

(19)



(10) **LT 3133 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patent numeris: **3133**

(51) Int.Cl.⁵: **C12N 15/63,**
C12N 1/20

(21) Paraiškos numeris: **IP237**

(22) Paraiškos padavimo data: **1992 12 11**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 07 15**

(45) Patent paskelbimo data: **1995 01 31**

(31,32,33) Prioritetas: **P9102765, 1991 12 12, ES**

(72) Išradėjas:

Jose Daza Ortega, ES

Jose Antonio Gil, ES

Tomas Vigal Garcia, ES

Juan Francisco Martin, ES

(73) Patent savininkas:

Laboratorios Serono S.A., c/Genova 17, 28004 Madrid, ES

(74) Patentinis patikėtinis:

Marius Jakulis-Jason, 3, A.A.A.Baltic Service Company, Rūdninkų g. 18/2-12, 2001 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

P0438, naujas kalcio reguliavimo promotorius

(57) Referatas:

Čia atskleistas naujas kalciu reguliuojamas promotorius, kurį galima panaudoti neląstelių fermentų arba heterologinių polipeptidų gamybos padidiniui, rekombinanto vektorius, kuriame yra DNR seka promotoriaus, efektyviai sujungto su DNR seka, užkoduojančia minėtą fermentą arba polipeptidą ir šeimininko organizmą, transformuotą su rekombinanto vektoriumi, kuriame yra promotorius, operatyviai sujungtas su DNR, užkoduojančia minėtą fermentą arba polipeptidą. Šis išradimas taip pat skirtas *Streptomyces* ekspresijos sistemoms ir svetimų DNR sekų išreiškimo iš *Streptomyces* ir polipeptidų bei proteinų, užkoduotų šiom DNR sekoms, išskyrimo į supančią terpę, būdams.

Išradimas yra iš biotechnologijos srities. Tiksliau, jis skirtas naujam kalciu reguliuojamam promotoriui, kuris naudojamas nelastelinių fermentų arba heterologinių polipeptidų gamybos padidinimui, rekombinanto vektoriui, į kurį įeina promotoriaus, operatyviai sujungto su DNR. (dezoksiribonukleininė rūgštimi), užkoduojančia anksčiau paminėtą fermentą arba polipeptidą, DNR seka, šeimininko organizmui, transformuotam rekombinanto vektoriumi, į kurį įeina šis promotorius, operatyviai sujungtas su DNR, užkoduojančia minėtą fermentą arba polipeptidą. Šis išradimas toliau skirtas *Streptomyces* ekspresijos sistemoms ir svetimų DNR sekų išreiškimo iš *Streptomyces* ir polipeptidų bei proteinų, už koduotų šiomis svetimomis DNR sekomis, išskyrimo į supančią terpę metodams.

Streptomyces bakterijos yra gerai žinomos įvairių nelastelinių fermentų, apimančių proteazes, fosfatazes, ksilanazes, celiuliazes, amilazes, lipazes ir nukleazes, gamintojos.

Dar daugiau, *Streptomyces* genties nariai gamina daugybę antibiotikų, pigmentų ir kitų antrinių metabolitų ir turi sudėtingą diferenciacijos struktūrą, besibaigiančią sporų susiformavimu. *Streptomyces* bandinių kultūrose paprastai yra atitikimas tarp nelastelinių fermentų gamybos, antibiotikų gamybos pradžios, pigmento biosintezės ir sporų susidarymo. Visi šie procesai yra slopinami maitinimo sąlygų, palankiai veikiančių didelius augimo greičius, ir veikiami priešingai, badaujant P, C arba N šaltiniams. Neįtikėtina, kad fermento išskyrimas, antrinių metabolitų susidarymas ir diferenciacija yra visiškai nepriklausomi, bet reaguoja į panašius paleidimo mechanizmus.

Buvo klonuoti keli *Streptomyces* genai, užkoduojantys neląstelinius fermentus. Jie apima agarazę, iš *Streptomyces coelicolor*, endoglikozidazę H iš *Streptomyces plicatus*, ksilanazę iš *Streptomyces lividans*, alfa-amilazę iš *Streptomyces hygroscopicus*, celiuliazę iš *Strep.spA2*, beta-galaktozidazę iš *Strep. lividans* ir beta-laktamazes iš *Strep. cacaoi*, *badius* ir *fradiae*.

10 Tačiau reguliavimo mechanizmai, kurie kontroliuoja šių genų ekspresiją, yra iš esmės nežinomi. Be specialių reguliavimo mechanizmų, tokių kaip amilazės indukcija dekstriniais ar maltotrioze ir amilazės ar agarazės anglies metabolinis reguliavimas, turbūt, iškyla bendri
15 kelių neląstelių fermentų skatinimo mechanizmai, kadangi *Streptomyces* buvo pastebėtas kelių polimerinio substrato degradavusių fermentų susidarymas tuo pačiu metu, sekant maitinimo poslinkį žemyn. Tokie reguliuojantys genai buvo rasti *Bacillus subtilis* (J. BACTERIOL 169:324-333, 1987), *Bacillus natto* (J. BACTERIOL 166:20-28, 1986) ir *Bacillus licheniformis*.

Teigiami reguliavimo genai, veikiantys fermentų sintezę ir/arba išskyrimą, gali būti klonuoti, ieškant
25 padidinto neląstelių fermentų išskyrimo prastuose sekreciniuose kamienuose, tokiuose, kaip *S. lividans*.

Svetimų DNR sekų išreiškimo iš *Streptomyces* sistemos buvo anksčiau aprašytos, pavyzdžiui, EP 148,552 ir WO
30 88/07079. Tos sistemos naudoja *Streptomyces* pagamintus neląstelių fragmentų endogeninius promotorius.

Endogeninių promotorių pakeitimas svetimais promotoriais buvo atskleistas WO 90/14426, kur
35 aprašomas naujai izoliuoto geno, *saf* geno, užkoduojančio naują polipeptidą, vadinamą *saf* polipeptidu, kuris tiesiai arba netiesiai moduliuoja

genų ekspresiją nelasteliniams fermentams iš *Streptomyces*, sąveikaujant su struktūrinių genų nelasteliniams fermentams kontroline sritimi, klonavimas ir charakterizavimas.

