

(19)



(10) **LT IP1753 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

- (21) Paraiškos numeris: **IP1753**
- (22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 31**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 07 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: **36 00 571.1, 1986 01 10, DE**
4028980, 1987 01 09, SU
- (71) Pareiškėjas:
Gruenenthal GmbH, Zieglerstrasse 6, D-52078 Aachen, DE
- (72) Išradėjas:
Regina HEINZEL-WIELAND, DE
Heribert APPELHANS, DE
Hans Guenther GASSEN, DE
Werner MACHLEIDT, DE
Ursula SEEMUELLER, DE
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Liudmila GERASIMOVICH, IĮ „Liudmila Gerasimovič, Patentinis patikėtinis“,
Vingrių g. 13-42, LT-01141 Vilnius, LT
- (51) Int. Cl. (2006): **C12N 15/09**
A61K 38/00
A61K 38/55
A61P 7/00
A61P 9/00
A61P 11/00
A61P 29/00
C07K 14/00
C07K 14/81
C12N 1/16
C12N 1/20
C12N 1/21
C12N 5/00
C12N 5/10
C12N 9/99
C12N 15/00
C12P 21/02

(54) Pavadinimas:

DNR sekos, koduojančios baltymus, biotechnologiniai šių baltymų gamybos būdai, ir farmacinės kompozicijos, turinčios šiuos baltymus

(57) Referatas:

—

5

10 DNR sekos, koduojančios baltymus, biotechnologiniai šių baltymų gamybos būdai ir farmacinės kompozicijos, turinčios šiuos baltymus.

15 Išradime aprašoma žinduolių genomo, ypač žmogaus genomo DNR sekos, koduojančios baltymus, pasižyminčius HUSI I tipo inhibitorių biologiniu aktyvumu, klonavimo ir ekspresijos vektoriai, kurių sudėtyje yra tokios DNR sekos, bei rekombinantinės DNR technologijos panaudojimas.

20

Išradime taip pat aprašomi šeimininkų organizmai, transformuoti minėtais vektoriais, bei būdai, skirti baltymų, turinčių HUSI I tipo inhibitorių biologinį aktyvumą, gamybai, panaudojant minėtus transformuotus

25 šeimininkų organizmus.

Taip pat išradime aprašomi baltymai, pasižymintys HUSI I tipo inhibitorių biologiniu aktyvumu, bei farmacinės kompozicijos, turinčios tokius baltymus.

30

Gyvoose ląstelėse ir organizmuose fermentų aktyvumą visų pirma reguliuoja jų sintezė de novo ir jų cheminė modifikacija.

Kai ląstelei ar organizmui reikia greitai prisitaikyti
35 prie pakitusių aplinkos sąlygų ir kartu reikalingas didesnis specifinio fermento aktyvumas, tai nereiškia, kad

visuomet iš naujo sintetinamas didesnis fermento kiekis. Dažnai panaudojama jau esanti fermento atsarga. Pavyzdžiui, virškinantys fermentai (proteinizės) pervedami iš jų saugojimo formos, vadinamos zimogenais, į aktyvią 5 proteinazę. Panašiai kraujo krešėjimo faktoriai, esant reikalui, pervedami iš neaktyvios saugojimo formos į biologiškai aktyvią formą. Žinomi tokie fermentų, esančių saugojimo formoje, aktyvacijos mechanizmai kaip skaldymas specifinėmis 10 peptidazėmis, fosforilinimas proteinkinazėmis, atpalaidavimas iš vezikulų ir baltymo konfigūracijos pakeitimas veikiant juos alosteriniais ligandais. Kontroliuojama degradacija arba šių fermentų specifinė inhibicija leidžia išvengti minėtų aktyvacijos reakcijų 15 pertekliaus ir aktyvuotų fermentų ilgalaikių efektų. Pavyzdžiui, aktyvuotų proteinazių biologinį aktyvumą paprastai blokuoja specifiniai proteinazių inhibitoriai.

Pastaraisiais metais buvo pripažinta įvairių proteinazių 20 inhibitorių klinikinė ir patogenetinė reikšmė (1, 2). Buvo pastebėta, kad lizosominiai proteinazių inhibitoriai tinka sepsio, reumatinio tipo chroniškų ligų bei viršutinių kvėpavimo takų susirgimams gydyti. Tačiau dabartiniu metu nėra tokių proteinazių inhibitorių, kurie galėtų būti 25 taikomi šių ligų gydymui. Šiuo metu tik proteinazių inhibitorius aprotininas yra naudojamas gydymui. Aprotininas naudojamas pooperacinių hemoragijų gydymui, kurias sukelia hiperfibrinolizė ir ankstyvasis šoko gydymas. Šių aukščiau minėtų susirgimų gydymui gali tikti 30 HUSI (Human Seminal Plasma Inhibitor) I tipo inhibitoriai. Šios medžiagos yra baltymai. HUSI I tipo inhibitorių pavyzdžiai yra HUSI-I, CUSI-I (Cervix-Uterus-Secretion Inhibitor) ir BSI (Bronchial-Secretion Inhibitor).

