

(19)



(10) **LT 3600 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patento numeris: **3600**

(51) Int. Cl.⁵: **C12N 15/12**

(21) Paraiškos numeris: **IP828**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 08 03**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 02 27**

(45) Patento paskelbimo data: **1995 12 27**

(60) SU duomenys: **SU 4356123, 1988 05 26**

(31, 32, 33) Prioritetas: **8712540, 1987 05 28, GB**

(72) Išradėjas:

Alex Bollen, BE
Jean Gobert, BE
Ernst Wuelfert, BE

(73) Patento savininkas:

UCB S.A., avenue Louise 326, Brussels, BE

(74) Patentinis patikėtinis:

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

(54) Pavadinimas:

Nukleino rūgšties fragmentas žmogaus proapolipoproteino A-I kodavimui

(57) Referatas:

Išradimas skirtas rekombinantinei DNR, klonavimo ir ekspresijos vektoriams, naudojamiems ląstelių ir mikroorganizmų, sugebančių produkuoti žmogaus proapolipoproteiną A-I, transformacijai.

Šis išradimas skirtas naujai rekombinantinių dezoksiribonukleino rūgščių sekai (DNR), apimančiai seką, koduojančią žmogaus proapolipoproteiną A-I, klonavimo ir ekspresijos vektoriams, turintiems šias DNR sekas, naudojamiems ląstelių arba mikroorganizmų, sugebančių produkuoti žmogaus proapolipoproteiną A-I, transformacijai.

Žmogaus apolipoproteinas A-I (apo A-I) yra pagrindinė baltyminė sudėtinė didelio tankio lipoproteinų (DTL) ir limfos chilomikronų dalis. Kepenys ir plonoji žarna yra pagrindiniai apo A-I sintezės centrai. Apo-I sintezuojamas šiuose organuose kaip baltyminis pirmtakas (preproapo A-I). Bendras transliacinis prepeptido suskaldymas vyksta ląstelės viduje, ir proapo A-I yra išskiriamas plazmoje ir limfoje.

Proapo A-I turi šešias papildomas aminorūgštis (Arg-His-Phe-Trp-Gln-Gln), prijungtas prie apo A-I galinės amino grupės. Pasiekęs kraujagyslių išsidėstymo sritį, proapo A-I suskaldomas organizme specifiniu proteolitinu fermentu (apo A-I propeptidaze), sudarydamas susiformavusį apo A-I.

Šis subrendęs apo A-I yra vienintelis neglikozilintas žinomos sekos, susidedančios iš 243 aminorūgščių, polipeptidas (H. B. BREWER ir kt., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, (1978), 623-630); jis tarnauja kaip kofaktorius plazmos fermentui lecitinui: cholesterolio aciltransferazei, kuri atsakinga už daugumos cholesterolio esterų susidarymą plazmoje. Defektai apolipoproteino struktūroje arba biosintezėje gali sukelti sutrikimus plazmos lipidų pernešimo sistemoje ir koronarinių arterijų susirgimus. Įrodyta, kad žemos apo A-I ir DTL koncentracijos plazmoje yra reikšmingas širdies priepuolių (miokardo infarkto) ir kitų susirgimų, susijusių su kraujagyslių ateroskleroze, rizikos faktorius. Geno, koduojančio apo A-I, mutacijos susijusios su DTL koncentracijos sumažėjimu, o taip pat pirmalaikiais koronarinių kraujagyslių susirgimais.

Apo A-I ir DTL yra pagrindinės plazmos sudėtinės dalys, kurios dalyvauja cholesterolio pernešime iš periferinių audinių (arterijų) į kepenis (taip vadinamame atvirkštiniame

cholesterolio pernešime) ekskrecijai iš organizmo. Turint omeny tai, kad cholesterolio susikaupimas arterijose yra svarbiausias aterosklerozės mechanizmas ir ypatybė, atvirkštinio cholesterolio pernešimo stimuliacija apo A-I gali sulėtinti bei transformuoti aterosklerozinį procesą ir tuo pačiu sumažinti širdies priepuolių galimybes.

Proapo A-I ir apo A-I susiformavimas gali vykti kiekybiškai ne ląstelėje, išsilaikant kraujyje mažiau negu 12 valandų. Turint omeny tai, kad A-I yra pagrindinis, jeigu ne vienintelis susiformavusio apo A-I pirmtakas, jis gali būti naudojamas pakeičiančioje terapijoje kiekvieną kartą, kai sumažėja DTL koncentracija, pvz., esant įgimtoms ir įgytoms ydoms. Dėl apo A-I terapinio naudingumo tyrinėtojai bandė rasti būdus, įgalinančius produkuoti apo A-I dideliais kiekiais. Tokie visuotinai žinomi būdai apima apo A-I, gauto iš kraujo plazmos, išvalymą.

Keliose publikacijose (P.CHEUNG and L. CHAN, *Nucleic Acids Res.* 11, (1983), 3703-3715; J.J. SEILHAMER ir kt., *DNA*, 3, (1984), 309-317 ir Japonijos patento paraiškoje Nr. 96998/86) buvo parodyta, kad papildančioji DNR koduojanti preproapo A-I, gali būti gauta gerai žinomais genetinės inžinerijos būdais. R. LORENZETTI ir kt. (*FEBS Lett.* 194, (1986), 343-346) parodė, kad apo A-I gali būti ekspresuojamas *E.coli* kaip nesuskaldomas sujungtas su beta-galaktozidaze baltymas. Tačiau bandymai ekspresuoti susiformavusį nesujungto baltymo pavidalo apo A-I buvo nesėkmingi.

Japonijos patento paraiškoje Nr. 98998/86 aprašoma baltymo, panašaus į žmogaus apolipoproteiną A-I, ekspresija *E.coli*, kuris transformuojamas plazmide pHAIE-I, turinčia struktūrinį apo A-I geną, kontroliuojant promotoriui tac. Tačiau šis struktūrinis genas yra nepilnas ir sudarytas iš aminorūgščių kodonų nuo +4 iki +243, prieš kuriuos eina ATG transliacijos iniciacijos kodonas. Dėl to gautas ekspresijos produktas turi N-galinį metioniną (atitinkantį ATG kodoną), kuris gali sukelti pašalinius poveikius, naudojant terapijoje.

J.B. MALLORY ir kt. (*J. Biol. Chem.* 262, (1987), 4241-4247; PCT paraiškų publikacijos WO 86/04920 ir WO 87/02062) aprašyta žmogaus apolipoproteino A-I ekspresija kinietišų žiurkėnų kiaušidžių ląstelėse (gyvulėlių ląstelių kultūra). Ši naudojama struktūra turi pilną žmogaus preproapolipoproteino A-I geną. Kinietišų žiurkėnų kiaušidžių

ląstelės, matyt, transformuoja proapo formą į susiformavusią formą, kadangi tik 5-10% išskirto baltymo apo A-I yra baltymas proapo A-I, likusią dalį sudaro susiformavęs baltymas apo A-I. Sistemos produktyvumas santykinai mažas, kadangi 0.5×10^6 ląstelių išskiria tik 25-30 $\mu\text{g/ml}$ apo A-I per 24 valandas. Tarptautinės patentinės PCT paraiškos aprašyme WO 87/02062 pateikti pavyzdžiai, susiję su žmogaus apolipoproteino A-I ekspresija kituose šeimininkuose, tokiuose kaip E. coli (bakterinis šeimininkas) ir S. cerevisiae (mielės). Tačiau nė vienoje iš naudotų struktūrų nėra genetinės informacijos apie proapo formą, ir išreikštas baltymas nėra žmogaus proapolipoproteinas A-I.

Šis išradimas apima žmogaus proapolipoproteino A-I, t.y. susiformavusio proapo A-I, kurį galima suskaldyti specifiniu proteolitinio apo-I fermentu propeptidaze, gavimo rekombinantinės DNR metodais priemonės ir būdus. Čia naudojama sąvoka "susiformavęs" reiškia ne tik žmogaus proapo A-I kaip tokį, bet taip pat atitinkamą baltymą, kurio pirmoji aminorūgštis yra metioninas, ir kurio buvimas yra sąlygotas ATC transliacijos iniciacijos kodono ekspresijos vektoriaus struktūroje.

Šis išradimas skirtas klonavimo ir ekspresijos vektorių, turinčių DNR, koduojančią žmogaus proapo A-I, sudarymui tokiu būdu, kad įgalinama amplifikacija ir po to subrendusio žmogaus baltymo proapo A-I ekspresija, o taip pat Met-, jų sujungimo konjugatų arba konjugatų su signaliniu N-galu ekspresija. Toliau šis išradimas skirtas gyvybingų ląstelių kultūroms arba genetiškai modifikuotiems mikroorganizmams, kadangi juose yra šie vektoriai ir jie gali produkuoti žmogaus polipeptidą proapo A-I. Be to, šis išradimas apima žmogaus proapo A-I fizinėje būklėje, besiskiriančioje nuo fizinės būklės, kurioje jis randamas arba iš kurios jis išskiriamas iš natūralių šaltinių arba natūralios supančios aplinkos. Dėl šio gavimo būdo žmogaus proapo A-I visiškai laisvas nuo įprastų endogeninių ir kitų pradinių medžiagų arba produktų.

Šis išradimas taip pat skirtas žmogaus proapo A-I gavimui rekombinantinės DNR būdu su visais aspektais ir nereikėtų manyti, kad tai būdas, apribotas šio aprašymo specifinėmis detalėmis ir rėmais.

Pagrindinis šio išradimo aspektas skirtas gavimui baltymo, kuris sudarytas iš arba kurio sudėtyje yra susiformavęs žmogaus proapo A-I, ir kuris tokiu atveju gali būti paverstas in

vitro arba in vivo sąlygose susiformavusiu žmogaus apo A-I, proteolitiškai veikiant apo A-I propeptidaze. Gaunamas žmogaus proapo A-I kaip toks gali būti panaudotas terapiniams tikslams; gali būti naudojamas taip pat met-proapo A-I, jei metionino radikalo buvimas yra farmaciškai priimtinas, kadangi šis produktas gali būti natūraliai ir efektyviai paverstas susiformavusiu autentišku žmogaus apo A-I cirkuliuojančiame kraujyje. Norint žmogaus proapo A-I gali būti produkuotas parinktuose mikroorganizmuose arba ląstelinėse kultūrose, kurios gali paveikti N-terminalinį metioniną ir tuo pačiu gali produkuoti žmogaus proapo A-I tokioje formoje, kurioje nėra N-terminalinio metionino. Alternatyviai žmogaus proapo A-I, nepaisant to, ar jame yra, ar nėra N-terminalinis metionino radikalas, gali būti suskaidytas in vitro sąlygose, taip gaunant susiformavusį žmogaus apo A-I, kuris gali būti naudojamas terapiniams tikslams. Tai taip pat galioja ir sujungimo konjugatams bei konjugatams, turintiems proapo A-I signalinį N-galą: šio produkto suskaldymas veda prie autentiško žmogaus apo A-I be N-terminalinio metionino susidarymo.

Antras svarbus šio išradimo aspektas skirtas modifikuotos sekos, koduojančios bent dalį žmogaus proapo A-I molekulės, panaudojimui; tokia modifikuota koduojanti seka pagerina transliacijos efektyvumą dėl sumažėjusio smeigtukų pavidalo struktūrų susidarymo arba iš viso apsaugojimo nuo jų. Gal būt, R. LORENZETTI ir kt. (FEBS Lett. 194, (1986), 343-346) negalėjo nustatyti nesujungto subrendusio apo A-I proteino, kadangi jų gautos DNR gali sudaryti smeigtukų pavidalo struktūras, dėl ko ekspresija yra labai neefektyvi. Nustatyta, kad efektyvi ekspresija gali būti garantuota, atitinkamai modifikuojant kai kuriuos kodonus sekoje, koduojančioje aminorūgštis nuo -6 iki +14 žmogaus proapo A-I. Sąvokos "atitinkamai modifikuojant" čia reiškia, kad kai kurie natūralūs kodonai pakeičiami kitais kodonais, kurie pagal genetinį kodą yra tos pačios aminorūgštys, ir be to, šios sąvokos reiškia, kad visos paimtos kartu modifikacijos sumažina smeigtukų pavidalo struktūrų susidarymą arba net visiškai apsaugo nuo jų. Reikia pabrėžti, kad tokios DNR sekos modifikacijos nedaro jokios įtakos skaldymo propeptidaze vietai dėl to, kad aminorūgščių seka, atpažįstama propeptidazės, išlieka tokia pat.