5

Buvo rasta, kad saf geno promotorius yra daug galingesnis už nelastelinių fermentų natūralų promotorių. Pvz., amilazės genas išskiria daug daugiau amilazės, kai saf promotorius pakeičia natūralų amilazės promotorių. Tuo būdu, saf promotorius gali būti panaudotas vietoj proteino natūralaus promotoriaus, kad padidintų bet kurio endogeninio polipeptido arba proteino ekspresiją.

15

Saf geno klonavimui ir charakterizavimui plazmidė pIJ702 (Katz ir kt. J. GEN.MICROBIOL.129:2703-2714,1983) buvo panaudota kaip klonavimo vektorius. Ši plazmidė turi savyje tirozinazės - fermento, atsakingo už melanino susidarymą iš triozino keliuose *Streptomyces* tipuose, geną. Buvo sudarytos mel lokuso plazmidėje pIJ702 sekos ir nustatyti du atviri skaitymo rėmai (ASR): pirmas ARS(ORF-angl.), atitinkantis mel geną, kuris koduoja polipeptidinę tirozinazės grandinę, ir antras ARS, išdėstytas mel genui prieš srovę, kuris buvo pavadintas ORF438 (Bernan ir kt. GENE 37:101-110,1985) ir kurio vaidmuo dar neaiškus.

20

25

Tyrinėjimuose, tiksliai nustatant saf geno vietą, i pIJ702 BglIII vietą buvo įterptas fragmentas *SstI-KpnI* (432 nukleotidai-saf genas be promotoriaus). Stebinantis šių tyrimų aspektas buvo šio fragmento ekspresijos nebuvimas, kai įterpiama tiesia orientacija, ir jo ekspresija, kai i ORF438 įterpiama priešinga kryptimi (prieš laikrodžio rodyklę). Šis atradimas reiškė fragmento su promotoriaus poveikiu buvimą prieš mel geną ir BglIII klonavimo vietoje, esančioje ORF438 viduje, su priešinga orientacija.

30

35

Pagrindinis šio išradimo tikslas yra pateikti naują promotorių, kuris buvo nustatytas DNR fragmente, esančiame pIJ702 plazmidės ORF438 viduje. Promotoriaus poveikis yra teigiamai reguliuojamas kalcio jonų, ir
5 genų ekspresija nelasteliniams fermentams iš *Streptomyces*, operatyviai sujungtiems su anksčiau minėtu promotoriumi, yra labai padidinama, dalyvaujant CaCl_2 tirpalams.

10 Kitas šio išradimo aspektas yra pateikti klonavimo nešėjus (vektorius), kurie apima aukščiau minėtą promotorių, operatyviai sujungtą su endogenine arba svetima DNR seka, užkoduojančia polipeptidą arba
15 proteiną, taip pat šeimininko organizmus arba ląsteles, transformuotas tokių klonuojančių nešėjų, dėl to sukeliančių ekspresiją ir polipeptidų, užkoduotų minėta DNR seka, išskyrimą.

Kitas šio išradimo aspektas yra tokio klonavimo nešėjo,
20 nešančio svetimą DNR seką, integracija į *Streptomyces* chromosominę DNR.

Dar vienas šio išradimo aspektas yra nelastelinio fermento, reikalingo polipeptido arba proteino
25 paruošimas, kultivuojant transformuotą šeimininko organizmą pagal šį išradimą ir išskiriant produktą iš šios kultūros skystos terpės.

Naujas promotorius, turėtas rėme ORF438, rodo
30 promotoriaus poveikį priešinga orientacija ORF438 orientacijai ir toliau yra vadinamas Po438 (Promotorius, priešingas ORF438). Žinios apie jo laikrodžio rodyklės krypties promotoriaus plazmidėje pIJ702 veiksmingumą yra labai svarbios, kad išvengtume
35 klaidingų interpretacijų DNR fragmentų, klonuotų šiame vektoriuje, genų ekspresijos tyrimuose.

Promotorius Po438 yra pirmas žinomas kalciu reguliuojamas promotorius, kuris buvo charakterizuotas *Streptomyces* ir gali būti panaudotas padidinti išrinktų heterologinių proteinų išskyrimą iš *Streptomyces*,
5 interpoliant DNR fragmentą, turintį savyje promotorių Po438, į tinkamą suskaidymo vietą prieš srovę genui, koduojančiam reikalingą proteiną tinkamame klonavimo nešėjuje, transformuojanti *Streptomyces* šeimininką su tokiais klonuojančiais nešėjais ir kultivuojanti
10 transformuotas bakterijas, dalyvaujant Ca^{2+} tirpalui, kad išskirtų pasirinktą proteiną arba jo dalį.

Po438 promotoriaus veiksmingumas buvo nustatytas, panaudojant du promotoriaus-bandinio vektorius. DNR
15 fragmentas, apimantis promotorių Po438, buvo subklonuotas dviejose skirtingose plazmidėse, nešančiose atitinkamai nestimuliuojanti aminoglikozido fosfotransferazės geną (*neo*) ir nestimuliuojanti katecholo dioksigenazės geną (*XylE*) (1 brėž.). Abu
20 genai išskiria labai daug kiekvieno fermento, dalyvaujant didėjančioms kalcio jonų koncentracijoms, tuo būdu, parodydami Po438 kalciu reguliuojama promotoriaus veiksmingumą.

25 Transkripcijos pradinis taškas Po438 promotoriuje buvo nustatytas, S1 nukleazės kartografiniu eksperimentu, kuris nustatė pradinį tašką C 24 nt. (angl.) nuo *SstI* vietos (fig. 4).

30 Nuorodos į pridedamus brėžinius:

Fig. 1. Plazmidžių *pULAD50* ir *pULAD51*, nešančių pIJ702 (apimančio Po438 242 bp *SstI*-*BglII* fragmentą, klonuotą p-promotoriaus-bandinio vektoriuose pIJ487 (Ward ir kt.
35 1986) ir pIJ4083, struktūra.

Fig. 2. pIJ702 242 bp *SstI*-*BglIII* frgmento promotoriaus veiksmingumas. Kanamicino gradientas (0-180 ug/ml - angl.) buvo nustatytas kietoje MM (minimalioje terpėje) (Hopwood, 1967) ir buvo štrichuotas (streaked - angl.) su *S. lividans*, nešančiais plazmidę pULAD50 (A) arba pIJ487 (B).