35 HUSI-I yra rūgščiai atsparus proteinazių inhibitorius iš žmogaus sėklos plazmos, kuris inhibuoja proteinazes iš granulocitų lizosominių granulių (pavyzdžiui, elastazę).

HUSI-I mažai aktyvi kitų vidulastelinių arba nelastelinių proteinazių atžvilgiu. Jos molekulinis svoris yra apie 11000. HUSI-I dalinė amino rūgščių seka yra Fritz (48) publikacijoje.

5

Be HUSI-I žmogaus sėklos plazmoje yra ir kitas rūgščiai atsparus proteinazių inhibitorius - HUSI-II (3). Jo molekulinis svoris yra apie 6500. HUSI-I ir HUSI-II inhibicinės savybės visiškai skirtingos. HUSI-II

10

inhibicinis aktyvumas apsiriboja tripsinu ir akrozinu, o HUSI-I išskirtinė savybė yra specifinė proteazių iš granulocitų lizosominių granulių, pavyzdžiui, elastazės, dezaktyvacija. Dėl skirtingo biologinio aktyvumo HUSI-II nėra HUSI-I tipo inhibitorius.

15

Rūgščiai atsparus inhibitorius CUSI-I buvo išskirtas iš gimdos kaklelio sekreto (4). CUSI-I molekulinis svoris yra beveik toks pat, kaip ir HUSI-I molekulinis svoris.

Be to, HUSI-I ir CUSI-I inhibicijos spektras toks pat.

20

Ouchterlony imunodifuzijos teste HUSI-I ir CUSI-I kryžmiškai reaguoja su antiHUSI-I antikūniais (5, 6).

Pagaliau amino rūgščių analizės duomenys, nors šiuo metu žinomi tik fragmentiškai, beveik sutampa (47).

Bronchų sekrecijos inhibitorius (BSI) buvo išskirtas iš

25

bronchų sekreto (41, 44, 45, 46). Pirmų 25 BSI amino rūgščių seka buvo nepilnai publikuota (41). BSI

molekulinis svoris yra maždaug 10000. Imunologiniuose

testuose BSI kryžmiškai reaguoja su triušio anti-HUSI-I antikūniais (47). BSI yra atsparus rūgštims ir inhibuoja

30

tokias proteinazes: leukocitų elastazę, katepsiną G, tripsiną ir chimotripsiną.

Nors HUSI-I tipo inhibitorių biologinis aktyvumas iš esmės jau žinomas, šie inhibitoriai nebuvo haudojami gydymui,

35

nes buvo neprieinami pakankami ir išgryninti jų kiekiai.

Šio išradimo esmė yra pateikti baltymų, pasižyminčių HUSI-I tipo inhibitorių biologiniu aktyvumu, koduojančias DNR sekas ir, naudojantis tomis sekomis, biotechnologiniais metodais, pagaminti baltymus, pasižyminčius HUSI-I tipo inhibitorių biologiniu aktyvumu.

Ši problema sprendžiama pateikiant DNR sekas iš žinduolių genomo, ypač iš žmogaus genomo, kurios hibridizuojasi, ypač esant griežtoms sąlygoms, į DNR sekas, pateiktas Pav. 4 ir/arba 5, ir kurios koduoja baltymus, pasižyminčius HUSI-I tipo inhibitorių biologiniu aktyvumu.

Šiame išradime išsireiškimas "baltymai, pasižymintys HUSI-I tipo inhibitorių biologiniu aktyvumu" reiškia sulietus arba nesulietus baltymus, pasižyminčius HUSI-I, CUSI-I arba BSI inhibitorių biologiniu aktyvumu, pavyzdžiui, tai gali būti natyvinių baltymų imunologinės savybės ir /arba specifinės natyvinių baltymų inhibitorinės savybės. Šio išradimo baltymų, pasižyminčių HUSI-I tipo inhibitorių biologiniu aktyvumu, inhibitorinis aktyvumas nustatomas matuojant chimotripsino inhibavimą. Dėl termino "griežtos hibridizacijos sąlygos" ir "įprastinės hibridizacijos sąlygos" žr. (28), psl. 387-389 ir Bonner et al. (28). Paprastai T_m reikšmės yra nuo -15 iki -30, labiau tinka T_m nuo -20 iki -27. Sulieti ir nesulieti baltymai, kurių sudėtyje yra tik dalis HUSI-I, CUSI-I ir BSI amino rūgščių sekų, šiame išradime vadinami baltymais, pasižyminčiais HUSI-I tipo inhibitorių biologiniu aktyvumu. Atskiri baltymo amino rūgščių sekos regionai dar vadinami "domenais".

Šio išradimo labiau tinkamame pavyzdyje DNR sekos koduoja baltymus, pasižyminčius CUSI-I baltymo aktyvumu. Kitame šio išradimo tinkamame pavyzdyje DNR seka koduoja baltymą, kurio amino rūgščių seka parodyta Pav. 5.