Baltymų atžvilgiu šis išradimas skirtas žmogaus proapo A-I kaip genetiškai modifikuotų ląstelių kultūros arba mikroorganizmo produktui. Šis žmogaus proapo A-I gali būti pateiktas susiformavusio proapo A-I formoje, kurio pirmtakas yra metionino radikalas, sujungto baltymo formoje, tokio kaip, pvz., beta-galaktozidazė-proapo A-I, ir preproapo A-I produkto formoje. Gautas produktas faktiškai neturi įprastų endogeninių baltymų ir kitų natyvių medžiagų arba produktų, bendrų su nagrinėjamo baltymo natūraliu šaltiniu (kraujo plazma). Ląstelių kultūra arba mikroorganizmas, naudojami šiam produkavimui, neapsiriboja specifinėmis ląstelių linijomis ir organizmais: gali būti naudojamos ir prokariotinės ląstelės, ir eukariotinės ląstelės, įskaitant gyvulių ir žmonių ląstelių linijas. Tik kaip iliustracija toliau pateikiamas ekspresijos bakterijoje E. coli (kaip prokariotinių ląstelių atstovo) ir mielėse Saccharomyces cerevisiae, taip pat vabzdžių, užkrėstų bakulovirusu, ląstelėse (kaip eukariotinių ląstelių atstovo) pavyzdys.

Baltymų atžvilgiu šis išradimas skirtas taip pat žmogaus apo A-I, gauto žmogaus proapo A-I, produkuoto kaip aprašyta aukščiau, apdirbimu apo A-I propeptidaze. Šis žmogaus apo A-I identiškas žmogaus susiformavusio apo A-I autentiškai formai ir jame nėra jokių N-terminalinio metionino radikalų.

Panaudojimo atžvilgiu šis išradimas skirtas farmacinėms kompozicijoms, kurių sudėtyje yra žmogaus proapo A-I ir/arba žmogaus apo A-I, nurodyti aukščiau, ir bent vienas farmaciškai tinkamas nešiklis tirpiklis, skiediklis arba priedas, parinkti visuotinai priimtinais būdais, atsižvelgiant į įvedimo į organizmą būdus ir įprastus farmacinių kompozicijų receptūrų ruošimo reikalavimus.

DNR atžvilgiu šis išradimas skirtas rekombinantinės DNR sekai, apimančiai seką, koduojančią proapoliproteiną A-I, kurioje natūralios koduojančios sekos dalis pakeista DNR fragmentu, koduojančiu tas pačias aminorūgštis, bet susidedančiu iš kitos nukleotidų sekos, tokiu būdu, kad sumažėja smeigtukų pavidalo struktūrų susidarymas arba iš viso nuo jų apsaugoma. Pagal specifinį šio išradimo įgyvendinimą, kuriam teikiama pirmenybė, natūrali seka, koduojanti proapo A-I aminorūgštis nuo -6 iki +14, pakeičiama tokia seka (nurodyta tik viena grandinė):

5'-ATGAGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGGGATAG
AGTTAAGGACTTG-3'

į kurią įeina papildomas translacijos iniciacijos ATG kodonas ir modifikuoti kodonai 6, -1, +1, +3, +4, +5, +6, +7, +10, +11, +14 aminorūgštims.

DNR atžvilgiu šis išradimas skirtas taip pat replikatyviniams klonavimo vektoriams ir ekspresijos vektoriams, apimantiems rekombinantinę DNR seką, nurodytą aukščiau, kuri koduoja žmogaus proapo A-I. Atskiru atveju šis išradimas skirtas rekombinantinėms plazmidėms pULB9291, pULB9292, pULB9296, pULB9299, pNIV1612, ir pNIV1613, kurių konstravimas yra čia žemiau aprašytas. Pirmos plazmidės pULB9291 ir pULB9292 turi proapo A-I modifikuotos struktūros geną, prieš kurį eina kodonas ATG ir kuris kontroliuojamas fago lambda P_L promotoriaus. Šios plazmidės yra tinkami E. coli ekspresijos vektoriai ir nukreipia žmogaus proapo A-I sintezę, kuris gali būti suskaldytas propeptidaze, gaunant susiformavusį autentišką žmogaus apo A-I. Plazmidė pULB9296, įvesta į E. coli nukreipia sujungto baltymo, susidedančio iš beta-galaktozidazės ir žmogaus proapo A-I, ekspresiją, kontroliuodama E. coli lac promotoriaus sritį. Kadangi šis sujungimo produktas dar turi propeptidazės suskaldymo seką, tai jis gali būti suskaldytas, taip gaunant autentišką subrendusį žmogaus apo A-I.

Plazmidė pULB9299 yra ekspresijos vektorius, tinkantis mielėms, ir turintis ERG3 promotoriaus ir transkripcijos terminatoriaus sritis, įgalinantis garantuoti efektyvią ekspresiją mielėse. Gautas žmogaus proapo A-I gali būti vėl suskaldytas propeptidaze, gaunant autentišką susiformavusį apo A-I.

Plazmidė pNIV1612 turi proapo A-I struktūrinį geną, sujungtą su E. coli baltymo ompA signalinio peptido DNR seka, kontroliuojant lpp (lipoproteino) promotoriui ir lac promotoriui-operatoriui. Šioje struktūroje seka, koduojanti signalinį peptidą ompA, eina prieš proapo A-I seką be ATG translacijos iniciacijos kodono. Ši plazmidė yra tinkantis E. coli sekrecijos vektorius ir nukreipia žmogaus proapo A-I, kuris gali būti išskiriamas periplazmoje be N-terminalinio mationino, sintezę. Plazmidė pNIV1613 yra pernešimo vektoriaus sekos DNR įvedimui iš žmogaus proapo A-I į bakulovirusą. Ji susideda iš

bakuloviruso polihedrino promotoriaus ir proapo A-I struktūrinio geno, įskaitant ATG transliacijos iniciacijos kodoną.

Kartu su natūraliu bakulovirusu (Autographa californica branduolinės polihedrozės virusas, AcNPV) plazmidė pNIV1613 nukreipia proapo A-I sintezę vabzdžių ląstelėse ir gali vėl išsilaisvinti iš metionino po posttransliacinių modifikacijų vabzdžių ląstelėse.

Ir galiausiai šis išradimas skirtas taip pat ląstelių kultūroms ir mikroorganizmams, kurie transformuoti klonavimo vektoriumi arba ekspresijos vektoriumi, aprašytais aukščiau, ir, atskiru atveju, ląstelių kultūroms ir mikroorganizmams, kurie transformuoti ir kurie gali produkuoti žmogaus proapo A-I. Čia naudojamo "transformuoti" prasmė yra plati, kaip "genetiškai modifikuoti" ir jokių būdu neapsiriboja siaura "bakterinės transformacijos sąvoka.

Priklausomai nuo naudojamo vektoriaus tipo ir pasirinkto šeimininko gali būti naudojamas bet koks genetinės inžinerijos būdas, tinkantis norimos genetinės modifikacijos atlikimui, įskaitant transfekciją, transdukciją ir kt.

Ląstelių kultūros ir mikroorganizmai, gauti pagal šį išradimą, gali būti naudojami gauti žmogaus proapolipoproteiną A-I gamybos sąlygose fermentacijos būdu.

Šis išradimas buvo įgyvendinamas, naudojant tarp kitų E. coli K12 kamieną MM 294 (endoA thi⁻, hsdR, supE); šis kamienas buvo deponuotas Amerikos kultūrų tipų kolekcijoje (ATCC Nr. 33625) be apribojimų priėjimui prie jo.

Tačiau gali būti panaudoti įvairūs kiti mikrobiniai kamieniai, įskaitant žinomus E. coli kamienus tokius kaip E. coli B, E. coli x 1776 (ATCC Nr. 31537, deponuotas 1979 birželio 3 d., be apribojimų), E. coli AR58, darinys Nr. 99 (ATCC Nr. 33956) su cIII⁻, cI 857, bio⁻, netekusios lambda funkcijos delta H, tiekiamos firmos PL-PHARMACIA (J.E. MOTT ir kt. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, (1985) 88-92; G. DEVARE ir kt. Cell, 36 (1984), 43-49; E. coli JM101 (ATCC Nr. 33876) (J. MESSING ir kt., Nucleic Acids Res. 9, (1981) 309-321), arba E. coli JA221 (lpp⁻, hdsM⁺, trpE5, leuB6, lacY, recAI/F', laqI^q, lac⁺, pro⁺) (J. GHRAYEB ir kt., EMBO J., 3, (1984), 2437-2442) ir kitus mikrobinius štamus, iš kurių daugelis yra deponuoti ir prieinami žinomuose mikroorganizmų deponavimo bankuose,

tokiuose kaip Amerikos tipų kultūrų kolekcija (ATCC) - žiūr. ATCC katalogą. Šie mikroorganizmai apima, pvz., Bacilli, tokias kaip *Bacillus subtilis* ir kitos žarnyno bakterijos, iš kurių galima paminėti, pvz., Salmonella Typhimurium ir Serratia marcesans, panaudojant plazmides, kurios gali replikuotis ir ekspresuoti heterologinių genų sekas.

Ekspresijos plazmidės naudojimui bakterijoms, pvz., E. coli, paprastai gaunamos iš plazmidės pBR322, naudojamos kaip vektorius (deponuota ATCC su Nr. 37017), ir atitinkamai įterpiant heterologinio geno sekas kartu su transliacijos iniciacijos ir užbaigimo signalais, skaitymo rėmelyje su funkciniu promotorium, teikiant pirmenybę natūralioms arba dirbtinai sudarytoms kirpimo vietoms. Šis vektorius bus vieno arba kelių charakteringųjų atrinkimo pagal fenotipą genų ir replikacijos šaltinio amplifikacijos šeimininko viduje užtikrinimui nešiklis. Šis heterologinis intarpas gali būti vėl išreikštas tokiu būdu, kad būtų gauta ekspresija kartu su priešėinančia sujungta seka, gauta, pvz., iš genų sistemos lac.

Šie bakuloviruso ekspresijos vektoriai, pvz., pAcRP6 arba pAcYM1 (Y. MATSUURA ir kt., J. Gen. Virol., 68, (1987), 1233-1250) ir laukinio tipo bakulovirusas (branduolinės polihendrozės Autographa californica virusas AcNPV) dabar yra plačiai naudojami. Jie smulkiai aprašyti literatūroje ir gali būti gauti Texas eksperimentinėje ūkio stotyje.

Pagal šį išradimą galima naudoti taip pat įvairias vabzdžių ląsteles kaip šeimininką suderinamiems ekspresijos vektoriams, pvz., ląsteles Spodoptera frugiperda Sf9 (M. D. SUMMER and G. E. SMITH, A manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect cell culture Procedures, Texas University, College Station, (1987); ATCC CRL 1711).

Pagal šį išradimą, gali būti naudojami įvairūs mielių kamienai, kaip šeimininkai suderinamiems ekspresijos vektoriams, tokiems kaip plazmidė YRp7 (D.T. STINCHCOMB ir kt., Nature, 282, (1979), 39-43), kuri sugeba atrinkti ir replikuoti kartu ir E. coli, ir mielėse, atskiru atveju, Saccharomyces cerevisiae.

Tinkami naudojimui mielių kamienai yra kamienas RH218 (G. MIOZZARI ir kt., J. Bacteriol., 134, (1987), 48-59), deponuotas Amerikos kultūrų tipų kolekcijoje be apribojimų (ATCC Nr. 44076), kamienas 10S44c (T. CABEZON ir kt., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, (1984), 6594-6598), kuris turi genotipą leu2-3, leu2-112, pep4-3 (M.

HOYLAERTS ir kt., FEBS lett. 204, (1986), 83-87) ir kamienas Ic 1697d (arg J., leu2-1), braditrofinis argininui (ATCC Nr. 20631).

Heterologinio geno, tokio kaip žmogaus proapo A-I kDNR ekspresijai mielėse būtina sudaryti plazmidinį vektorių, turintį keturis komponentus.

Pirmas komponentas yra fragmentas, kuris įgalina transformaciją kartu ir E. coli, ir mielėse, ir kuris dėl to turi turėti selekcijos geną iš kiekvieno organizmo. Tai gali būti genas, atsakingas už atsparumą ampicilinui iš E. coli (žiūr. "AmpA") ir genas leu2 iš mielių. Šis komponentas taip pat reikalauja replikacijos šaltinio iš abiejų organizmų, kad išsilaikytų kaip plazmidinė DNR šiuose dviejuose organizmuose. Tai gali būti šaltinis E. coli, kilęs iš pBR322 ir šaltinis arsl mielių chromosomos III arba 2μ ciklinės DNR replikacijos šaltinis.

