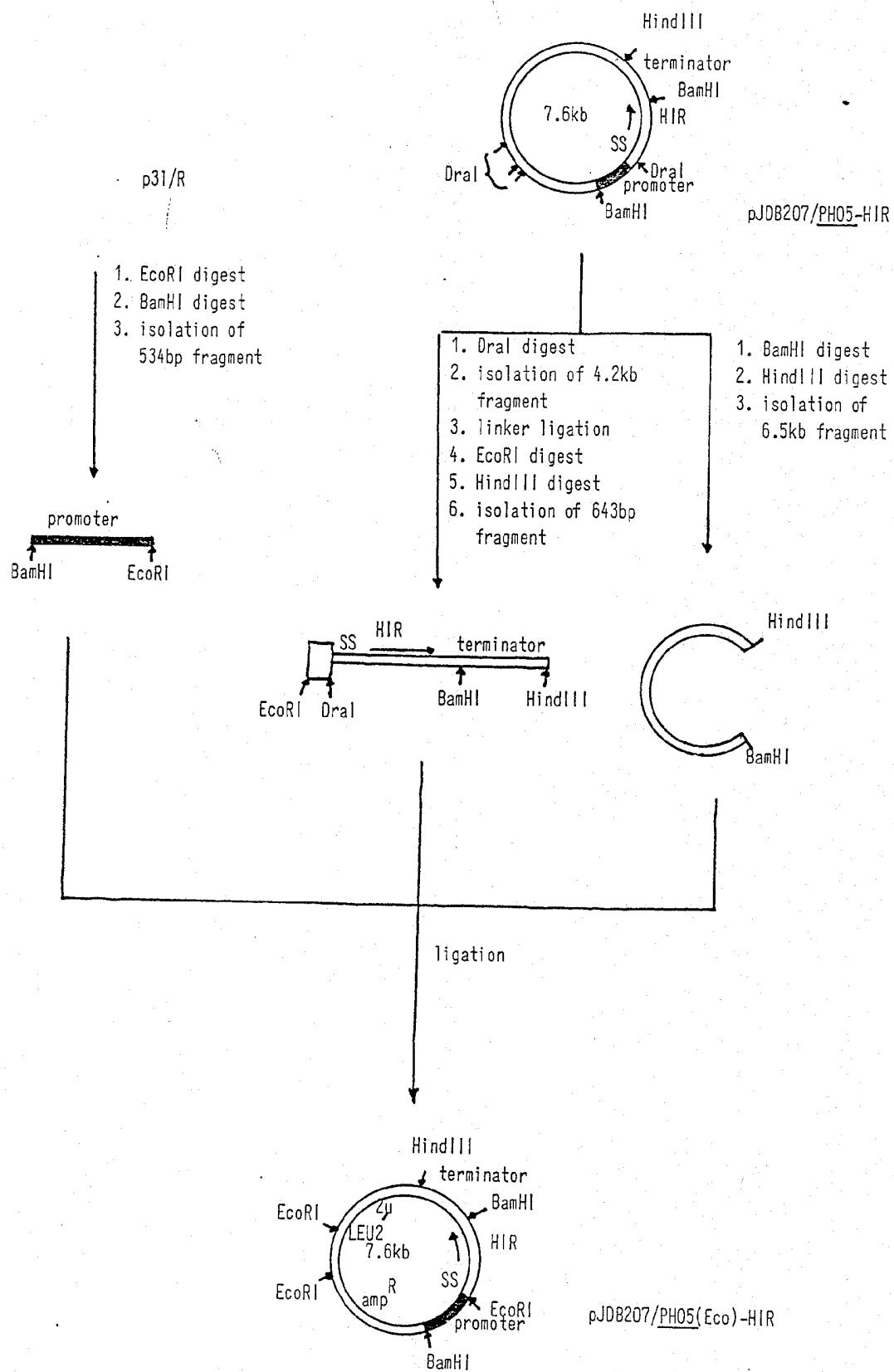


Fig. 10: Construction of plasmid pJDB207/PAPFL-TPA(UAS1+UAS2)