Ypač tinkami šio išradimo pavyzdžiai yra DNR sekos, pateiktos Pav. 4 ir 5, esančios plazmidžių pRH31 ir pRH34 sudėtyje kaip PstI fragmentai. Plazmidės pRH31 ir pRH34 yra deponuotos Vokietijos mikroorganizmų kolekcijoje -
5 Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (DSM), atitinkamų depozitų numeriai - DSM 3634 ir DSM 3635. Plazmidės pRH31 ir pRH34, jų fragmentai ir atitinkami sintetiniai oligonukleotidai tinka kaip mėginiai identifikavimui ir išskyrimui kitų DNR sekų, kurios koduoja baltymus,
10 turinčius HUSI-I tipo inhibitorių biologinį aktyvumą, pavyzdžiui, HUSI-I ir BSI. Tokią išvadą specialistui padaryti nesunku, nes inhibitorių HUSI-I ir BSI pirminės struktūros, nors šiuo metu ir nevysiškai ištyrinėtos, yra labai panašios. Homologija galima ir DNR lygyje. Dėl
15 tokios didelės sekų homologijos negalima atmesti prielaidos, kad visus tris inhibitorius koduoja vienas genas ir kad individualūs inhibitoriai yra audinių specifinės ekspresijos produktai. Šio išradimo tikslams tinka taip pat DNR sekos, kurios hibridizuojasi (geriau -
20 esant griežtoms sąlygoms) su viena iš aukščiau nurodytų DNR sekų. Minėtos DNR sekos yra natūralios, pusiausintetinės arba sintetinės, jos gaunamos iš aukščiau minėtų DNR sekų, panaudojant mutacijas, nukleotidų pakeitimus, nukleotidų delecijas, nukleotidų įterpimą arba
25 nukleotidų regiono inversiją, jos koduoja baltymus, pasižyminčius HUSI-I tipo inhibitorių biologiniu aktyvumu.

Išradimas taip pat apima vektorius, skirtus aukščiau minėtų DNR sekų klonavimui ir ekspresijai. Šiame išradime
30 terminas "vektorius" reiškia plazmidės, pavyzdžiui, pBR322, pUC18, pUR290, pWH701 ir pSP6, viruso genomus, jų fragmentus ar darinius, pavyzdžiui, λ fago arba fago M13 genomą. Šio išradimo ekspresijos vektoriuose pateikta išradimui DNR seka operatyviai prijungta prie ekspresijos
35 kontrolės sekos. Tinkamame pavyzdyje ekspresijos vektorius 5' geno gale turi DNR fragmentą su tokia seka:

5' A A T T C G G A G G T G T C G A C T A T G A A G T C C A
G C G G 3'
G C C T C C A C A G C T G A T A C T T C A G G T
C G C C

5 Kaip ekspresijos kontrolės sekos (promotorinės sekos)
šiam išradime gali būti panaudotas E.coli lac
promotorius, E. coli trp promotorius, E. coli lipoproteino
promotorius, šarminės fosfatazės promotorius, λ -P_L
10 promotorius, λ -P_R promotorius, mielių ekspresijos
kontrolės seka arba kitos eukariotinės ekspresijos
kontrolės sekos.
Ypač tinkamos šio išradimo plazmidės yra pRH31 (DSM 3634)
ir pRH34 (DSM 3635). Kitos ypač tinkamos plazmidės yra
15 pRH24, pRH21 ir pBA17, kurios gali būti sukonstruotos su
plazmidėmis pRH31, pRH34 ir pRH1810 (DSM 3905).

Kitas šio išradimo objektas yra šeimininkų organizmai,
kurie buvo transformuoti aukščiau minėtais vektoriais.
20 Labiau tinkami šeimininkų organizmai yra E.coli, Bacillus
subtilis ar kitų bakterijų genčių kamienai, Saccharomyces
cerevisiae, kiti mikroskopiniai mažieji grybai, gyvūnų ir
žmogaus ląstelės.

25 Šio išradimo objektas yra taip pat baltymai, pasižymintys
HUSI-I tipo inhibitorių biologiniu aktyvumu. Šio išradimo
baltymai dažniau pasižymi CUSI-I baltymo biologiniu
aktyvumu. Ypač tinkamas pavyzdys, kai baltymas,
pasižymintis CUSI-I baltymo biologiniu aktyvumu, turi
30 amino rūgščių seką, parodytą Pav. 5.

Kitame ypač tinkamame pavyzdyje baltymas, pasižymintis
CUSI-I baltymo biologiniu aktyvumu, turi tokią amino
rūgščių seką:

35 Pro-Val-Asp-Thr-Pro-Asn-Pro-Thr-Arg¹-Arg-Lys-Pro-Gly-Lys-
Cys-Pro-Val-Thr- Tyr-Gly-Gln-Cys-Leu-Met-Leu-Asn-Pro-Pro-

104

Asn-Phe-Cys-Glu-Met-Asp-Gly-Gln- Cys-Lys-Arg-Asp-Leu-Lys-
Cys-Cys-Met-Gly-Met-Cys-Gly-Lys-Ser-Cys-Val-Ser-Pro-Val-
Lys-Ala-OH.