Fig. 3. pULAD50 srities, nešančios pIJ702 242 bp *SstI*-*BglIII* fragmentą, scheminis išdėstymas ir strategija, sekanti S1 kartografijai. Diagramoje baras, pažymėtas žvaigždutėmis, vaizduoja pažymėtą fragmentą, o baras su S1 vaizduoja gautą apsaugotą fragmentą. Takai A-C-G-T rodo keturias sekos reakcijas M13mp18 vienintelei atsajai DNR (dešinė) ir 242 bp *SstI*-*BglIII* fragmentui iš pIJ702 (kairė).

1 - Apsaugotas fragmentas hibridizacijoje tarp pULAD50 270 nt. *HindIII*-*SstI* fragmento ir mRNA iš *S. lividans* [pULAD50].

20 2 - 270 nt. *HindIII*-*SstI* bandinys.

3 - 242 nt. *BglIII*-*SstI* bandinys.

25 4 - Apsaugotas fragmentas hibridizacijoje tarp pIJ702 242 nt. *BglIII*-*SstI* fragmento ir mRNA iš *S. lividans* [pIJ702].

30 Rodyklių smaigaliai žymi hibridizacijos juostas, atitinkančias apsaugotiems fragmentams.

Fig. 4 DNR srities *mel* klasteryje, kuris apima ORF438, nukleotidų seka, pažyminti jos amino rūgšties seka. Yra parodytos *BglIII* ir *SstI* apribojimo vietos, kurios ribojasi su DNR fragmentu, klonuotu pIJ487, kad sudarytų pULAD50.

$\infty \rightarrow$ Mel matricos iniciavimas pagal Geistlich ir kt. (1989) ir Leu ir kt. (1989).

5 $\infty \rightarrow$ Transkripcijos iniciavimas iš Po438 pagal Slnukleazės kartografinius eksperimentus (Fig 3).

rbs ribosoma - surišanti vieta.

10 Fig. 5. Ekspresijos iš Po438 promotoriaus fosfato slopinimas. Neomicino gradientas (0-180 ug/ml) buvo padarytas ant kieto MM+TES (angl.) buferio 825 mM, pH 7,2 (viršutinė plokštelė) ir ant tos pačios terpės, papildytos 20 MM natrio fosfato buferiu, pH 7,2 (žemutinė plokštelė). Abi plokštelės buvo štrichuotos
15 su panašiu *S. lividans* [pULAD50] sporų kiekiu.

Fig. 6. *Pseudomonas putida* nestimuliuojančio XylE geno, patalpinto Po438 promotoriui pasroviui, kalcio indukcija *Streptomyces* bakterijose. *S. lividans* [pULAD51] buvo auginamos R2YE skystoje terpėje (•) be kalcio ir R2YE terpėje, papildytoje CaCl₂ iki 60 mM(Δ). *S. lividans*, transformuotų su pIJ4083 (o), katecholo dioksigenazės aktyvumas (Cat. O₂ azė) nebuvo keičiamas, kai buvo auginama R2YE terpėje su arba be CaCl₂.

25

Čia aprašomas darbas buvo atliktas, naudojant tokias medžiagas ir metodus.

30 Bakteriniai kamienai ir plazmidės. *Streptomyces* kamienai ir plazmidės, naudojami šiame tyrime, yra išvardinti 1-oje lentelėje.

35 Terpė ir auginimo sąlygos. Protoplast. *Streptomyces* kamienų transformacija buvo auginama R2YE, minimalioje terpėje (MM) arba YEME, papildytoje 34% sacharozės ir 5 mM MgCl₂ (Hopwood ir kt., Genetic manipulation of *Streptomyces*. A. LABORATORY MANUAL. The John. Innes

Foundation, Norwich, U.K., 1985). Skystos *Streptomyces* kultūros buvo auginamos kolbose su trimis pertvaromis 28°C temperatūroje besisukančiame kratytuve su 220 rpm (angl.) kratymu.

5

S. lividans protoplastų paruošimas ir transformacija buvo tokie, kaip aprašyta (Thompson ir kt., J. BACTERIOL. 151:668-677, 1982).

10

DNR izoliacija, manipuliacija ir DNR sekų sudarymas. Plazmidė DNR buvo atskirta, naudojant Kieser būdą (Kieser ir kt., PLAŽMID 12:19-36, 1984). Įsisavinimas ir ligavimas buvo kontroliuojami agarozės helio elektroforeze. Įsisavinimo sąlygos su endonukleazės apribojimu ir ligavimo reakcijos buvo tokios, kokios rekomenduotos gamintojų. DNR fragmentų subklonavimas buvo atliekamas, įsisavinant 1-2 ug DNR plazmidės su atitinkamu apribojančiu fermentu(-ais), ir reakcijos produktai buvo atskiriami helio elektroforeze žemame agarozės lydimosi taške (LMPA - angl.).

15

Nukleotidų seka buvo nustatyta Sanger grandinės nutrūkimo metodu (Sanger ir kt., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 74:5463-5467, 1977), naudojant M1 3 klonus (Messing ir kt., NUCL. ACIDS RES. 9:309-321, 1981).

25

RNR (ribonukleininės rūgštys) izoliacija ir S1 nukleazės kartografija. RNR buvo atskirta pagal Kirby (Kirby ir kt., Biochem J. 104:258-262, 1967) iš 50-ties valandos kultūrų MM terpėje. S1 kartografijai DNR bandiniai buvo galuose pažymėti (Maxam and Gilbert, METHODS ENZYMOL. 65:499-560, 1960). RNR (40 ug) buvo sumaišyta su 10^5 c.p.m. [32 P]-gale pažymėtu DNR fragmentu ir denatūruojama 85°C 15 min. (Favalora ir kt., METHODS ENZYMOL. 65:718-749, 1980). Hibridizacija buvo atliekama 60°C temperatūroje 3 valandas, apdorota su 60 vienetų S1 nukleazės ir S1 įsisavinimo produktas

30

35

buvo uždėtas ant 7% (w/v - angl.) poliakrilamido helio, turinčio 7M šlapalo ir lygiagrečiai leistas su M13 mp18 fagu ir pIJ702 242 bp BglIII-SstI fragmentu (sekos sudarytos Sanger metodu).