Antras plazmidės komponentas yra seka, išdėstyta stipriai išreikšto mielių geno padėtyje 5' žemiau patalpinto struktūrinio geno transkripcijos įgyvendinimui. Ši seka, išdėstyta padėtyje 5', gali būti seka, kilusi iš mielių genų TDH3 arba ARG3. Šis fragmentas sudarytas tokiu būdu, kad pašalina struktūrines sekas TDH3 arba ARG3, kurios pakeičiamos seka, turinčia alternatyvius restrikcijos saitus, pvz., restrikcijos saitus NcoI arba BamHI sėkmingam šios sekos, išdėstytos 5' padėtyje, sujungimui su struktūriniu genu.

Trečias sistemos komponentas yra struktūrinis genas, sudarytas tokiu būdu, kad turi kartu ATG transliacijos iniciacijos ir transliacijos užbaigimo signalą.

Ketvirtas komponentas yra mielių DNR seka, turinti seką, išdėstytą mielių geno padėtyje 3', kuri turi savyje atitinkamus transkripcijos užbaigimo ir poliadenilinimo signalus. Pvz., plazmidės, nukreipiančios žmogaus proapo A-I gamybą mielėse, gali būti gautos, įterpiant žmogaus proapo A-I polipeptido geno fragmentus į ekspresijos plazmidės pRIT10774, aprašytos EP paraiškoje Nr. 151102, BamHI saitą.

Papildomos skiriamosios šio išradimo ypatybės paaiškės iš toliau pateikiamo tinkamesnių vektorių, apimančių rekombinantinę DNR pagal šį išradimą, ir sąlygų, kuriose šie vektoriai gali būti naudingai panaudoti, aprašymo.

Aprašyme pateiktos tokios figūros:

Fig. 1A, B pateikta žmogaus preproapo A-I nukleotidų ir aminorūgščių seka. Žmogaus preapo A-I informacinės DNR nukleotidų seka, gauta iš cDNR klonu pULB1609 DNR sekos analizės. Aminorūgštys, kurios yra signaliniame peptide, propeptide ir susiformavusiame apo A-I polipeptide, yra identiškos ir jos numeruotos nuo baltymo apo A-I pirmos aminorūgščių grupės. Pabraukta sritis, kuri atitinka parinktą sintezuotos DNR sekos prabą, naudojamą šio klonu išskyrimui. Raidiniai aminorūgščių sutrumpinimai yra tokie: A, alaninas; C, cisteinas; D, asparagino rūgštis; E, gliutamino rūgštis; F, fenilalaninas; G, glicinas; H, histidinas; I, izoleucinas; K, lizinas; L, leucinas; M, metioninas; N, asparaginas; P, prolinas; Q, gliutaminas; R, argininas; S, serinas; T, treoninas; V, valinas; W, triptofanas; ir Y, tirozinas.

Fig. 2 pateikta oligonukleotidinio adapterio DNR fragmento, koduojančio subrendusio apo A-I 6 aminorūgščių peptidą ir 14 pirmų aminorūgščių polipeptidą, sintezės schema kartu su ATG iniciacijos kodonu. Rodyklės rodo oligonukleotidus, naudojamus 65/61 pagrindinių porų NCOI-BalI fragmento sintezei.

Fig. 3 parodytas plazmidės pULB9291, kuri turi reguliacines zonas λ P_L , sudarymas ir proapo A-I nukleotidų seka.

Fig. 4 parodytas plazmidės pULA9296, kuri turi E. coli lac promotorių, sudarymas ir betagalaktozidazės proapo A-I nukleotidų seka.

Fig. 5 parodytas plazmidės pULB9299, kuri turi ARG3 mielių reguliacines zonas, sudarymas ir proapo A-I nukleotidų seka.

Fig. 6A, B ir C parodytas plazmidės pNIV1612, kuri turi lac ir lpp reguliacines zonas, sudarymas; seka, koduojanti ompA signalinį peptidą ir proapo A-I nukleotidų seka.

Fig. 7 parodytas plazmidės pNIV1613, kuri turi polihedrino geno reguliacinę zoną, sudarymas ir proapo A-I nukleotidų seka.

Smulkus išradimo aprašymas

Ribonukleino rūgščių gavimas. Žmogaus kepenų bendra RNR buvo gauta guanidino chlorido metodu (R.A. COX, Methods Enzymol. XII, part B, (1968), 120-129). Šis bendros ribonukleino rūgšties preparatas buvo praleistas per kolonėlę su oligo(dT)-celiulioze, norint gauti bendras poliA⁺ RNRs (T.MANIATIS ir kt., Molecular Cloning (Cold Spring Harbor, New York, 1982). Iš 10 g. žmogaus kepenų buvo gauta 200 µg polyA⁺ RNR.

Komplementarios DNR (cDNR) gavimas in vitro sąlygomis. Atvirkštinės transkripcijos reakcijos, panaudojant kaip pradinį produktą 0.1-5 µg poliA⁺ RNRs, buvo atliekamos, dalyvaujant oligo(dT)₁₂₋₁₈ (apytikriai 1 µg; šaltinis BOEHRINGER). Paskui ši viengrandė cDNR transformuojama į molekulę su dviguba grandine (cDNRds), naudojant tą patį atvirkštinės transkriptazės fermentą. cDNRds preparatai, paprastai 1 µg, buvo apdirbami S1 nukleaze, sudarant bukus galus. Šie būdai gerai žinomi šios srities specialistams ir smulkiai aprašyti T. MANIATIS ir kt., nurodyta aukščiau. Paskui cDNRds buvo pailgintos oligo(ds) būdu, aprašytu L.VILLA-KOMAROFF ir kt., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, (1978), 3727-3731). Paprastai 100 ng cDNRds apdirbama terminaline dezoksinukleotidiltransferaze.

Paprastai pailginimai, atitinkantys 15 bazių, prijungiami prie cDNR molekulės 3' galų.

Pailgintos cDNRds klonavimas į plazmidės vektorių pBR322. Plazmidės pBR322 DNR buvo tiesiškai išlyginta fermentu PstI ir pailginta oligo (dG) būdu, aprašytu R.M. LAWN ir kt. (Nucleic Acids Res. 9, (1981), 6103-6114).

Komplementarios DNR, pailgintos oligo(dC), sumaišomos lygiomis moliarinėmis porcijomis su plazmidės pBR322 DNR, pailginta su oligo (dG). Paprastai plazmidės recirkuliacijai buvo aneliuojama 50 µg mišinio. Šios sąlygos gerai žinomos šios srities specialistams ir smulkiai aprašomos R.M. LAWN ir kt., žiūr. nuorodą aukščiau. Keli šimtai transformantų buvo gaunama atrenkant pagal augimą tetraciklino terpėje,

atsparumą šiam antibiotikui suteikia plazmidė pBR322. Taip pat buvo tirtas transformantų jautrumas ampicilinui. Tie iš jų, kurie parodė jautrumą, turėjo chimerinę plazmidę, kadangi svetimos DNR įterpimas į vektorių daro neveikų ampicilino geną.

Selektyvus cDNR banko atrinkimas. *E. coli* transformantai buvo atrenkami su sintezuotais oligonukleotidais, pažymėtais prie 5' galo izotopu ^{32}P atitinkančiais apo A-I geno fragmentą.

Žmogaus apo A-I nukleotidų seka jau yra žinoma (žiūr. P. CHEUNG ir L. CHAN, cituota aukščiau ir J.J. SEILHAMER ir kt., cituota aukščiau); tokiu būdu, yra patogiu chemiškai sintezuoti N.D. SINHA ir kt. būdu (Nucleic Acids Res. 12, (1984), 4539-4557) oligonukleotidų fragmentą, kurio ilgis atitinka 22 bazes, atitinkantį geno 5' galą. Atrinkta seka yra tokia:

5'-GCTGCGGTGCTGACCTTGGGCCG-3'.

Prieš naudojant hibridizacijai sintezuotas oligonukleotidas fosforilinamas jo 5' gale, panaudojant T_4 polinukleotido kinazę (P-L Biochemicals) ir gama- ^{32}P adenozintrifosfatą. Žymėjimo ir hibridizacijos sąlygos gerai žinomos šios srities specialistams ir smulkiai aprašytos T. MANIATIS ir kt., cituota aukščiau, ir A. BOLLEN ir kt. (DNA, 2, (1983), 255-264).

Ekspresijos plazmidžių sudarymas. DNR gavimo, DNR fragmentų išskyrimo būdai, o taip pat analizės, naudojant restrikcijos fermentus, sąlygos bei fragmentų sujungimo sąlygos gerai žinomos šios srities specialistams ir smulkiai aprašytos R.M. LAWN ir kt., cituota aukščiau, ir yra taikomos šiame darbe.

Fragmento NcoI-BalI sintezė. Fig. 2 smulkiai parodyti pagrindiniai 35'-narių 30-narių, 18-narių ir 43-narių oligonukleotidų projektavimo principai, naudojami 65/61 bp NcoI-BalI fragmento sintezei. Šie sintezuoti 30-nariai ir 18-nariai fragmentai buvo fosforilinami jų 5' gale, naudojant T_4 polinukleotido kinazę (P-L Biochemicals). 1 μg kiekvieno oligonukleotido, įskaitant nefosforilintus 35-narius ir 43-narius, buvo aneliuojami tris minutes 95°C temperatūroje 300 mM natrio acetate (PH 7.0), po to lėtai atšaldyti iki 4

^oC. Aneliavimo mišinys kaip toks buvo naudojamas klonavimo operacijai ekspresijos plazmidės sudarymui.

DNR sekų nustatymas. DNR sekos analizė buvo atliekama būdais, aprašytais A.M. MAXAM ir W. GILBERT (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, (1977), 5463-5467).

Baltymų analizė. Ląstelių sankaupos, turinčios optinį tankį OD₆₃₀ lygų 1, buvo gaunamos įvairiose kamienų, turinčių žmogaus proapo A-I ekspresijos plazmidės pULB9291, pULB9292, pULB9296 or pULB9299, fermentavimo stadijose (transformuotų atitinkamai į *E. coli* kamieną AR58, JM101 arba į mielių kamieną 10S44c). Kiekvienas pavyzdys resuspenduotas 50 mM Tris-HCL buferyje, pH 6.8, turinčiame 2% natrio dodecilo sulfato (SDS), 6 M karbamido, 10% glicerolio ir 5% merkaptioetanolio, ir virinamas 3 minutes. Pavyzdžiai tiriami elektroforezės polikrilamido geliuose būdu (Nature, 227, (1970), 680-685). Bendras baltymo kiekis nustatytas apdažant Coomassie Brilliant Blue dažų, ir sintezuotas žmogaus proapo A-I indentifikuojamas Western blot analizės būdu (žiūr. A.BOLLEN ir kt., cituota aukščiau).

Rekombinantinių vektorių žmogaus proapo A-I ekspresijai bakterijose, mielėse ir vabzdžių ląstelėse, užkrėstose bakulovirusu, konstravimas

1. Žmogaus preproapo A-I pradinis cDNR klonas: pULB1609 (Fig.1).

Buvo atrinkta keli šimtai transformantų, gaunamų klonuojant cDNRds, atitinkančią žmogaus kepenų poliA⁺ RNR, į plazmidės pBR322 saitą PstI, naudojant 22-nario apo A-I sintetinį bandinį, aprašytą aukščiau. Šiame eksperimente vieno iš klonų hibridizacijos signalas buvo intensyvus. Šis klonas, pažymėtas pULB1609, buvo išskirtas, ir šio DNR intarpo, įterpto į rekombinantinę plazmidę, nustatyta DNR seka. Jos ilgis yra 878 bazių porų (bp); ji koduoja pilną preproapo A-I polipeptidą. Kaip parodyta Fig. 1, šis klonuotas DNR fragmentas turi 5' ir 3' nekoduojančias zonas (atitinkamai 19bp ir 55bp), 54bp seką,

pCQV2 buvo aprašyta C. QUEEN, J. Mol. Appl. Genet., 2, (1983), 1-10 ir lengvai prieinama.

Šio konkretaus tipo vektoriaus pasirinkimas nebūtinas: gali būti naudojamas bet kuris kitas vektorius, turintis promotorių ir pasroviui atitinkamą NcoI saitą. Apytikriai 0.1 µg sintezuotų fragmentų, tokių kaip aprašyti aukščiau, liguojami DNR ligaze T₄, apytikriai su 1 µg 744bp BalI-PstI fragmento, gauto iš plazmidės pULB1609, ir apytikriai su 1 µg plazmidės vektoriaus pULB1221, atkirsto NcoI-BalI. Iki sujungimo operacijos 744 bp BalI-pstI fragmentas buvo apdorotas DNR polimeraze T₄ tokiu būdu, kad vyktų ištemptų galų padėtyje 3' transformacija į laisvus galus. Šis būdas gerai žinomas šios srities specialistams ir smulkiai aprašytas T. MANIATIS ir kt., cituota aukščiau.