- 5 Kitame ypač tinkamame pavyzdyje baltymas, pasižymintis CUSI-I baltymo biologiniu aktyvumu, turi tokią amino rūgščių seką:

10 Asp-Pro-Val-Asp-Thr-Pro-Asn-Pro-Thr-Arg-Arg-LysPro-Gly-
Lys-Cys-Pro-Val- Thr-Tyr-Gly-Gln-Cys-Leu-Met-Leu-Asn-Pro-
Pro-Asn-Phe-Cys-Glu-Met-Asp- Gly-Gln-Cys-Lys-Arg-Asp-Leu-
Lys-Cys-Cys-Met-Gly-Met-Cys-GlyLys-Ser-Cys-Val-Ser-Pro-
Val-Lys-Ala-OH.

- 15 Šio išradimo baltymai paprastai yra išgryninti baltymai.

Išradime aprašomas procesas aukščiau minėtų baltymų gaminimui, į kurio sudėtį įeina vieno iš aukščiau minėtų transformuotų šeimininko organizmo auginimas standartinėje maitinimo terpėje; geno produkto ekspresija, kuri gali būti indukuojama arba neindukuojama, ekspresijos produkto išskyrimas iš kultūrinės terpės, pavyzdžiui, iš kultivuojamų ląstelių ir\arba iš maitinamosios terpės, galimas tolesnis ekspresijos produkto apdorojimas apibrėžtomis rūgštinės hidrolizės sąlygomis siekiant įvykdyti dalinę hidrolizę ir atskirti reikiamą biologiškai aktyvaus baltymo fragmentą nuo hidrolizato, naudojantis gel-chromatografijos metodais. Priklausomai nuo tolesnio jų panaudojimo tokiu būdu gauti baltymai gali būti toliau gryninami, ypač chromatografiniais metodais, pavyzdžiui, afinine chromatografija arba didelio efektyvumo skystine chromatografija, arba derinant šiuos metodus.

- 35 Baltymai ir baltymų fragmentai, pagaminti pagal šį išradimą yra ypač tinkami lėtinio bronchito, lėtinių gimdos kaklelio uždegimų gydymui, taip pat gydymui kitų lėtinių uždegiminių procesų, susijusių su pernelyg didele

gleivių sekrecija ir dėl to kylančių ūmių pavojingų
situacijų. Taip pat šie baltymai tinka ankstyvajam šoko
gydymui ir, pavyzdžiui, pooperacinių hemoragijų, kilusių
dėl hiperfibrinolizės, gydymui. Farmacinės kompozicijos, i
5 kurių sudėty įeina efektyvus kiekis baltymo, pasižyminčio
HUSI-I tipo inhibitoriaus biologiniu aktyvumu,
standartiniai nešėjai ir/arba skiedikliai ir /arba
adjuvantai taip pat yra šio išradimo dalis. Gydymui
naudojamas baltymas, pasižymintis HUSI-I tipo inhibitorių
10 biologiniu aktyvumu, gali būti skiriamas kaip sterilus
izotoninis tirpalas injekcijoms į raumenis, į veną arba po
oda uždegimo vietoje arba kaip infuzinis tirpalas. Šio
išradimo atveju labiau tinka purškiamos arba inhaliacinės
farmacinės kompozicijos. Jos ypač tinka kvėpavimo takų
15 susirgimų gydymui tiesiogiai veikiant veikliaisiais
komponentais ligos pažeistas bronchų ar plaučių vietas.

Šeimininko organizmo, galinčio sintetinti svetimą baltymą,
konstravimas, apima keletą eksperimentinių stadijų. Visu
20 pirma identifikuojamas ir išskiriamas genas, kuriame yra
informacija, reikalinga pageidaujamo baltymo biosintezai.
Yra žinomi įvairūs genų identifikavimo ir išskyrimo būdai.
Pavyzdžiui, išskiriant DNR seką, koduojančią baltymą,
pasižymintį CUSI-I baltymo biologiniu aktyvumu, iš
25 pradžių, remiantis HUSI-I baltymo daline amino rūgščių
seka, ruošiami du sintetinių oligonukleotidų mišiniai. Šie
oligonukleotidai yra komplementarūs DNR sekai,
koduojančiai 6 amino rūgštis ir gali būti naudojami kaip
geno mėginiai (Pav. 1, RHI ir RH2). Remiantis nepilnais
30 duomenimis apie CUSI-I, HUSI-I (48) ir BSI (41) pirminę
struktūrą, nebuvo įmanoma susintetinti tinkamus
oligonukleotidų mišinius. Žinomi duomenys apie amino
rūgščių seką buvo gauti analizuojant chemiškai
nevienalyčius triptinių fragmentų mišinius, fragmentus,
35 gautus skaldant bromcianu, arba NH_2 galus (48). Taip gauta
dalinė seka daugiau kaip 30% skiriaši nuo CUSI-I baltymo
aminorūgščių sekos, nustatytos šiame išradime. Gerai

žinoma, kad jau dėl vienos sekoje neteisingai nustatytos amino rūgšties oligonukleotidinis zondas, gautas pagal šią seką, gali būti neaktyvus. Pavyzdžiui, šaltinyje (48) teigiama, kad amino rūgščių seka RH2 regione yra Cys-Ser-
5 Met-Gly-Met-Cys, tačiau šiame išradime nustatyta seka yra Cys-Cys-Met-Gly-Met-Cys (žr. Pav. 4.).