5

Katecholo dioksigenazės veiksmingumas. Plokštelių bandymuose *Streptomyces* transformanto kolonijos buvo augintos 28°C temperatūroje 3 dienas, ir plokštelės buvo apipurkštos 0,5 M katecholio vandeniniu tirpalu.

- 10 Skystiems bandiniams *Streptomyces* kamienai buvo auginti 28°C temperatūroje 50-tyje ml R2YE skystos terpės be CaCl₂ arba papildytos CaCl₂ (60 mM). Įvairiu laiku buvo imami bandiniai ir katecholo dioksigenazės veiksmingumas buvo nustatinėjamas taip, kaip aprašyta (Ingram
- 15 ir kt., J. BACTERIOL 171:6617-6624, 1989). Proteino koncentracijos buvo nustatinėjamos Bradfordo metodu, panaudojant jaučio serumo albuminą kaip etaloną (Bradford, ANAL.BIOCHEM. 72:248-254, 1976).

- 20 Tokie smulkūs aprašymai iliustruos šį išradimą:

Po 438 promotoriaus veiksmingumas

- Po438 promotoriaus veiksmingumas buvo nustatytas
- 25 aminoglikozido fosfotransferazės geno ir katecholo dioksigenazės geno, turėtų dviejuose skirtinguose promotoriuose-bandiniuose, ekspresija.

- Aminoglikozido fosfotransferazės geno ekspresija pIJ702
- 30 plazmidės 242 bp BglIII-SstI fragmentas buvo subklonuotas į pIJ487 (Ward ir kt., MOL.GEN.GENET. 203:468-478, 1986), kuris nešė nestimuliuojanti aminoglikozido fosfotransferazės geną (neo). Šio geno ekspresija palygina Kamicino (km) ir neomicino
- 35 atsparumą *Streptomyces lividans*. Taip buvo sukurta plazmidė pULAD50 (Fig. 1). *S. lividans*, transformuotos su pULAD50, galėjo augti minimalioje terpėje,

sudarytoje iš daugiau kaip 15 ug/ml Km, kur *S. lividans*, transformuotos su pIJ487 (promotoriaus-bandinio vektorius be įterpto promotoriaus) neaugo MM su 10 ug/ml Km, kaip parodyta fig. 2. Šis rezultatas
 5 aiškiai parodo, kad pIJ702 *Bgl*III-*Sst*I fragmentas turi promotoriaus veiksmingumą *Streptomyces* bakterijose su orientacija iš *Sst*I vietos į *Bgl*III vietą.

Katecholo dioksigenazės geno ekspresija. 242 bp *Bgl*III-*Sst*I fragmentas, kaip aukščiau pateiktame pavyzdyje,
 10 buvo subklonuotas į skirtingą promotoriaus-bandinio vektorių, plazmidę pIJ4083, kuri nešė *XylE* geną iš *Pseudomonas putida*, koduodama fermentui katecholo dioksigenazę. Hibridinė plazmidė buvo pavadinta pULAD51
 15 (fig. 1). *Streptomyces lividans*, transformuotos su pULAD51, buvo auginamos R2YE terpėje, papildytoje CaCl_2 iki 60 mM. Kiekybinis katecholo dioksigenazės veiksmingumo įvertinimas parodė, kad Po438 daro įtaką promotoriaus veiksmingumui taip pat, kai įterpiamas
 20 genui *XylE* prieš srovę (fig. 6).

Ekspresijos iš Po438 reguliavimas kalcio jonais

Buvo nagrinėjama įvairių kalcio jonų įtaka Po438
 25 promotoriaus veiksmingumui. Kadangi Katamicino atsparumo lygis priklauso nuo druskos kiekio auginimo terpėje (Hopwood ir kt., Genetic Manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual. The John Innes Foundation, Norwich, U.K., 1985), šiems tyrinėjimams
 30 buvo panaudotas neomicinas(neo) minimalioje terpėje. Visais atvejais MM buvo papildyta TES buferiu (25 mM, pH 7.2), kad būtų išvengta pH pasikeitimų. Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} katijonai neturi įtakos Po438 stiprumui (atsparumas 170 ug/ml Neo ant MM plokštelių), tuo
 35 tarpu, kai keli vienvalečiai katijonai (Na^+ , K^+ , Li^+ , Cs^+ , 10 mM) silpnai sumažina promotoriaus veiksmingumą, ir nebuvo augimo MM, sudarytoje iš daugiau kaip 100

ug/ml Neo. Promotoriaus veiksmingumo sumažėjimas buvo pastebėtas taip pat, kai MM buvo papildyta natrio fosfato buferiu (20 mM, pH 7.2), kaip parodyta fig. 5.

- 5 Kalcio jonai teigiamai reguliuoja Po438 promotoriaus aktyvumą. Ca^{2+} žymiai padidino Neo *S. lividans*, transformuotų su plazmide pULAD50, atsparumą, ir buvo parodytas griežtas ryšys tarp CaCl_2 koncentracijos ir Neo atsparumo lygio (2-a lentelė).

- 10 Plazmidė pULAD60 yra panašios plazmidės su tuo pačiu neo-genu, sujungtu su skirtingu promotoriumi, promotoriumi saf, kaip buvo aprašyta WO 90/14426, pavyzdys. Tačiau neo stabilumas *S. lividans*,
15 transformuotų su pULAD60, nebuvo modifikuotas, auginant MM, turinčioje skirtingas CaCl_2 koncentracijas (0, 10, 20, 30, 40 mM), įteigdamas, kad nėra nei potransliacinės neo geno produkto stimuliacijos, nei neomicino kalcio inaktyvacijos. Jei Ca^{2+} poveikis nebūtų
20 specifinis, stimuliacinis poveikis būtų stebimas su visomis struktūromis. Tai rodo, kad Po438 promotoriaus veiksmingumas yra specifiškai reguliuojamas kalcio jonų.