Po amplifikacijos kompetentiškose E. coli kamieno AR58 ląstelėse sudarytos plazmidės charakterizuojamos restrikcijos saitų analizės ir sintezuotų fragmentų bei jungimo saitų DNR sekos analizės būdu. Rekombinantinė plazmidė pULB9291 atitiko visus kriterijus, kadangi ji turėjo visus fragmentus teisinga tvarka ir teisingoje orientacijoje. Ji buvo naudojama ekspresijos tyrinėjimuose.

3. Bakterinio ekspresijos vektoriaus, turinčio sujungtas sekas, atitinkančias beta-galaktozidazę ir žmogaus proapo A-I, sudarymas: pULB9296 (žiūr. Fig. 4)

Šioje struktūroje DNR seka, koduojanti žmogaus proapo A-I, buvo sujungta tesingo skaitymo rėmelyje pasroviui su beta-galaktozidazės DNR seka. Beta-galaktozidazės genas yra E. coli ekspresijos plazmidėje, pUR288, kuri yra laisvai prieinama (U. RUTHER and B. MULLER-HILL, EMBO J. 2, (1983), 1791-1794) ir kuri turi efektyviai indukuojamą promotorių lac ir atitinkamus restrikcijos saitus beta-galaktozės sekoje. Sukonstruota atitinkama rekombinantinė plazmidė, kaip parodyta Fig. 4. Pirmiausia plazmidės pUR288 seka buvo atkirsta BamHI, po to apdorota DNR polimeraze T₄ ir vėl atkertama SalI. Paskui 805 bp DNR fragmentas sudarytas iš pULB9291, suskaidant KpnI, apdorojant DNR polimeraze T₄ ir suskaidant SalI. Šie du fragmentai buvo sujungti vienas su kitu moliniu santykiu T₄ DNR ligaze ir gauta plazmidė panaudota E. coli kamieno JM101, kuris yra plačiai paplitęs ir lengvai prieinamas kamienas (ATCC Nr. 33876),

kompetentiškų ląstelių transformacijai. Transformantės buvo tikrinamos restrikcinės analizės būdu dėl teisingos žmogaus prepro A-I sekos orientacijos beta-galaktozidazės geno atžvilgiu ir atstatyto BamHI saito buvimo dviejų sekų sudūrime. Analizė parodė, kad žmogaus proapo A-I seka sujungta pasroviui beta galaktozidazės DNR sekos ir į teisingą skaitymo rėmelį. Viena iš transformančių pULB9296, patenkino visu kriterijus ir buvo naudojama ekspresijos eksperimentams.

4. Mielių ekspresijos plazmidės, turinčios žmogaus proapo A-I cDNR seką, konstravimas: pULB9299 (Fig. 5)

Šioje struktūroje cDNR seka, koduojanti žmogaus proapo A-I, klonuojama tarp promotoriaus ir terminatoriaus signalų, kuriuos turi mielių ekspresijos plazmidė. Šiam eksperimentui buvo parinktas mielių ekspresijos vektorius pRIT 10774. Ekspresijos plazmidės pRIT 10774 konstravimas yra aprašytas EP paraiškoje Nr. 151, 102. Ji buvo sukonstruota pradedant, iš vienos pusės, iš plazmidės pRIT 10749, deponuotos ATCC Nr. 39133 pagal Budapešto sutarties nuostatus ir, iš kitos pusės iš E. coli-S cerevisiae šaudyklinio vektoriaus YEp13, aprašyto J.R. BROACH ir kt., Gene, 8, (1979), 121-133, kuris yra saugomas ATCC Nr. 37115 ir yra lengvai prieinamas. Vektorius pRIT 10774 gali lengvai replikuotis ir E. coli, ir mielėse, ir turi ornitinkarbamoilo transferazės transkripcijos terminatorių bei promotorių, atskirtus unikaliu restrikcijos saitu BamHI, patogiu svetimos DNR, turinčios nuosavą ATG transliacijos iniciacijos kodoną, įterpimui. Be to, šis vektorius turi 2 μ mielių sekas, metabolinius markerius atrinkimui mielėse ir AmpA atrinkimo markerį šaudykliniam E. coli vektoriui. Tai ne vienintelis vektorius, kuris gali būti naudojamas žmogaus proapo A-I ekspresijai mielėse: gali būti naudojamas bet kuris kitas mielių vektorius, turintis reguliacinius signalus, ir tai veda prie kokybiškai vienodų rezultatų. Konstravimas iliustruotas Fig. 5, buvo atliekamas tokiu būdu. Plazmidės pRIT 10774 DNR tiesiškai išlyginamos naudojant fermentą BamHI, ir veikiamos DNR polimeraze T₄. Iš kitos pusės, 810 bp DNR fragmentas gaunamas iš pULB9291, suskaidant fermentais Asp718 ir SalI, paskui veikiant DNR polimeraze T₄. Šis fragmentas koduoja žmogaus proapo A-I ir apima transliacijos iniciacijos kodoną. Šie du fragmentai, gauti kaip aprašyta aukščiau, buvo susiuvami vienas su kitu ekvimoliniu

santykiu DNR ligaze T₄, ir šis mišinys buvo naudojamas kompetentinių E. coli MM294 ląstelių transformacijai. Transformuojančių kontrolė buvo atliekama restrikcijos analizės būdu, įgalinant patikrinti žmogaus proapo A-I DNR sekos teisingą orientaciją promotoriaus ARG3 sekos atžvilgiu. Viena iš transformuojančių turi rekombinantinę plazmidę pULB9299, kuri patenkina šias sąlygas. Plazmidė pULB9299 buvo amplifikuojama E. coli ir naudojama mielių Saccharomyces cerevisiae kamieno 10S44c (pep4-3, leu2-3, leu2-112) sferoplastų transformacijai; (T. CABEZON ir kt. cituota aukščiau). Naudojant kamieną Ic 1679 (ATCC Nr. 20631), gaunami kokybiškai analogiški rezultatai. Paskui mielių transformantės buvo tiriamos dėl žmogaus proapo A-I ekspresijos.

5. Bakterinio sekrecijos vektoriaus, turinčio žmogaus proapo A-I cDNR seką, konstravimas: pNIV1612 (Fig. 6A, B, C)

DNR seka koduojanti žmogaus proapo A-I, sujungiamą pasroviui teisingo skaitymo rėmelyje su E. coli Ompa baltymo signalinio peptido DNR seka. Šiam eksperimentui buvo parinktas sekrecijos vektoriaus pIN-III-ompA-2 (J. GHAYEB ir kt., EMBO J., 3, (1984), 2437-2442). Šis vektorius ir jo šeimininkas E. coli kamienas JA221 yra prieinami ir gali būti gauti Niujorko Valstybinio Universiteto Biochemijos skyriuje.

Šis sekrecijos vektorius turi stiprų lpp (lipoproteino) promotorių, promotoriaus-operatoriaus lac fragmentą, represoriaus lac seką lacI ir atitinkamus restrikcijos situs, išdėstytus betarpiškai po sekos, koduojančios signalinį ompA peptidą. Tinkama rekombinantinė plazmidė sukonstruota kaip parodyta Fig. 6A, B ir C. Pirmiausiai sekrecijos vektorius pIN-III-ompA-2 buvo tiesiškai išlygintas su EcoRI ir apdirbtas DNR polimeraze T₄. Po to 805 bp DNR fragmentas išskiriamas iš pULB9291, suskaidytos iš eilės restrikcijos fermentais KpnI ir SalI, po to apdirbant DNR polimeraze T₄. Šis fragmentas koduoja žmogaus proapo A-I ir turi ATG transliacijos iniciacijos kodoną. Abu fragmentai, gauti kaip nurodyta aukščiau, susiuvami vienas su kitu ekvimoliniu santykiu, naudojant DNR ligazę T₄, ir šis susiūtas mišinys naudojamas E. coli kamieno JA221 kompetentiškų ląstelių, kultivuotų terpėje M9 (J.H. MILLER, "Experiments in Molecular

Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1972, p. 431), turinčioje triptofano (200 mg/l), leucino (20 mg/l), laktozės (2 g/l) ir ampicilino (50 mg/l), transformacijai. Transformantės buvo parinktos pagal jų atsparumą ampicilinui ir buvo sijoamos su 18-nariu sintezuotu oligonukleotidu (tas pats, kuris buvo naudojamas adapterio sintezėje, kaip parodyta Fig. 2). Atrinktos transformantės buvo tikrinamos restrikcijos analize, nustatant, ar teisinga proapo A-I DNR sekos orientacija signalinio peptido, kurio nešiklis yra sekrecijos vektorius, sekos atžvilgiu (atstatomas taškas EcoRI šių dviejų sekų sujungime). Viena iš transformančių turi rekombinantinę plazmidę, tenkinančią šią sąlygą. Papildoma seka iš adapterio, pabraukta žemiau pateikiamoje nukleotidų sekoje:

5' GTA GCG GAG GCC GCT GAA TTC ATG AGA CAT TTC TGG 3'

Val Ala Gln Ala Ala Glu Phe Met Arg His Phe Trp

aa₋₆

buvo pašalinta kryptinga mutageneze. Tam buvo atlikta žemiau pateikiamo 24-nario oligonukleotido:

signalinis peptidas —> <— proapo A-I

5' GTA GCG GAG GCC AGA CAT TTC TGG 3'

Val Ala Gln Ala Arg His Phe Trp

netekusio 12 papildomų bazių, sintezė, ir jis toliau buvo naudojamas pašalinti 12 bazių linkerio seką.

Mutagenezės atlikimui buvo naudojama Amersham sistema. Ji remiasi F. ECKSTEIN ir kt. būdu (Nucleic Acids Res. 13, (1985), 8765-8785). Šiuo būdu gaunama didelė produkto išeiga ir didžiausias efektyvumas iš visų egzistuojančių būdų: iki 95%. Pirmiausiai DNR sritis, kuri turi būti mutagenizuota, klonuojama į vektorių M13. Tam rekombinantinės plazmidės pIN-III-ompA-2 DNR fragmentas XbaI-BalI, turintis proapo A-I geną, įterpiamas į vektorių M13mp19, atkirstą XbaI ir HindIII. Vektorius M13mp19 komerciškai prieinamas; jis gali būti gautas iš Amersham firmos (Buckinghamshire, England). Tada

mutageninis 24-naris nukleotidas hibridizuojamas vienagrandine matrica ir ištempiamas DNR polimerazės Klenow fragmentu, dalyvaujant DNR ligazei T₄, kad būtų gautas mutantinis heterodupleksas.

Selektyvus nemutantinės grandinės pašalinimas galimas, įvedant tionukleotidą į mutantinę grandinę sintezės metu in vitro sąlygose, ir suskaidant nefosforotionuotą grandinę NciI. Toks įtrūkimas turi saitą ekzonukleazei III, kuri suardo grandinę, kuri nėra mutantas. Tokiu atveju grandinė, kuri yra mutantas, naudojama kaip matrica žiedinės molekulės su dviguba grandine pertvarkymui, susidarant homodupleksinei mutantinei molekulei. Tokia mutagenezė patvirtinama atrenkant jungtį tarp signalinio peptido ir proapo A-I geno sekos pradžia. Rekombinantinė plazmidė pNIV1612 pertvarkoma, susiuvant vektoriaus pIN-III-ompA-2 fragmentą XbaI-HindIII su fragmentu XbaI-BalI DNR fragmentu, kuris netekęs 12 papildomų bazių, ir su proapo A-I geno fragmentu BalI-HindII. Šie trys fragmentai liguojami DNR ligaze T₄, ir šis mišinys naudojamas E. coli kamieno JA221 kompetentinių ląstelių transformacijai, kaip aprašyta aukščiau. Šios transformantės atrenkamos pagal atsparumą ampicilinui ir sijojamo 18-nariu oligonukleotidu, aprašytu aukščiau. Vienas iš transformantų turi rekombinantinę plazmidę pNIV1612. Šioje baigtinėje struktūroje seka, koduojanti signalinį peptidą ompA, eina prieš pilną proapo A-I seką be kodono ATG (Fig. 6a, B ir C). E. coli transformantės išbandomos dėl proapo A-I ekspresijos.