Pagal šį išradimą kDNR bibliotekose atliekama paieška, naudojant aukščiau minėtus sintetinių oligonukleotidų
10 mišinius. Šios kDNR bibliotekos buvo paruoštos naudojant mRNR iš žmogaus gimdos kaklelio audinių kaip pradinę medžiagą. Pradinę medžiagą kDNR bibliotekos paruošimui pagal šį išradimą gali būti panaudota mRNR iš žmogaus plaučių viršutinių kvėpavimo takų audinių (autopsijos
15 medžiaga, paimta praėjus 10 valandų po mirties) (7). mRNR, išskirta iš donoro audinių, yra naudojama įprastiniu būdu komplementarios DNR (kDNR)-molekulės sintezei, kuri po to įterpiama į plazmidės pBR322 PstI saitą. Naudojant taip paruoštas kDNR molekules transformuojami šeimininkų
20 organizmai, pavyzdžiui, E. coli K12 DH1 ir standartiniu būdu išsėjami agarą lėkštelėse su tetraciklinu. Transformuotų šeimininkų bakterijų, turinčių plazmidę su kDNR seka, koduojančia baltymą su CUSI-I baltymo biologiniu aktyvumu, kolonijos identifikuojamos
25 hibridizuojant, t.y. vadinamasis kolonijų hibridizavimas. Šiam eksperimentui ruošama replika nuo nitroceliuliozinio filtro iš ant agarą lėkštelių augančių bakterijų kolonijų, žr. Thayer (8). Nitroceliuliozinių filtrų replikos hibridizuojamos su dviem aukščiau minėtais
30 oligonukleotidų mišiniais pagal Wallace (9). Rekombinantinę kDNR turinti plazmidė išskiriama iš teigiamų kolonijų. Nustatomas kDNR intarpo plazmidėje dydis ir plazmidė su atitinkamo dydžio intarpu detaliai apibūdinama, analizuojant kDNR intarpą DNR seką. Taip
35 išskiriama rekombinantinė plazmidė pRH31. Ji deponuota Vokietijos mikroorganizmų kolekcijoje, depozito nr. DSM 3634. Toliau vykdant paiešką kDNR bibliotekoje, paruoštoje

iš gimdos kaklelio audinio pavyzdžių mRNR su oligonukleotidu iš plazmidė pRH31 DNR sekos, veikiančio kaip hibridizavimo zondas, išskiriama rekombinantinė plazmidė pRH34 (žr. Pav. 4, RH5). Nustačius rekombinantinės plazmidės pRH34 intarpo DNR seką pasirodė, kad ši plazmidė apima visą regioną, koduojantį CUSI-I baltymą. Rekombinantinė plazmidė pRH34, deponuota Vokietijos mikroorganizmų kolekcijoje, depozito nr. DSM 3635. Naudojantis kDNR sekomis, esančiomis plazmidėse pRH31 ir pRH34, konstruojami ekspresijos vektoriai. Pirma rekombinantinė plazmidė pRH24 yra gaminama iš tarpinės rekombinantinės plazmidės pRH1810. Į rekombinantinės ekspresijos plazmidės pRH24 sudėtį įeina plazmidės pRH34 regionas, koduojantis baltymą, pasižymintį CUSI-I baltymo biologiniu aktyvumu, taip pat susintetintas DNR fragmentas, apimantis ir Shine-Dalgarno seką ir transliacijos pradžią. Ekspresijos produktas, gautas naudojantis rekombinantiniu ekspresijos vektoriumi pRH24 apima visas amino rūgštis, parodytas Pav. 5.

Po to konstruojama rekombinantinė ekspresijos plazmidė pRH21. Tam SauIIIA fragmentas išpjaunamas iš plazmidės pRH31 ir įterpiamas į plazmidės pUR290 BamHI restrikcijos saitą. Ekspresijos produktas, gautas iš taip sukonstruotos rekombinantinės ekspresijos plazmidės pRH21 yra sulietas baltymas, kurio N galas turi β -galaktozidazės amino rūgščių seką, o 59 C galo amino rūgštys atitinka paskutines 59 CUSI-I baltymo amino rūgštis (žr. Pav. 5). Polipeptidas, turintis 58 amino rūgštis, atskeliamas nuo ekspresijos produkto standartiniu jungties Asp-Pro rūgštinės hidrolizės būdu (pavyzdžiui, veikiant 20-40 valandų 10-70% -ine acto arba skruzdžių rūgštimi, esant temperatūrai nuo 10 iki 30°C, labiau tinka kambario temperatūra). Po to produktas gryninamas gelio chromatografijos metodu. Šis polipeptidas, turintis 58 amino rūgštis, atitinka seką C galiūno domeno, esančio

baltyme, kuris aprašytas Pav. 5, ir pasižymi baltymo CUSI-I biologiniu aktyvumu.