- 25 Kalcio indukcija t.p. buvo stebima *S. lividans*, transformuotų su plazmide pULAD51, XylE ekspresijoje, kaip parodyta fig. 6. Katecholio dioksigenazės veiksmingumas (Cat O_2 azė) žymiai padidėjo, kai R2YE kultūrinė terpė buvo papildyta CaCl_2 iki 60 mM
30 koncentracijos. *S. lividans*, transformuotų su pIJ4038 (promotoriaus-bandinio vektorius - be promotoriaus Po438), katecholio dioksigenazės veiksmingumas, priešingai, nesikeitė, kai buvo auginama R2YE terpėje su arba be kalcio chlorido.

Transkripcijos pirmo taško Po438 nustatymas

S1 nukleazės kartografiniai eksperimentai buvo atlikti, kad nustatytume transkripcijos pradinį tašką ir Po438 promotoriaus seką. 270 bp HindIII-SstI fragmentas, atskirtas iš plazmidės pULAD50, buvo pažymėtas HindIII 5' gale ir hibridizuotas su mRNA, atskirto iš *S. lividans*, nešančių pULAD50. Apsaugotas fragmentas pasirodė dydžiu apie 24 nt trumpesnis negu kontrolinis bandinys (fig. 3), todėl pradinis transkripcijos taškas buvo nuštatytas apie C 24 nt nuo SstI vietos (fig. 4). Antras S1 nukleazės kartografinis eksperimentas buvo atliktas su pirmine plazmide pIJ702, kuri taip pat apima Po438 DNR sritį. pIJ702 242 bp BglIII-SstI fragmentas buvo panaudotas kaip bandinys. Fragmentas buvo pažymėtas BglIII 5' gale ir hibridizuotas su mRNA, atskirtais iš *S. lividans*, transformuotomis su pIJ702. Fig. 3 rodo, kad apsaugotas fragmentas buvo dar 24 nt trumpesnis negu bandinys, pažymėdamas, kad transkripcijos iniciacija pasirodo pIJ702 panašiam nukleotide, kaip ir pULAD50.

Fig. 4 rodo *mel* geno ORF 438, išdėstyto apie 30 nt prieš ORF 438 pradinį kodoną, promotoriaus aktyvacijos sritį (Geintlich ir kt., *Molecular Microbiology* 3:1061-1069, 1989; Leu ir kt., *GENE* 84:267-277, 1989) kaip ir Po438 promotorių, išdėstyta priešinga orientacija ORF 438 orientacijai ir jo transkripcijos pradinį tašką pagal šio darbo S1 nukleazės kartografinį eksperimentą.

Nors aminoglikozido fosfotransferazės genas ir katecholio dioksigenazės genas buvo apibūdinti pavyzdžiais, reikėtų suprasti, jog tam, kad padidėtų ekspresija, panaudojant promotorių Po438, genas bet kuriam polipeptidui ar proteinui, pagamintas panaudojant *Streptomyces* tipus, gali būti modifikuotas, pašalinant gimtąjį promotorių ir pakeičiant jį Po438

promotoriumi. Panašiai svetima DNR, koduojanti polipeptidą ar proteiną, gali būti įterpta į bet kurį tokį endogeninį geną. Tačiau geriausia parinkti tokį endogeninį geną, kuris išskiria proteiną per ląstelės sienelę kultūrinėje terpėje, ir tuo atveju svarbu išlaikyti sekrecinę signalo seką. Tuo būdu, svetimą DNR geriausia įterpti tokiu būdu, kad išlaikytume sekrecijos signalus kiek galima daugiau nuo neląstelinio fermento geno. Nors šie signalai dominuoja vyraujančioj sekoj, endogeninių genų neląsteliniais fermentams atžvilgiu akivaizdu, kad terminalinis karboksilo galas yra taip pat svarbus sekrecijai. Tuo būdu, būtų geriau sukurti lydimosi proteiną, įterpiant svetimą DNR seką į endogeninę DNR, negu pašalinti transkripcinę endogeninės DNR dalį, pakeičiant svetimą DNR.

Taip pat reikėtų suprasti, kad svetima DNR seka gali būti bet kuri ne iš *Streptomyces* išvesta DNR seka, užkoduojanti proteiną arba polipeptidą, ypač eukariotinės arba virusinės prigimtės. Tokių eukariotinių arba virusinių DNR sekų pavyzdžiai yra sekos, užkoduojančios žmogaus arba gyvulio leukocitų interferonus (INF-alfa), žmogaus insuliną, žmogaus ir gyvulio augimo ir kitus hormonus, tokius kaip kortikotropino išskyrimo faktorius (KIF), žmogaus serumo albuminas ir įvairūs žmogaus kraujo faktoriai ir plazminogeniniai aktyvatoriai, audiniai ir urokinazė, virusinis hepatito B branduolys ir paviršiaus antigenai bei kiti žmogaus ir gyvulio virusiniai polipeptidai ir proteinai.

1 lentelė. Kamienai ir plazmidės

Pažymėjimas	Svarbios charakteristikos	Literatūros šaltinis
<i>S. lividans</i> JI1326	laukinis tipas	JI
<i>S. antibioticus</i> ATCC 11891	laukinis tipas, melanino gamintojas	ATCC
pIJ702	tiostreptono atsparumas ir melaninas+	Katz ir kt., 1983
pULAD60	pIJ702, nešantis saf promotorių	WO90/14426
pIJ487	promotoriaus-bandinio vektorius dėl <i>Strepto- myces</i> , nešantis <i>neo</i> geną kaip pranešėją	Ward ir kt., 1983
pULAD50	pIJ487, nešantis 242 bp <i>SstI</i> - <i>BglII</i> fragmentą iš pIJ702	Šis darbas
pIJ4083	promotoriaus-bandinio vektorius dėl <i>Strepto- myces</i> , nešantis <i>XylE</i> geną kaip pranešėją	
pULAD51	pIJ4083, nešantis 242 bp <i>SstI</i> - <i>BglII</i> fragmentą iš pIJ702	Šis darbas

5 JI, mikroorganizmų kolekcija iš John Innes Institute,
Colney Lane, Norwich; NR4UH, UK; ATCC, American Type
Culture Collection

2 lentelė. *S. lividans* [pULAD50], augančių MM terpėje, papildytoje CaCl_2 , neomicino atsparumo lygis

CaCl_2 koncentracija (mM)	Neo atsparumas ($\mu\text{g/ml}$)
0	180
10	300
20	650
30	1100
40	1900

5 Literatūra, cituota brėžiniuose ir 1-je lentelėje

GEISTLICH M., Irniger S. and Hutter R.: Localization and functional analysis of the regulated promoter from the *Streptomyces glaucescens mel* operon. Molecular Microbiology. 3 (1989) 1061-1069.