6. Pernešimo vektoriaus žmogaus proapo A-I cDNR sekos įvedimui į bakulovirusą konstravimas: pNIV1613 (Fig. 7)

Plazmidė pNIV1613, turinti žmogaus proapo A-I DNR seką, buvo sudaryta, išdėstant segmentą, išvestą iš klonu pULB9291 pasroviui bakuloviruso polihedrino geno promotoriaus (Fig. 7). Šiame eksperimente buvo naudojamas bakuloviruso pernešimo vektorius pAcRP6 (Y. MATSUURA ir kt., J. Gen. Virol. 67, (1986), 1515-1529). Jis gali būti gautas iš Otavos Universiteto Mikrobiologijos ir Imunologijos skyriaus. Ši plazmidė turi polihedrino geno promotorių iki nukleotido -7 lyderinėje sekoje 5'; joje nėra polihedrino ATG kodono ir pirmųjų 170 nukleotidų sekos, koduojančios polihedrino. Pageidaujamas

BamHI saitas yra pasroviui nukleotido -7. Konstravimas, iliustruotas Fig. 7., buvo atliekamas taip. Plazmidės pAcRP6 DNR tiesiškai išlyginama su BamHI. Be to, 810 bp DNR fragmentas išskiriamas iš pULB9291, suskaidant restrikciniiais fermentais Asp718 ir SalI. Šis fragmentas koduoja žmogaus proapo A-I ir turi ATG transliacijos iniciacijos kodoną. Šie du fragmentai ekvimoliniu santykiu kartu veikiami DNR polimeraze T₄, susiuvami DNR ligaze T₄ ir naudojami E. coli štamo AR58 kompetentinių ląstelių transformacijai. Šios transformantės atrenkamos pagal jų atsparumą ampicilinui, sijojamo 35-nariu ⁹²P- žymėtu oligonukleotidu (žiūr. Fig. 2), atitinkančiu proapo A-I DNR sekos dalį, ir restrikcine analize kontroliuojama proapo A-I DNR sekos teisinga orientacija polihedrino geno promotoriaus atžvilgiu. Viena iš šių transformančių turi rekombinantinę plazmidę pNIV1613, kuri tenkina šią sąlygą, ji naudojama ekspresijos eksperimentuose.

7. Žmogaus proapo A-I produkavimas transformuotais mikroorganizmais

20 ml E. coli kamieno AR58 arba JM101 kultūros, transformuotos atitinkamai pULB9291 ir pULB9296, buvo kultivuojamos praturtintoje terpėje, papildytoje 50 µg/ml ampicilino (kultūrinis buljonas LB, žiūr. T. MANIATIS ir kt. eksperimento detalėms išaiškinti, čia cituota aukščiau), iki tol, kol optinis tankis ties 630 nm (OD₆₃₀) pasiekia 0.6. pULB9291 atveju promotoriaus lambda P_L indukcija buvo įgyvendinta, pakeičiant pradinės kultūros augimo sąlygas nuo 30 °C iki 42 °C, taip kad vyksta promotoriaus lambda P_L slopintojo inaktyvacija (M. ROSENBERG ir kt., Methods Enzymol. 101, (1983), 123-138). Indukcija buvo atliekama 20 minučių.

pULB9296 atveju promotoriaus lac indukcija įgyvendinama, įvedant į kultūrą, inkubuotą 37 °C temperatūroje, cheminį induktorių IPTG (izopropil-beta-D-tiogalaktozidą) iki tol, kol pasiekiamą galutinę 1 mM koncentraciją (L) LORENZETT ir kt., cituota aukščiau). Indukcija vyko 60 minučių.

Iš kitos pusės, kultūros, susidedančios iš 20 ml mielių ląstelių 10S44c, transformuotų pULB9299, kultivuojamos 30 °C temperatūroje azotintos bazės mielėms terpėje (Difco),

papildytoje gliukoze (1%) iki tol, kol optinis tankis ties 630 nm pasiekia 0.6. Nereikalingas nė vienas induktorius, kadangi šiuo konkrečiu atveju ekspresija savaiminė.

Atrenkami 1 ml aukščiau nurodytų kultūrų pavyzdžiai, ir jie centrifuguojami su 15 000 g penkias minutes. Gautos nuosėdos lizuojamos verdančiame natrio dodecilsulfate (SDS). Šios sankaupos suspenduojamos 50 µl buferio, turinčio SDS (5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 6 M karbamido, 5% 2-merkaptioetanolio ir 10 % glicerolio), ir ši suspensija buvo virinama 3 minutes 100 °C temperatūroje. Po to ekstraktai centrifuguojami su 15000 g 10 minučių. Taip šie pavyzdžiai buvo paruošti analizei elektroforeze ant poliakrilamidiniuose geliuose, turinčiuose 15 % arba 7.5 %, SDS, denatūruojančiose sąlygose (U.K. LAEMMLI, cituota aukščiau).

Po elektroforezės poliakrilamidiniai geliai buvo greitai perplauti 40 ml distiliuoto vandens ir 40 ml buferinio natrio fosfato (50 mM) tirpalo su pH 7.5. Po to šie baltymai elektriškai pernešami nuo gelių ant nitroceliuliozinio lapo per dvi valandas, esant 60 V ir 1.5 A tame pačiame buferiniame fosfato tirpale (T. CABEZON ir kt., cituota aukščiau). Nitroceliulioziniai lapai prisotinami albuminu (1%) 50 mM natrio fosfato buferyje, pH 7.5, tada jie inkubuojami kambario temperatūroje per naktį su triušio anti-žmogaus apo A-I serumu, praskiestu 1/500 (plazmidės pULB9296 atveju su monoklonalniais pelės anti-beta-galaktozidazės antikūnais) tame pačiame buferiniame tirpale, tik be albumino. Šie lapai penkis kartus perplauti 40 ml to paties fosfatinio buferio tirpalu ir po to inkubuojami 40 ml fosfatinio buferio tirpalo, turinčio 10 µg/ml peroksidaze žymėto asilo anti-triušio antikūno arba anti-pelės antikūno serumo. Po 4 valandų inkubavimo kambario temperatūroje šie lapai buvo penkiskart perplauti 40 ml fosfatinio buferio tirpalo ir galiausiai ryškinami, pridėjus 50 ml chromogeninio substrato tirpalo (10 mg diaminobenzidino, 100 µl karbamido peroksido (10%), 100 mM Tris-HCl su pH 7.6). pULB9291 ir pULB9299 atveju buvo rastas vienintelis produktas, reaguojantis su anti-žmogaus apo A-I antikūnais. Šio produkto molekulinė masė atitinka molekulinę etaloninio natūralaus apo A-I masę. pULB9296 atveju buvo rastas sujungtas polipeptidas, kurio dydis atitinka beta-galaktozidazės ir proapo A-I polipeptidų sumai (144 kDa), reaguojantis su žmogaus anti-apo A-I serumu ir anti-beta galaktozidazės serumu. Šie

išmatavimai nustatyti iš anksto pagal kalibracinę kreivę, paremtą molekulinės masės etalonų, esančių tuose pačiuose galuose, kaip ir ląsteliniai ekstraktai, migracija.

Kitame eksperimente 20 ml *E. coli* kamieno JA221 kultūrų, transformuotų pNIV1612, kultivuojama praturtintoje terpėje, papildytoje 50 µg/ml ampicilino (maitinimo buljonas LB, žiūr. T. MANIATIS ir kt., cituota aukščiau), iki tol, kol optinis tankis ties 630 nm pasiekė 0.6, lac promotoriaus indukcija, įvedant į kultūrą, inkubuotą 37 °C temperatūroje, cheminį induktorių IPTG (izopropil-beta-D-tiogalaktozidą) buvo vykdoma iki tol, kol buvo pasiekta galutinė 2 mM koncentracija. Indukcija atliekama 60 minučių. Atrenkami šių kultūrų pavyzdžiai po 1 ml ir centrifuguojama su 15 000 g penkias minutes. Gautos nuosėdos surenkamos nedidelio osmotinio poveikio būdu, kad būtų išlaisvintos periplazminės frakcijos (D. KOSHLAND and D. BOTSTEIN, Cell, 20, (1980), 749-760), išlaisvinta frakcija buvo suspenduota buferiniame pavyzdžio tirpale, turinčiame SDS, minėto aukščiau, bet be karbamido, suspensija buvo pašildyta iki virimo, centrifuguota ir atliekama elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje (SDS koncentracija 12.5 %), ir imunodetekcinė analizė po elektroforezinio pernešimo. Sintezuoto proapo A-I frakcija randama šioje ląstelėje, bet ne periplazmoje. Taip yra dėl to, kad proapo A-I neišskiriamas, arba dėl to, kad osmotinio poveikio efektyvumas nėra optimalus. Proapo A-I pagrindinė frakcija buvo rasta laisvoje būklėje šioje terpėje po osmotinio poveikio, tuo parodydama, kad ląstelės baltymą išskiria.

8. Užkrėstų bakulovirusu vabzdžių ląstelių žmogaus proapo A-I produkavimas

Rekombinantinė plazmidė pNIV1613 buvo naudojama kartu su laukiniu bakuloviruso kamieniu, kad kartu įvyktų Spodoptera frugiperda ląstelių užkrėtimas kultūroje. Paėmus rekombinantinių virusų, netekusių polihedrino, prabą, buvo gautos rekombinantinės kolonijos. Rekombinantinis virusas, išvalytas nuo kolonijos, buvo naudojamas vabzdžių ląstelių užkrėtimui. Ši procedūra grai žinoma šios srities specialistams ir sulikiai aprašyta M.D. SUMMERS and G.E. SMITH "A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and insect cell culture Procedures, Texas University, College Station, (1987)". Šis rekombinantinis virusas buvo tirtas dėl proapo A-I produkavimo imunologiniu Western

blot analizės būdu ir elektroforeze poliakrilamidiniame gelyje (SDS koncentracija 12.5 %), po ląstelių buvo lizavimo RIPA buferiu (0.05 M Tris-HCl buferis, pH 7.2, turintis 0.15 M NaCl, 1 % Triton X100, 0.1 % SDS, 0.1 % natrio dezoksicholato ir 1 mM fenilmetilsulfonilo fluorido (PMSF)) ir apdorojimo verdančiu SDS. Buvo surastas vienas vienintelis produktas, reaguojantis su anti-žmogaus apo A-I antikūnais. Jo molekulinė masė atitinka natūralaus apo A-I etalono molekulinę masę, ir šis ekspresuotas baltymas yra pagrindinis bendro baltymų kiekio komponentas. Proapo A-I koncentracija kultūros litrui, išmatuota paprasta radialine imunodifuzija (G. MANCINI ir kt. *Immunochem.* 2, (1965), 235-254), buvo apie 100 mg.

9. Žmogaus proapo A-I citoplazminis produkavimas *E. coli*. Nustatytos minimalios terpės panaudojimas

Citoplazminiam žmogaus proapo A-I produkavimui *E. coli* minimalioje terpėje buvo naudojama plazmidė pULB9292. Plazmidė pULB9292 buvo sukonstruota plazmidės pULB9291, koduojančios promotorių lambda P₄, fragmento EcoRI-NcoI pakeitimu plazmidės pOTS fragmentu EcoRI-NcoI (M. ROSENBERG ir kt. *Methods Enzymol.* 101, (1983), 123-138). Vektoriaus pOTS fragmentas EcoRI-NcoI (G. DEVARE ir kt., *Cell* 36, (1984), 43-49) turi taip pat efektyvų ir reguliuojamą fago lambda P_L promotorių. *E. coli* kamieno AR58, transformuoto plazmide pULB9292, 20 ml kultūros auginta nustatytoje minimalioje terpėje. Minimalios terpės sudėtis tokia (1 litrui): 3 g Na₂HPO₄·2H₂O; 3 g KH₂PO₄; 0.5 g NaCl; 1 g NH₄Cl; 1.37 mM MgSO₄·7H₂O; 29.5 μM FeCl₃·6H₂O; 236 μM MnSO₄·H₂O; 10 g gliukozės; 1 μg vitamino B1, 50 mg ampicilino; LB buljono 1/20 (tūr./tūr.). Ląstelės buvo kultivuojamos šioje minimalioje terpėje iki tol, kol optinis tankis ties 630 nm pasiekė 0.5. Promotoriaus lambda P_L indukcija pasiekama, pakeičiant pradinės kultūros augimo sąlygas nuo 30 iki 42 °C taip, kad būtų inaktyvuotas promotoriaus lambda P_L slopintojas (M. ROSENBERG ir kt., cituota aukščiau). Indukcija vykdoma 60 minučių. Buvo atrinkti kultūrų pavyzdžiai po 1 ml ir praleisti per French presą arba centrifuguoti su 15000 g penkias minutes. Gautas bendras ląstelinis

ekstraktas arba nuosėdos apdirbamos SDS verdant, kaip aprašyta 7 sk. Po elektroforezės ir Western blot analizės gautas vienas vienintelis produktas, kuris reaguoja su anti-žmogaus apo A-I antikūnais. Šio produkto molekulinė masė atitiko etaloninio natūralaus apo A-I molekulinę masę. Ekspresuoto proapolipoproteino A-I kiekis nustatytoje minimalioje terpėje sudaro 13.5 % bendro baltymo kiekio t.y., apskaičiuota proapo A-I koncentracija sudaro maždaug 270 mg kultūros litrui.