Po to konstruojama kita rekombinantinė ekspresijos
5 plazmidė - pBA17. Tam BamHI/HinfI fragmentas išpjauamas iš plazmidės pRH1810 ir liguojamas, papildžius galus, į ekspresijos plazmidę pSP6. Ekspresijos plazmidė ruošiama ligavimui skaldant ją HindIII ir po to veikiant nukleaze iš Mung'o pupų bei šarmine fosfataze. Ekspresijos
10 produktas, gautas iš taip sukonstruotos rekombinantinės ekspresijos plazmidės pBA17 susideda iš 59 amino rūgščių. Jo seka atitinka 59 C galo amino rūgščių seką, parodytą Pav. 5. Ekspresijos produktas pasižymi baltymo CUSI-I biologiniu aktyvumu.

15 Aukščiau minėtų produktų ekspresija iš atitinkamai transformuotų šeimininkų organizmų patvirtinta imunoprecipitacijos (10) arba Western bloto analizės (11, 12) duomenimis. Ekspresijos produktų biologinis aktyvumas
20 nustatytas inhibuojant proteinazę chimotripsiną.

Paveiksluose pateikta:

Pav. 1: Natūralaus CUSI-I baltymo fragmentų, gautų
25 skaldant baltymą tripsinu ir išgrynintų HPLC metodais, amino rūgščių seka. Sekos regionai, pagal kuriuos buvo ruošiami du oligonukleotidų mišiniai, vadinami RH1 ir RH2. Tekste jie yra pabraukti.

30 Pav. 2: Plazmidės pRH31 restrikcijos žemėlapis. Rekombinantinė plazmidė pRH31 yra parodyta su restrikcijos saitais, kur P = PstI, E = EcoRI, B = BamHI, H = HindIII. Juodas stulpelis rodo kDNR intarpą, rodyklėmis apskritime pažymėtas atsparumo tetraciklinui genas (tet^r) ir
35 pertrauktas atsparumo ampicilinui genas (amp^s).

Pav. 3: kDNR intarpo plazmidėje pRH31 sekvenavimo strategija

- Juodas stulpelis rodo 500 bazių porų (bp) PstI fragmentą iš plazmidės pRH31, juodos rodyklės kiekvienu atveju atitinka sekvenavimo reakciją. Baltos, kontūrinės rodyklės žymi kDNR intarpo regioną, koduojantį CUSI-I.

Pav. 4: Plazmidės pRH31 CUSI-I kDNR fragmento nukleotidų seka.

- 10 Parodyta dvigrandė DNR seka. CUSI-I atviras skaitymo rėmelis prasideda tuoj pat po kDNR intarpo 5' (G : C) homopolimerinio galo. Skaitymo rėmelis koduoja 90 amino rūgščių, kurios žymimos trijų raidžių kodu. Be to, parodytos 178 bazių poros, esančios už stop-kodono TGA.

15

Pav. 5: Plazmidės pRH34 CUSI-I kDNR fragmento nukleotidų seka.

- Parodyta dvigrandė DNR seka. Amino rūgštys pagal DNR seką pateiktos trijų raidžių kodu. Nukleotidai nuo 59 iki 133 koduoja CUSI-I baltymo signalinį peptidą.

20

Pav. 6. Plazmidės pRH1807, kurios sudėtyje yra plazmidės pRH34 CUSI-I kDNR fragmentas, intarpo PstI sekvenavimo strategija.

- 25 Kiekviena rodyklė žymi sekvenavimo eksperimentą.
H = HindIII, P = PstI, B = BamHI.

Pav. 7: Ekspresijos vektoriaus pRH24, turinčio reguliuojamo promotoriaus λ -P_L 3' gale CUSI-I geną.

30

- | | |
|---------------------------------|---|
| amp ^r : | atsparumo ampicilinui genas |
| N-CUSI-I: | DNR fragmentas, koduojantis CUSI-I N galą |
| C-CUSI-I: | DNR fragmentas, koduojantis CUSI-I C galą |
| O _L P _L : | bakteriofago λ kairysis operatoriaus ir |
| 35 promotoriaus regionas | |
| SD: | Ribosomų prisijungimo saito Shine-Dalgarno seka |

Restrikcijos endonukleazių sutrumpinimai:

B = BamHI, E = EcoRI, H = HindIII, Hae = HaeIII, P = PstI,
Sph = SphI.

5

Pav. 8. Plazmidės pRH34 restrikcijos žemėlapis

Parodyta rekombinantinė plazmidė pRH34 su restrikcijos
saitais restriktazėms B = BamHI, E = EcoRI, H = HindIII,
Hae = HaeIII, P = PstI. Juodas stulpelis žymi kDNR intarpo
10 vieta, rodyklės apskritime žymi atsparumo tetraciklinui
geną (tet^r) ir suardyta atsparumo ampicilinui geną (amp^s).

Pav. 9. Amino rūgščių sekos analizė iškelia įdomų aspektą:
nekreipiant dėmesio į du poslinkius sekoje, visos

15 molekulėje esančios cisteino liekanos sutampa, kai
baltymas padalinamas į dvi dalis ir jos rašomos viena virš
kitos (amino rūgštys 1-54 ir 55-107). Be to, pastebėta,
kad greta esančios amino rūgštys dažnai yra konservatyvios
cisteino liekanų atžvilgiu. Yra du skirtingi šio
20 pastebėjimo aiškinimai:

1. CUSI baltymo sudėtyje gali būti du beveik identiškai
sulankstyti segmentai, pasižymintys inhibitoriniu
aktyvumu, pavyzdžiui, vienas inhibuoja tripsiną, o kitas -
leukocitarinę elastazę arba chimotripsiną.