HOPWOOD. D.A.: Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*. Bacterial. Rev. 31 (1967) 373-403.

KATZ, E., Thompson, C.J. and Hopwood, D.A.: Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. J. Gen. Microbiol. 129 (1983) 2703-2714.

LEU, W.-M., Wu, S.-Y., Lin, J.-J., Lo, S.J., and Wu Lee, Y.-H.: Analysis of the promoter region of the melanin locus from *Streptomyces antibioticus*. Gene 84 (1989) 267-277.

WARD, J.M., Jansen, G.R., Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J. and Bibb, M.J.: Construction and characterization of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator, Mol. Gen. Genet. 203 (1986) 468-478.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Kalciu reguliuojamas promotorius, kurio DNR seka yra:

5

CCGCGGCGCGCGGGGTGTCCACCGGCTCGTAGTGGCTGACGACGCTGATCCACGA
GCCGTCGGCGTTGCGCATCACATCGAGTTGACGCCGTCCACGAACACGGCGTAA
CCGCCGCCGTGATGGCCGCCGCCGTGAGCGTGACCGCCGTGACCGCCGCCGTGGT
GGCCCCCGCCGTCCGGTGACCGTCCGGCCCTGTATCCGGCGGCCCTTGTAGATCT

10

arba jos fragmentai, turintys tą patį poveikį.

2. DNR seka, kuri hibridizuoja su nukleotidų seka pagal 1 punktą ir turi kalciu reguliuojamą promotoriaus veiksmingumą.

15

3. Klonuojantis nešėjas, apimantis DNR seka, užkoduojančią polipeptidą arba proteiną, operatyviai sujungtą su promotoriumi pagal 1 punktą.

20

4. Klonuojantis nešėjas pagal 3 punktą, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad paminėta DNR seka yra endogeninė *Streptomyces* bakterijoms.

25

5. Klojuojantis nešėjas pagal 3 punktą, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad minėta DNR seka apima visą arba dalį sekos, užkoduojančios polipeptidą arba proteiną, endogeninį *Streptomyces* bakterijoms, į kuri susiliejo tame pačiame skaitymo rėme DNR seka, užkoduojanti ne *Streptomyces* polipeptidą arba proteiną.

30

6. *Streptomyces* šeimininko ląstelė, transformuota su klonuojančiu nešėju pagal 3 punktą.

35

7. *Streptomyces* šeimininko ląstelė, transformuota su klonuojančiu nešėju pagal 4 punktą.

8. *Streptomyces* šeimininko ląstelė, transformuota su klonuojančiu nešėju pagal 5 punktą.

5 9. Svetimos DNR sekos *Streptomyces* ekspresijos būdas, b e s i s k i r a, i n t i s tuo, kad apima operatyvų minėtos DNR sekos sujungimą su *Streptomyces* ekspresijos kontrolės seka, į kurią įeina promotorius pagal 1 punktą.

10 10. Būdas pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtą svetimą DNR seką ir *Streptomyces* ekspresijos kontrolės seką įterpia į chromosominę *Streptomyces* DNR.

15 11. Būdas pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad svetimą DNR seką operatyviai sujungia su minėta *Streptomyces* ekspresijos kontrolės seka per DNR seką, užkoduojančią bent dalį proteino arba polipeptido, išskirto iš *Streptomyces* signalo sekos, ir
20 kad minėtą DNR seką, užkoduojančią signalo seką, išreikštą kartu su minėta DNR seka, kontroliuoja minėta *Streptomyces* ekspresijos kontrolės seka, kad būtų išskirtas proteinas arba polipeptidas, užkoduotas svetima DNR seka.