10. Žmogaus proapo A-I, produkuojamo transformuotais mikroorganizmais, išskyrimas, valymas ir charakterizavimas

10.1. Išskyrimas ir valymas

Proapo A-I rekombinanto nevalyti ekstraktai centrifuguojami 15 minučių su 4000 g ir nuosėdos išskiriamos. Supernatantas centrifuguotas su 100000 g dvi valandas. Gautos nuosėdos buvo suspenduotos minimaliame buferinio tirpalo tūryje (TEN100), turinčiame 20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1.75 µg/ml PMSF ir 100 µg/ml natrio mertiolato (etilgyvsidabrio-tionsalicilo rūgšties natrio druska), ir nurodyti suspensijos bei supernatanto tūriai atskirai vienas nuo kito praskiesti iki pradinio ekstrakto tūrio su tokiu buferiniu tirpalu. Po to baltymas nusodinamas abiejose suspensijose, didinant izopropilo alkoholio koncentraciją. Radialinės imunodifuzijos būdu (G. MANCINI ir kt., cituota aukščiau), panaudojant pramoninį apo A-I etaloną, buvo nustatyta kiekvienos suspensijos nusodinto baltymo frakcija, kuri sudarė pagrindinę imunoreaktyvumo dalį, atitinkančią žmogaus apo A-I. Tokiu būdu gauta kiekviena frakcija toliau gryninama chromatografijos būdu Sephacryl S200 kolonėlėje, panaudojant tą patį buferinį tirpalą kaip eliuentą. 0.9 ml frakcijos buvo surinktos, ir radialinės imunodifuzijos būdu kiekvienoje frakcijoje buvo nustatytas bendras baltymo, pasižyminčio imunoreaktyvumu, atitinkančiu apo A-I imunoreaktyvumą, kiekis. Baltymo, išplauto eliucija šiose frakcijose, molekulinė masė nustatoma kalibruojant kolonėlę žinomos molekulinės masės etalonais, tokiais kaip aldolazė, jaučio serumo albuminas, ovalbuminas, chimotripsinogenas ir citochromas C2 identiškose sąlygose. Proapo A-I grynumas 1-am

mg bendro baltymo pagrindinėse frakcijose, turinčiose tą patį imunoreaktyvumą, kaip ir pramoninio apo A-I etalono, buvo 95 %.

10.2. Charakterizavimas

10.2.1. Fizinės rekombinantinio proapo A-I savybės

Centrifuguojant su 100000 g rekombinantinį proapo A-I, išvalytą ir atskirtą nuo supernatanto, nuosėdų izoelektriniu fokusavimu pagal N. CANSIMPOOLAS (Anal. Biochem. 26, (1969), 54-62) ir naudojant savaiminį pH gradientą nuo 4 iki 6, buvo gauta viena vienintelė juosta su izoelektriniu tašku 4.95. Plazmos apo A-I buvo truputį labiau rūgštinis ir jo izoelektrinis taškas buvo 4.75. Šis 0.2 skirtumas pH dydyje tarp rekombinantinio apo A-I ir plazmos A-I izoelektrinių taškų gerai atitiko tą skirtumą, kuris kaip buvo pranešta aukščiau, lygus 0.17 (G.L. MILLS ir kt., Lab. Tech. Biochem. Mol. 14, (1984), 244-245). Kai dėl molekulinės masės, nuosėdų ir supernatanto rekombinantiniai proapo A-I abu susidėjo iš vienos vienintelės identiškos 29.9 ± 1.4 kDa molekulinės masės polipeptidinės grandinės. Žmogaus plazmos apo A-I buvo truputį mažesnis turėjo molekulinę masę, lygią 29.3 ± 1.3 kDa.

10.2.2. Rekombinantinio proapo A-I peptidinio žemėlapių sudarymas su BNPS-skatolu

Buvo atliekamas cheminis suskaldymas su 3-bromo-3-metil-2-[(2-nitrofenil)tio]-3H-indolu (BNPS-skatolu) pagal A.FONTANA būdą (Methods Enzym. 25, (1972), 419-423). 5-10 µg išvalytų baltyminių preparatų buvo ištirpinta 100 µl fenolio tirpalo (0.15 % tūrio %), vandeniniame (50 tūrio %) acto rūgšties tirpale. Tada buvo pridėta 50 µl BNPS-skatolo (4.8 mg mililitrui) tirpalo ledinėje acto rūgštyje, po to inkubuojama 25 °C temperatūroje 72 valandas. Paskui buvo pridėta 50 µl 2-merkaptioetanolio ir vėl inkubuojama 37 °C temperatūroje 5 valandas. Pavyzdžiai buvo išgarinti, vėl ištirpinti 100 µl vandens ir ekstrahuoti 200 µl etilo acetato. Organinės fazės buvo atskirtos, o vandeninės fazės liofilizuotos bei analizuojamos SDS-poliakrilamido gelio elektroforeze.

Cheminio suskaldymo su BNPS-skatolu atveju fragmentų iš apo A-I skaičius ir dydis gali būti daugiau ar mažiau numatytas, kadangi naudojamose eksperimento sąlygose BNPS-skatolas selektyviai skaldo po triptofano likučių. Jei darysime prielaidą, kad skilimo efektyvumas yra 100 % kiekviename skilimo taške, didžiausias fragmentas, kurio galima tikėtis, yra C-galo 15.4 kDa fragmentas. Likusių fragmentų molekulinė masė yra nuo 0.5 iki 5.3 kDa ir tuo būdu jie yra per maži, kad juos galima būtų nustatyti. Nepilno skilimo atveju 15.4 kDa fragmentas bus išplėstas N-galo kryptimi, taip gaunant atitinkamai 20.7 kDa, 23.1 kDa ir 27.6 kDa fragmentus. Šie numatymai yra puikiai patvirtinami žmogaus plazmos apo A-I ir įvairiems išvalytiems rekombinantinio proapo A-I preparatams.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Rekombinantinė DNR seka, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji apima seką, kuri koduoja žmogaus proapolipoproteiną A-I, kurioje natūralios koduojančios sekos dalis yra pakeista DNR fragmentu, koduojančiu tas pačias aminorūgštis, bet susidedančiu iš kitos nukleotidų sekos, taip kad sumažinamas arba visai panaikinamas smeigtukų pavidalo struktūrų susidarymas.
2. DNR seka pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad natūrali seka, koduojanti proapolipoproteino A-I aminorūgštis nuo -6 iki +14, yra pakeista tokia seka (nurodyta tik viena grandinė):
5'-ATGAGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGG
GATAGAGTTAAGGACTTG-3'
ir nurodyta seka apima papildomą ATG translacijos iniciacijos kodoną bei modifikuotus kodonus aminorūgščių grupėms -6, -1, +1, +3, +4, +5, +6, +7, +10, +11 ir +14.
3. Replikuojamas klonavimo vektorius, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis apima rekombinantinę DNR seką pagal 1 arba 2 punktą.
4. Ekspresijos vektorius, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis apima rekombinantinės DNR seką pagal 1 arba 2 punktą, operaciniu būdu sujungtą su reguliacine DNR seka ir apsuptą translacijos iniciacijos ir užbaigimo signalais.
5. Ekspresijos vektorius pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad reguliacinė DNR seka apima fago lambda P_L promotoriaus sritį.

6. Ekspresijos vektorius pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad žmogaus proapolipoproteino A-I DNR seka yra sujungta pasroviui beta-galaktozidazės DNR sekos ir reguliacinė DNR seka apima pratoriaus lac sritį.
7. Ekspresijos vektorius pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad reguliacinė DNR apima mielių ARG3 pratoriaus ir transkripcijos terminatoriaus sritis.
8. Ekspresijos vektorius pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad žmogaus proapolipoproteino A-I DNR seka be ATG kodono sujungta pasroviui E. coli OmpA baltymo signalinio peptido DNR sekos, ir tuo, kad reguliacinė DNR seka apima pratoriaus lpp ir pratoriaus-operatoriaus lac sritis.
9. Ekspresijos vektorius pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad reguliacinė DNR seka apima polihedrino bakuloviruso geno pratoriaus sritį.
10. Rekombinantinė plazmidė, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji yra parinkta iš grupės, apimančios pULB9291, pULB9296, pULB9299, pNIV1612 ir pNIV1613.
11. Ląstelės kultūra arba mikroorganizmas, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad jie transformuoti ekspresijos vektoriumi pagal bet kurį iš 4-9 punktų.
12. Ląstelės kultūra arba mikroorganizmas, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad jie transformuoti rekombinantine plazmide pagal 10 punktą.
13. Žmogaus proapolipoproteino A-I gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad į jį įeina transformuotos ląstelės arba mikroorganizmo pagal 11 arba 12 punktą kultivavimas tinkamose sąlygose ir taip produkuoto žmogaus proapolipoproteino A-I išskyrimas.

LT 3600 B

10 20 30 40 50 60 70
 TCCCCACGGCCCTTCAGGATGAAAGCTGCGGTGCTGACCTTGGCCGTGCTCTTCTGACGGGGAGCCAGGCTCGGCA
 M K A A V L T L A V L F L T G S Q A R H
 -20 -10

80 90 100 110 120 130 140 150
 TTTCTGGCAGCAAGATGAACCCCCCAGAGCCCCTGGGATCGAGTGAAGGACCTGGCCACTGTGTACGTGGATGTGCTC
 F W Q Q D E P P Q S P W D R V K D L A T V Y V D V L
 1 10 20

160 170 180 190 200 210 220 230
 AAAGACAGCGGCAGAGACTATGTGTCCAGTTTGAAGGCTCCGCCCTGGGAAAACAGCTAAACCTAAAGCTCCTTGACA
 K D S G R D Y V S Q F E G S A L G K Q L N L K L L D
 30 40

240 250 260 270 280 290 300 310
 ACTGGGACAGCGTGACCTCCACCTTCAGCAAGCTGCGCGAACAGCTCGGCCCTGTGACCCAGGAGTTCTGGGATAACCT
 N W D S V T S T F S K L R E Q L G P V T Q E F W D N L
 50 60 70

320 330 340 350 360 370 380 390
 GGAAAAGGAGACAGAGGGCCTGAGGCAGGAGATGAGCAAGGATCTGGAGGAGGTGAAGGCCAAGGTGCAGCCCTACCTG
 E K E T E G L R Q E M S K D L E E V K A K V Q P Y L
 80 90 100

400 410 420 430 440 450 460 470
 GACGACTTCCAGAAGAAGTGGCAGGAGGAGATGGAGCTCTACCGCCAGAAGGTGGAGCCGCTGCGCGCAGAGCTCCAAG
 D D F Q K K W Q E E M E L Y R Q K V E T L R A E L Q
 110 120

FIG. 1A

LT 3600 B

480 490 500 510 520 530 540 550
 AGGGCGCGCGCCAGAAGCTGCACGAGCTGCAAGAGAAGCTGAGCCCACTGGGCGAGGAGATGCGCGACCGCGCGCGCGC
 E G A R Q K L H E L Q E K L S P L G E E M R D R A R A
 130 140 150

560 570 580 590 600 610 620 630
 CCATGTGGACGCGCTGCGCACGCATCTGGCCCCCTACAGCGACGAGCTGCGCCAGCGCTTGGCCGCGCGCCTTGAGGCT
 H V D A L R T H L A P Y S D E L R Q R L A A R L E A
 160 170 180

640 650 660 670 680 690 700 710
 CTC AAGGAGAACGGCGGCGCCAGACTGGCCGAGTACCAGGCCAAGGCCACCGAGCATCTGAGCAGCTCAGCGAGAAGG
 L K E N G G A R L A E Y H A K A T E H L S T L S E K
 190 200

720 730 740 750 760 770 780
 CCAAGCCCGCGCTCGAGGACCTCCGCCAAGGCCTGCTGCCCGTGTGAGAGCTTCAAGGTCAGCTTCCTGAGCGCT
 A K P A L E D L R Q G L L P V L E S F K V S F L S A
 210 220 230

790 800 810 820 830 840 850 860
 CTCGAGGAGTACACTAAGAAGCTCAACACCCAGTGAGGCGCCCGCCCGCCCCCTTCCCGGTGCTCAGAATAAACGT
 L E E Y T K K L N T Q
 240 Stop