25 2. Baltymas susiformavo genetinio kodo lygyje iš jau
esančio domeno, po to abu domenai vystėsi nepriklausomai
vienas nuo kito.

Pav. 10. Klonavimo strategija dalinių CUSI-I sekų kaip su

30 β -galaktozidaze sulieto baltymo ekspresijai. Juodas
stulpelis žymi dalinės CUSI-I sekas, kontūrinis stulpelis
- β -galaktozidazės geną ($lacZ$), rodyklės apskritime žymi
atsparumo tetraciklinui geną (tet^r) ir atsparumo
ampicilinui geną (amp^r).

35 P = PstI, S = Sau3A, E = EcoRI, H = HindIII, B = BamHI, p
= lac promotorius, = lac operatorius.

Pav. 11: Ekspresijos vektoriaus pBA17, skirto C galinio CUSI-I domeno (= CUSI-I II-as domenas) ekspresijai, konstravimo schema.

Amp^r = atsparumo ampicilinui genas

5 P_{tac} = tac promotorius

Tet+s= = neaktyvus atsparumo tetraciklinui liekamasis genas

rrnBT₁T₂ = ribosominės RNR geno transkripcijos pabaigos genas

10

Žemiau naudojami sutrumpinimai turi tokias reikšmes:

A₅₇₈ absorbcija prie 578 nm

DTT ditioneitolis

15 Bis N,N,N',N'-metilenbisakrilamidas

bp bazių poros

D daltonai

DE (DEAE) dietilaminoetilas

dg kDNR dvigrandė kDNR

20 dNTP deoksinukleozid-5'-trifosfatas

EDTA etilendiamintetraacto rūgštis

IgG imunoglobulinas

IPTG izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas

32P fosforo izotopas, kurio santykinė masė lygi 32

25 RPM apsisukimai per minutę

35S sieros izotopas, kurio santykinė masė lygi 35
vg kDNRviengrandė kDNR

TPEG p-aminofenil-1-tio-β-D-galaktopiranozidas

Tris trishidroksimetilaminometanas

30 V fermentinio aktyvumo vienetas

sarkozil-laurilsarkozinas

α-(³²P)-dCTP deoksicitidil-5'- trifosfatas su
izotopu ³²P α-fosfato liekanoje

LB terpė 10 g/l fermentiškai suskaldyto kazeino (Sigma),

35 5 g/l mielių ekstrakto (Sigma), 8 g/l NaCl, pH 7.5

Pavyzdžiuose vartojami žemiau aprašyti metodai ir minėtos medžiagos. Medžiagos ir metodai taip pat aprašyti T. Maniatis et al. (28).

5 1. Fermentai

Restrikcijos endonukleazės (Bethesda Research Laboratory) (BRL) ir T4-DNR ligazė (Boehringer Mannheim), T4-
polinukleotidkinazė (Boehringer Mannheim), ir Mung'o pupų
10 nukleazė (Pharmacia) naudotos komercinės pagal gamintojo nurodymus. Terminalinės deoksinukleotidiltransferazės (BRL) vartojimo būdas pateiktas sekcijoje 7. E. coli DNR polimerazė (BRL), ribonukleazė H (BRL) bei AMV atvirkštinė transkriptazė (Life Science) naudojamos pagal (13). E.
15 coli DNR polimerazė I (Klenow fragmentas) (Boehringer Mannheim) naudojama kaip aprašyta (14).

2. Mikroorganizmai

20 Baltymų, pasižyminčių CUSI-I biologiniu aktyvumu, ekspresijai galima naudoti ir gram-neigiamus, ir gram-teigiamus kamienus, pavyzdžiui, E. coli ir Bacillus subtilis kamienus.
Taip pat gali būti naudojamos standartinės eukariotų
25 ekspresijos sistemos, pavyzdžiui, Saccharomyces cerevisiae arba žinduolių ląstelės, turinčios tinkamus vektorius su struktūriniu genu, koduojančiu baltymą, pasižymintį CUSI-I biologiniu aktyvumu. Pagal šį išradimą E. coli kamienas K12 MC 1061λ15 (deponuotas DSM, depozito nr. DSM 3631) yra
30 naudojamas tiesioginei pilno natūralaus CUSI-I baltymo ekspresijai. Jo genotipas gali būti apibrėžtas taip: araD139, Δ(ara, leu) 7697, ΔlacX74, galU⁻, galk⁻, hsr⁻, hsm⁺, strA. Pagal šį išradimą E. coli kamienas K12 JM 101 (deponuotas American Type Culture Collection (ATCC),
35 depozito nr. 33876) yra naudojamas sulieto baltymo iš β-galaktozidazės ir CUSI-I baltymo C galinio domeno ekspresijai. Jo genotipą galima taip apibrėžti: Δ (lac