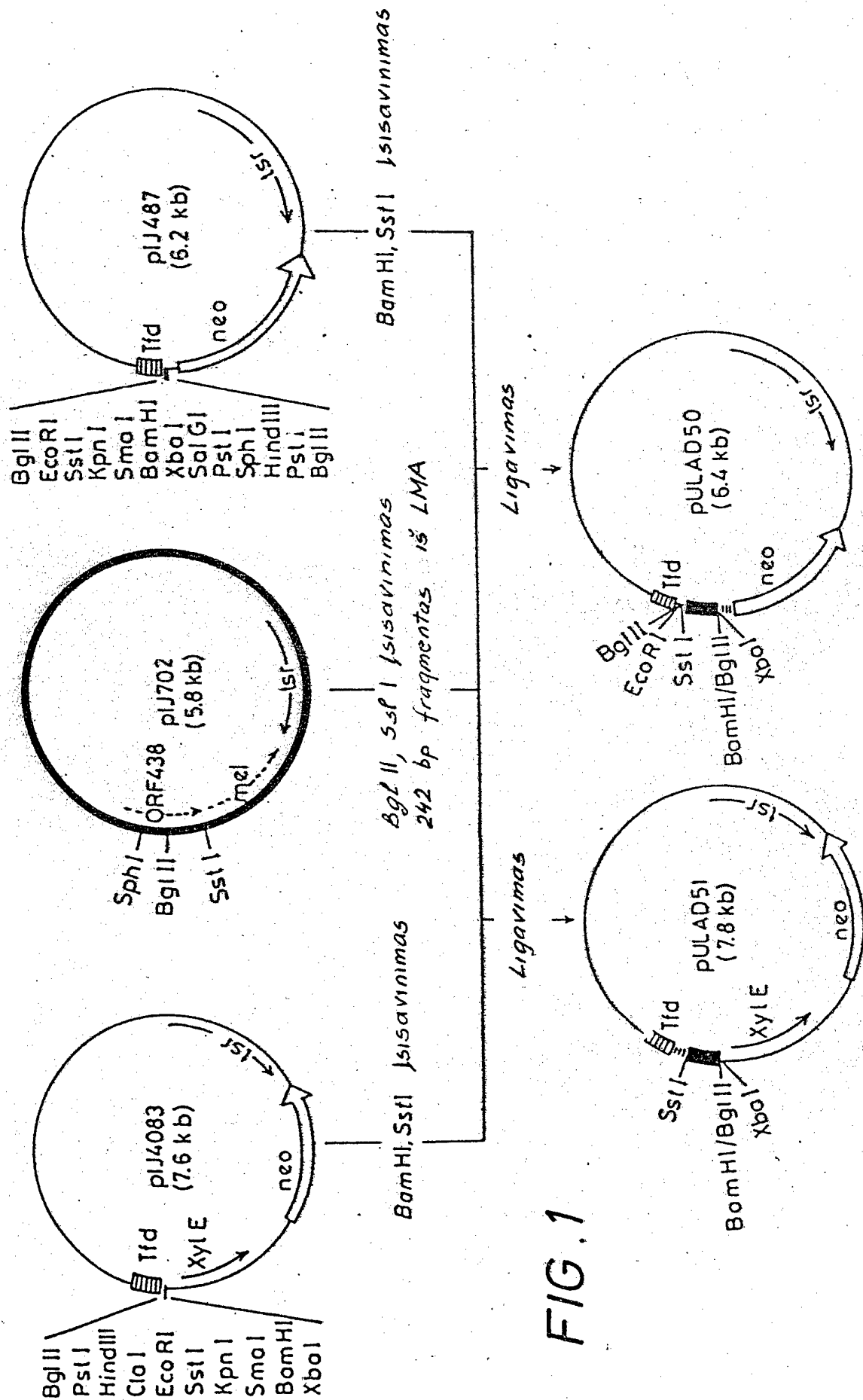


FIG. 1

FIG. 2

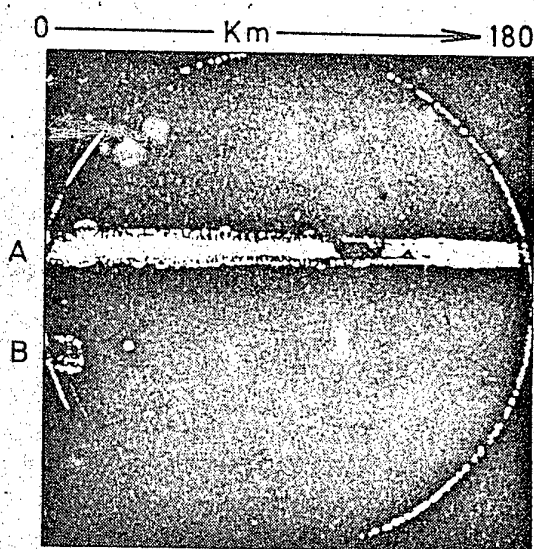


FIG. 5

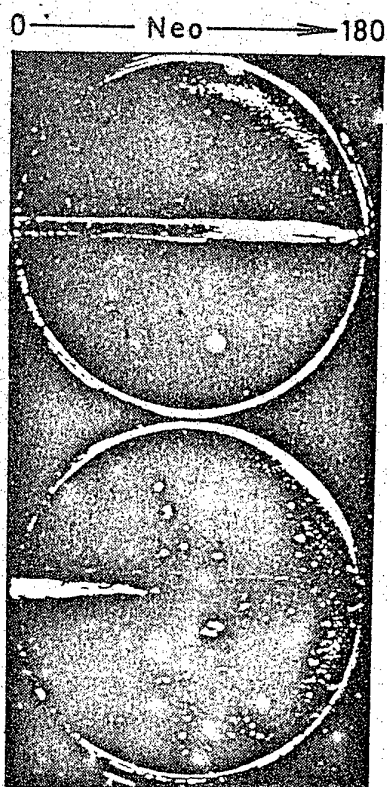


FIG. 3

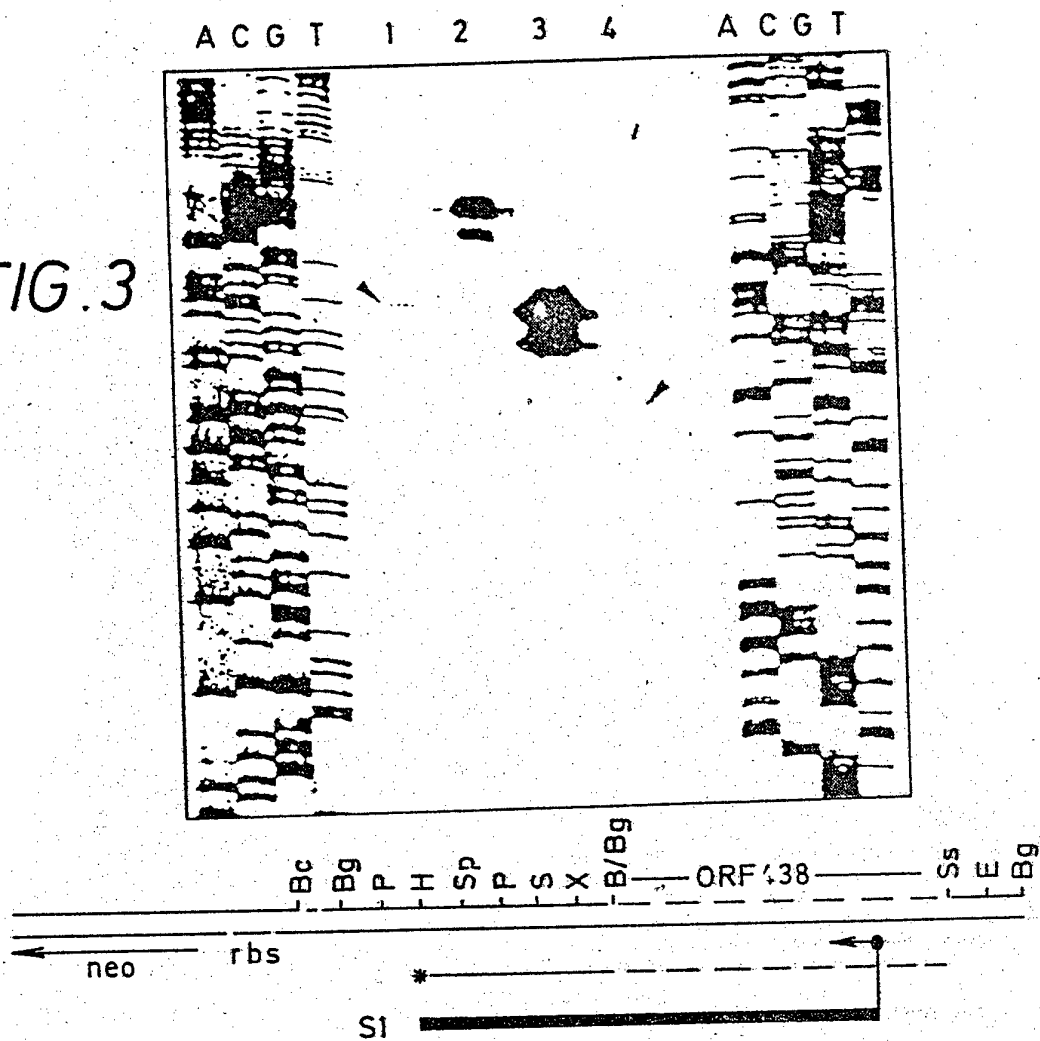
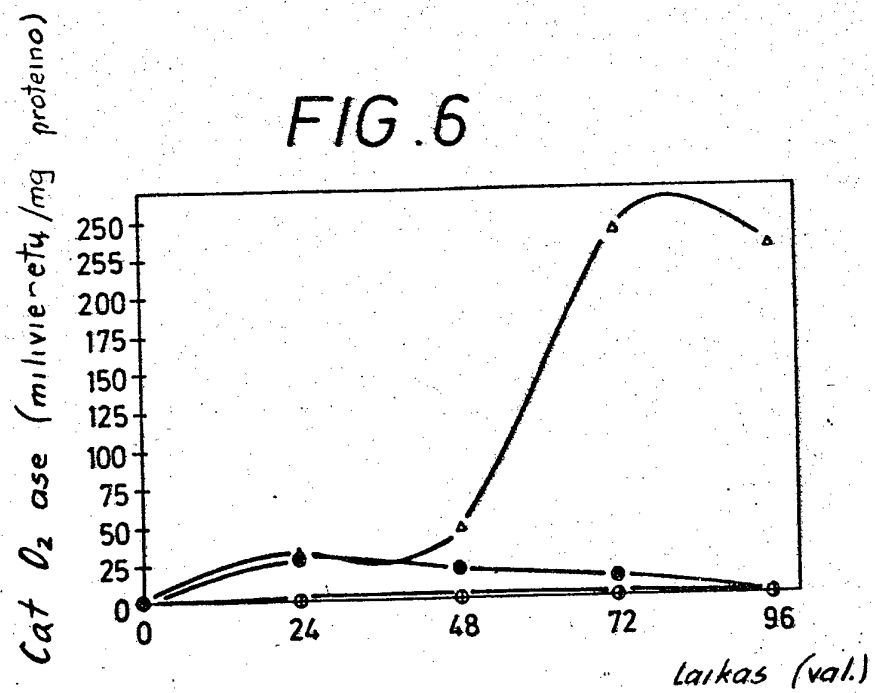


FIG. 6



TGGGGGCGCAACCGGTCCGGGGCGATTCTCTCCCTCGGTCGATAGGATAGCGGGGTCTCAACCGCA
AGCGCCGGTTGGCAAGGCCGGGCTAAGAGAGGGGACAGAGGAGGCGAGCTATCCATACGGCCCCAGCAGTTGGT

151 M P E L T R R R A L G A A A V V A
A C C C A C C C A G G A G G T C C C G C A T G C C G G A A C T C A C C C G T C G T C C G C C C T C G G G C C G C A G C C G T C G T C C C
T G C G T G G G G T C C T C C A G G G C G T A C G G C C T T C A G T C G G C A G C A G C G C C G A G C C G C C G C T C C G C A G A G C C G

A C V P L V A L P A A P A D D R G H E T P E V P
GCGGGTGTCCCGCTGGTCCGCTTCGCGCGCGCGCGCGCGGACGATCGGGGGCACACACCGCGGAGGTCCCG
CGGOCACAGGCGGACCGAGCGGGAGCGGCGCGCGCGCGCGCTGCTAGCCCGCGTGGTGTGGGGCTCCAGGGG

G T P A A - S G A P A A F D E I Y E - G R R I Q G R