870 878
 TTCCAAAGTGGG

FIG. 1B

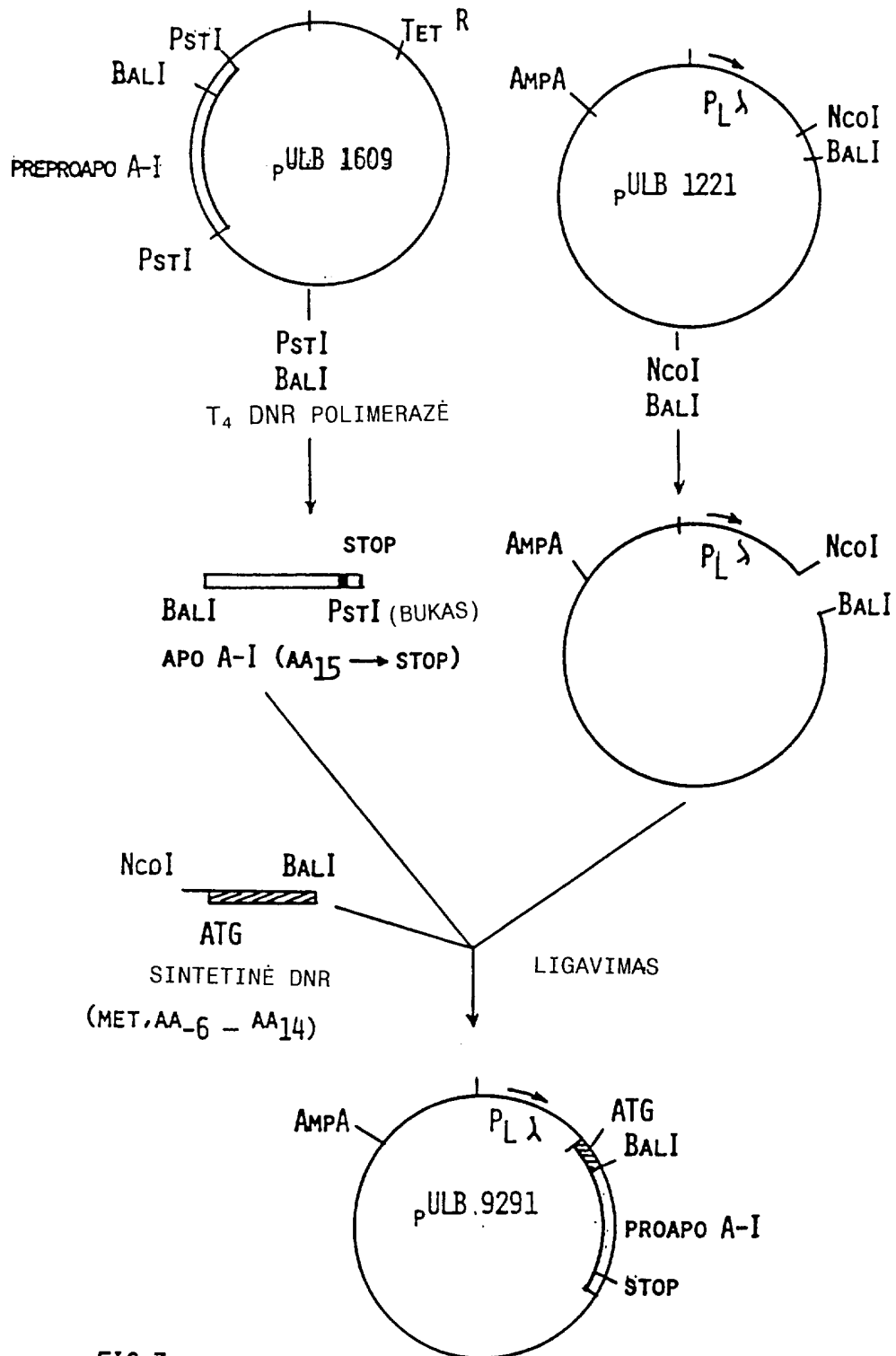


FIG.3

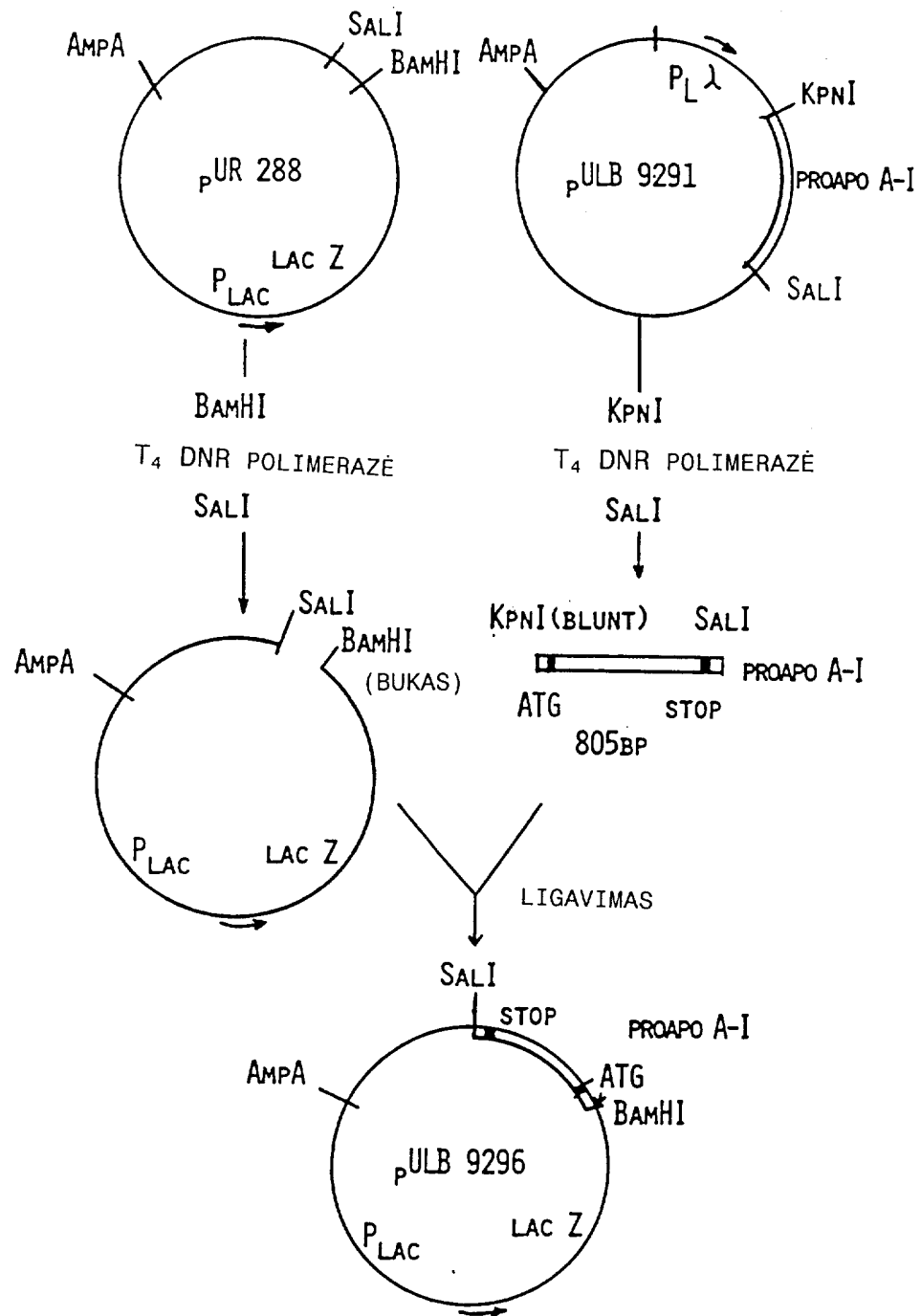


FIG.4

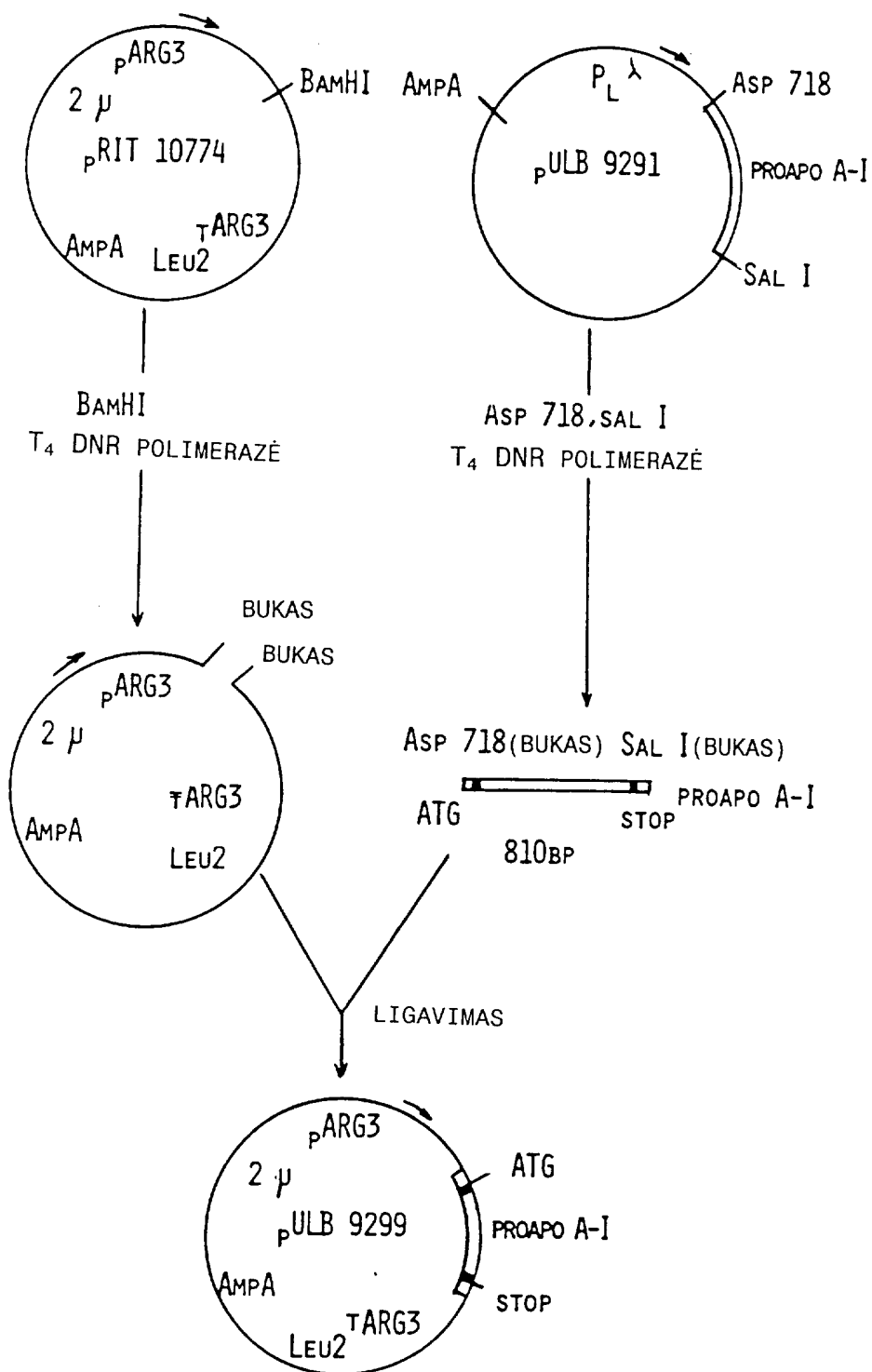


FIG.5

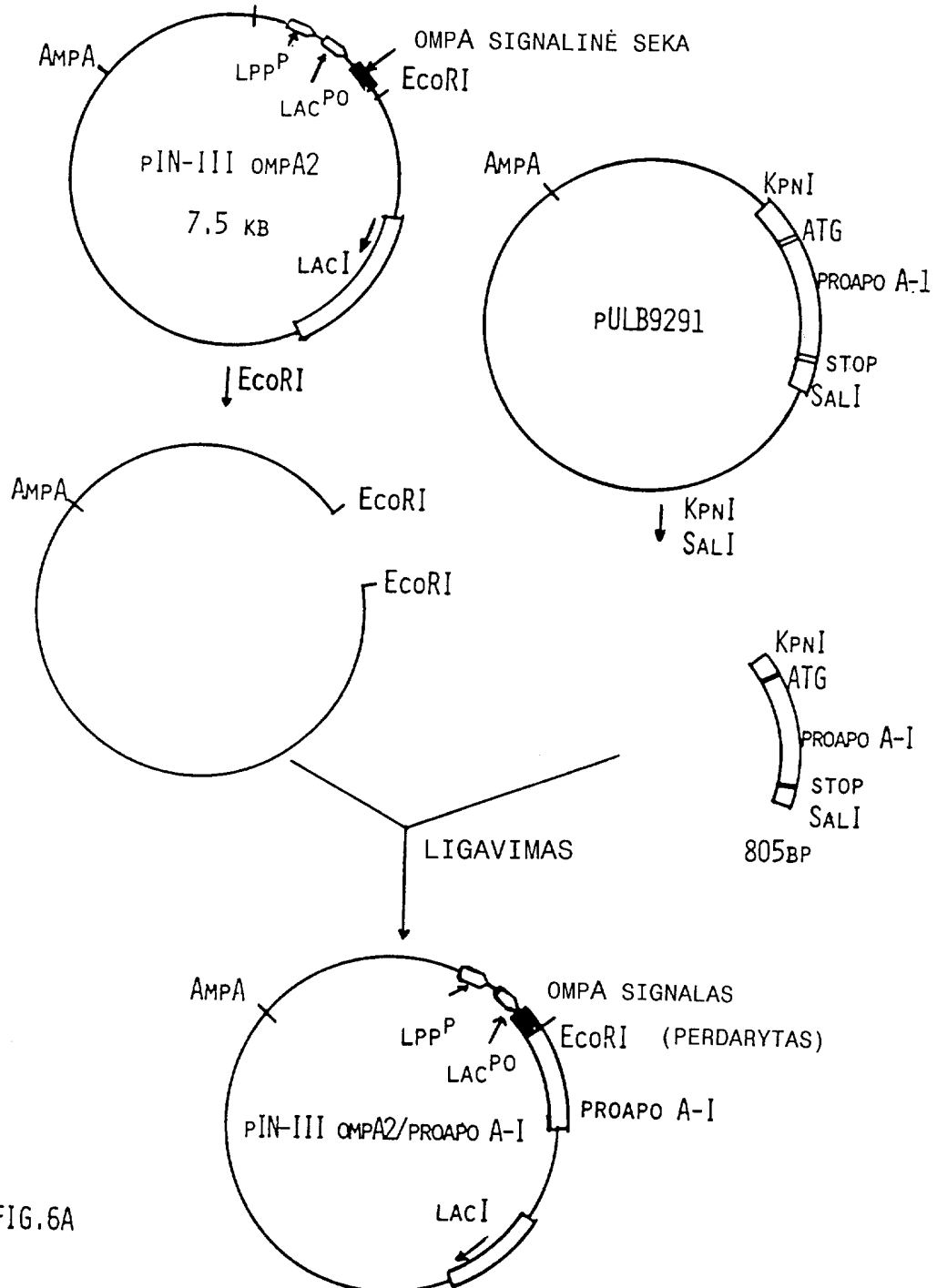


FIG.6A

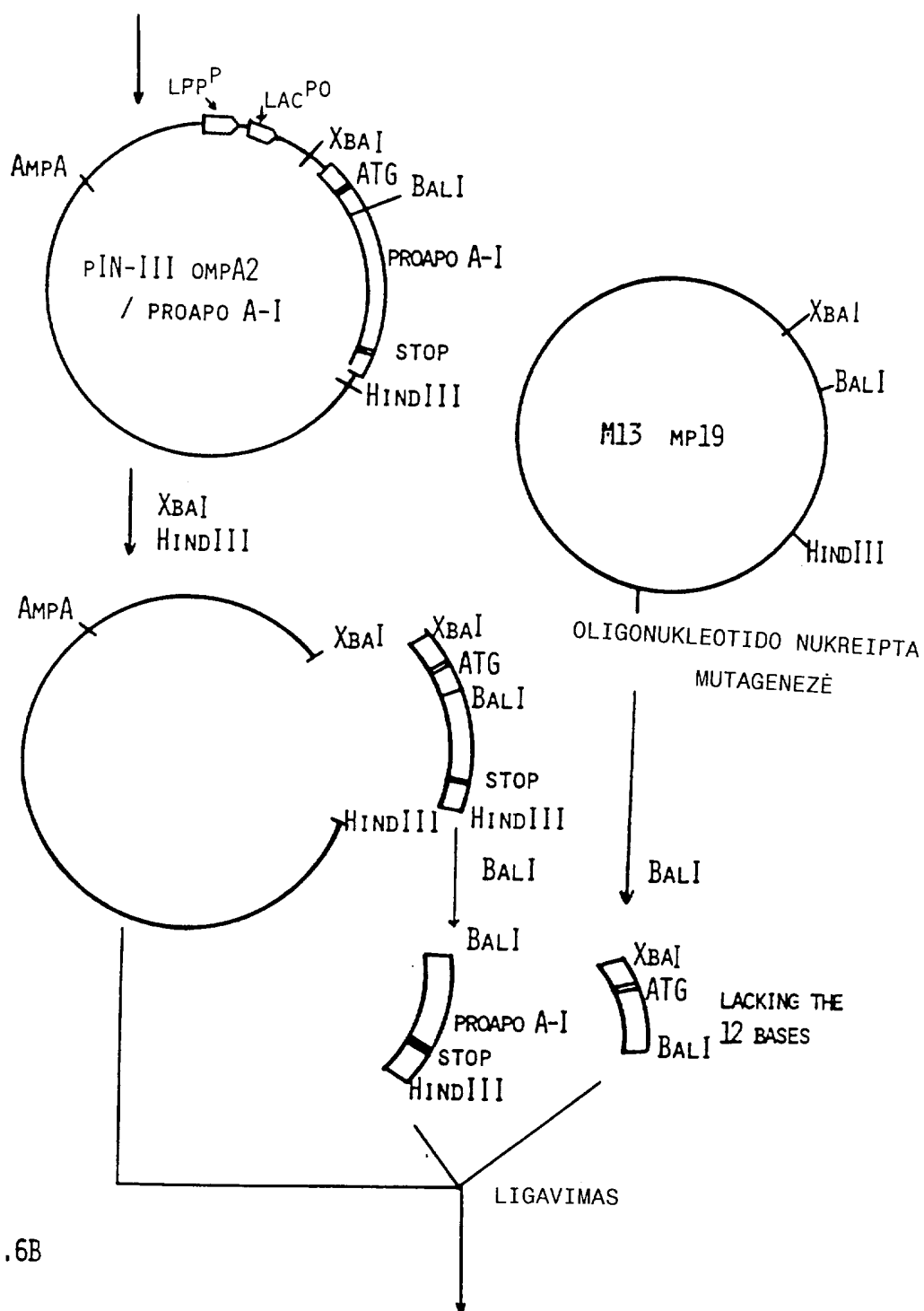


FIG.6B

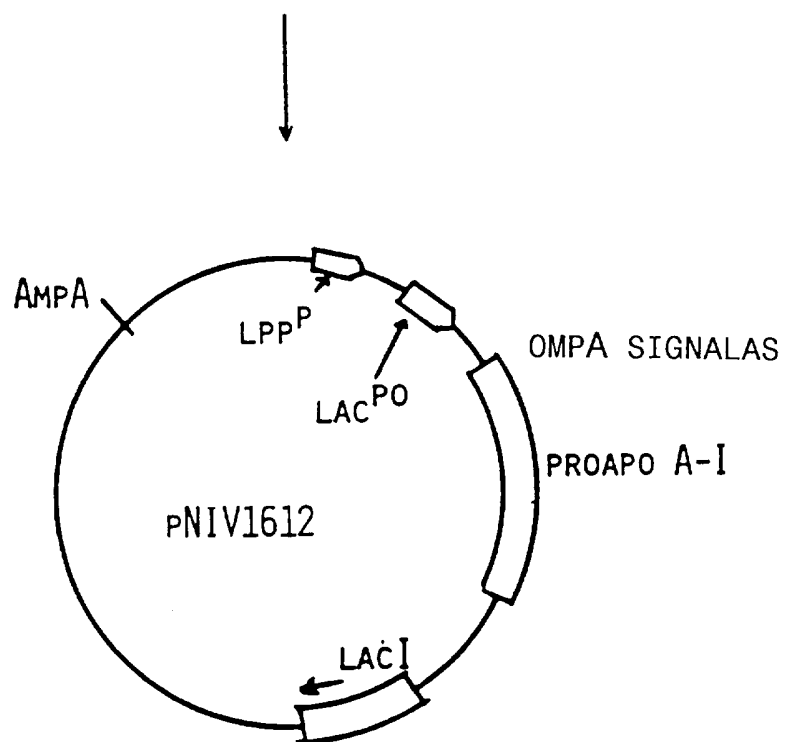


FIG.6C

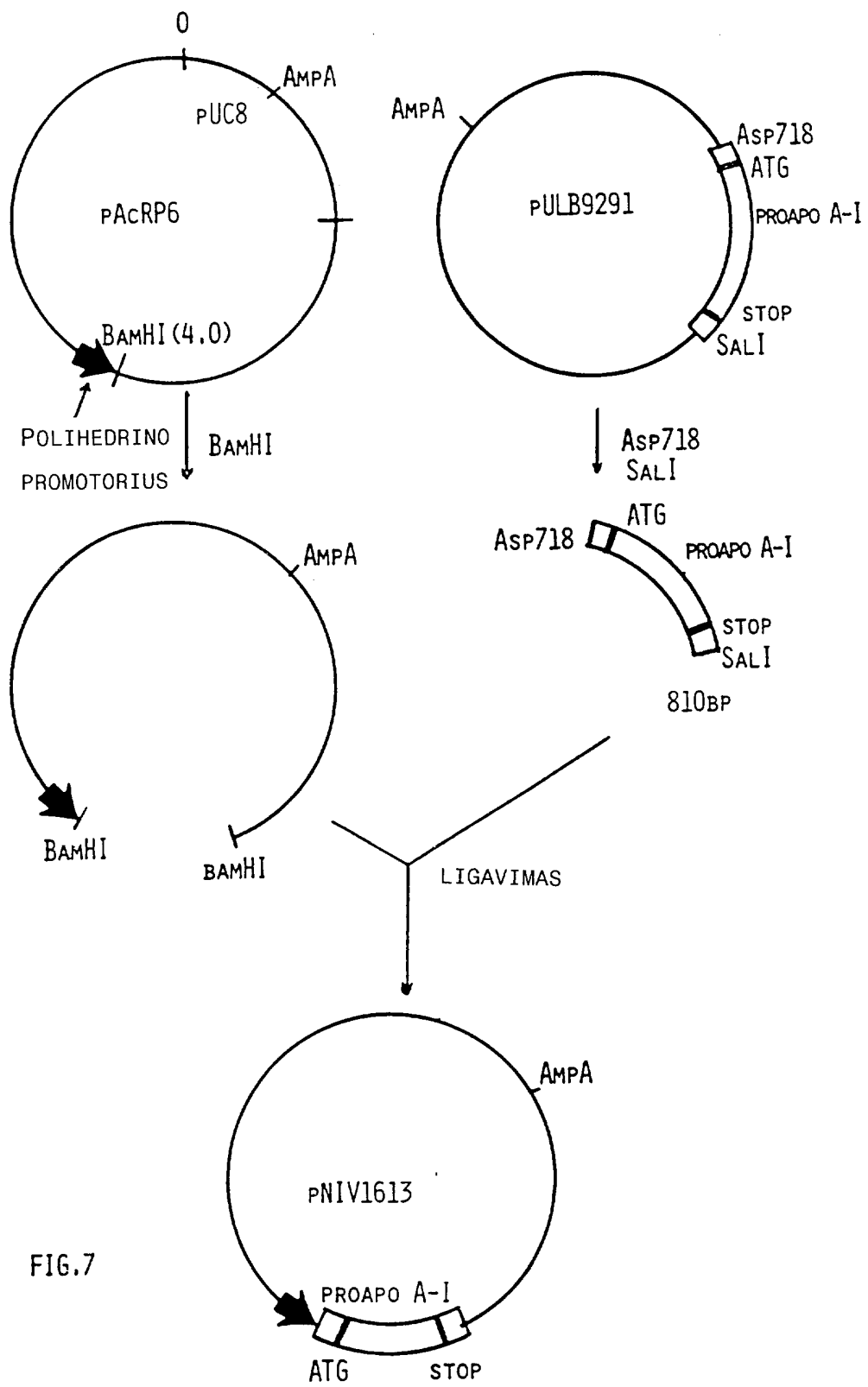


FIG.7