GGG A A C C C G G C C G G T C C G G G C C C C G C C C T T C G A C G A G A T C T A C A A G G G C C G C C G G A T A C A G G G C C C G
C C C T T G G G C C C G G C A G G C C C G C C C G G G C C G A A G C T G C T C T A G A T G T T C C C G G G G C C T A T G T C C C G G C

БЭЛ1

T V T D G G G H H G G G H G G D G H G G G H H G
ACGGTCAACCGACCGGCGGGGGCCACCAACGGGCGCGGTCAACGGCGGTGACGGTCAACGGCGGGCGGGCCATCAACGC
TGCCAGTGGGTGCGCGCCCGCGGTGGTGCGCGGCCAGTGCGCGCACTGCGCAGTGCAGCGCGCGCGGTAGTGCGG

G G T A V F Y D G V E L E V X R N A D G S T I S
GGCGGTTACGGCGTGTTGGTGGACGGCGTGCACTGCATGTGATGCCCAACGGCGACGGCTCGTGGATCAGC
CGCGCAATGGCGGCACACCACTGCGCGACGTTGACGTACACTACGGCGTTGCGGCTGCCAGCACCTAGTCG

V V S E Y E P V D T P R A A A R A A V D E L Q G
GTGGTCAGCCACTACGAGCGGGTGGACACCCCGCGCGCGCGCGCGCGCTCGGGTCCAGAGCTCCAGGGC
CAGCAGTCCGGTGATGCTCCGGCCACTGTGGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCAGCCAGCTGTCGAGGTCGG

A R L L P P P S N . rds K T
 GGGGGCTCTCCCTTCCCTCCAACTGACCTTCTCCCCCGCACTTTTGGAGCAACCGGCACATGACC...
 CGGGCGAGGAGGGGAGGGGAGGTTGACTCGAAGAGGGGGCGTGAAACCTCGTGGGGGTGTACTGG...

Fig. 4