1B

- pro), thi, strA, supE, endA, sbcB, hsdR⁻, F'tra, D36, pro AB, lacI^q, ZΔ M15. Rekombinantinių plazmidžių išskyrimui, kurios buvo gautos įterpus sintetinę kDNR (žr. taip pat pavyzdį 1c), naudojamas kamienas E. coli K12 DH 1
- 5 (deponuota ATCC, depozito nr. ATCC 33849) (17). Jo genotipas gali būti apibrėžtas taip: F⁻, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r⁻_k, m⁺_k) supE44, relA1. Siekiant išskirti plazmides ir naujas sukonstruotas plazmides, turinčias promotorių p_L iš λ-fago, pirmiausia
- 10 transformuojama E. coli K12 laukinio tipo W6 bakterija. Šiose šeimininkų bakterijose λ-p_L promotorių visą laiką blokuoja temperatūrai atsparus λ represorius. E.coli K12 laukinio tipo W6 kamienas deponuotas DSM, depozito nr. DSM 3632.

15

3. Vektoriai

- E. coli bakterijų transformavimui naudojamos žemiau pateiktos žinomos plazmidės. Kai kurios iš jų yra
- 20 komercinės.
- pBR322 (ATCC 31344, (23) Pharmacia, Freiburg),
pUC18 (deponuota DSM, depozito nr. DSM 3424, (24) Pharmacia, Freiburg),
pUR 290 (DSM 3417, (25)),
- 25 pWH 701 (DSM 3633, (26)),
pRK 248 cIts E.coli K12 JMB9 (ATCC 33766, (27), (49)),
pSP6 (DSM 3904) ir
pRH1810 (DSM 3905).
- 30 Specialistams žinomi ir kiti tinkami vektoriai, kurie gali būti panaudoti pagal šį išradimą dirbant su šeimininkų organizmais, kurie, savo ruožtu, taip pat jiems žinomi.

4. Elektroferezė gelyje

35

Priklausomai nuo DNR dydžio DNR fragmentų atskyrimui naudojami agarozės arba poliakrilamido geliai. DNR

fragmentai, didesni nei 800 bp, skiriami 1-1.2% agarozės gelyje TAE buferyje (40 mM Tris-acetatas, pH 8.3, 2 mM EDTA), DNR fragmentai, mažesni nei 800 bp, skiriami 5% poliakrilamido gelyje (akrilamidas/bisakrilamidas (19:1))
5 TBE buferyje (60 mM Tris'o bazė, 60 mM boro rūgštis, 1 mM EDTA, pH 8.3). Elektroforezė agarozės gelyje denatūruojančiomis sąlygomis kDNR atskyrimui atliekama, pavyzdžiui, 1.2% šarminės agarozės gelyje pagal McDonnell et al. (19).

10

mRNR elektroforetinis atskyrimas atliekamas 1.4% -iniame agarozės gelyje su 15 mM metilgyvsidabrio hidroksidu. Pavyzdžiai gali būti analizuojami elektroforetiškai ir denatūruojami Bailey et al. (20) metodu. Baltymų
15 atskyrimui SDS-poliakrilamido gelyje naudojamas Laemmli metodas (21).

5. Eliucijos iš gelių metodai

20 Preparatyvinis mažesnių nei 1000 bp DNR fragmentų atskyrimas atliekamas 5% poliakrilamido geliuose. Fragmento eliucija atliekama pagal Maxam ir Gilbert (22). Taip atskirti fragmentai naudojami atitinkamai subklonavimui ir sekos analizei.

25

6. RNR išskyrimas

Visos RNR išskyrimas iš žmogaus audinių atliekamas pagal Maniatis et al. metodą (28). Po ekstrakcijos visa RNR
30 centrifuguojama CsCl gradientu - taip atskiriama DNR (29). Į 16 ml Beckman-SW27 centrifugos mėgintuvėlį talpinama 3 ml 5.7 M CsCl ir 100 mM EDTA, pripilama 4 ml RNR tirpalo (3-4 mg nukleino rūgšties tirpale, sudarytame iš 1% N-laurilsarkozino, 5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 4 g/4
35 ml CsCl). Centrifuguojama 17 valandų esant 15°C ir 17000 rpm Beckman SW-27 rotoriuje. RNR nūosėdos resuspenduojamos TE buferyje (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM

EDTA), išsodinamos etanolio ir gryninamos chromatografiškai, siekiant sukaupti poli (A⁺)-mRNR, su oligo(dT) celiulioze (Type 9, Pharmacia, Freiburg) pagal Aviv ir Leder (30). mRNR išsodinama iš eliuato etanolio ir saugojama 70% etanolyje esant -70°C. mRNR izoliato tinkamumas gali būti patikrintas atliekant in vitro triušio retikulocitų lizate transliaciją (žr. sekcią 16) arba atliekant gelio elektroforezę denatūruojančiose sąlygose. Taip išskirta mRNR toliau naudojamakDNR sintezei ir Northern bloto analizei.

7. kDNR sintezė

Komplementari viengrandė arba dvigrandė DNR sintetinama pagal Gubler et al. (13). Sintezės išeiga įvertinama įterpiant α -(³²P)-dCTP, nustatant gautos kDNR molekulės ilgį 1.2% šarminės agarozės gelyje, ir naudojant standartines DNR molekules su radioaktyvia žyme. kDNR 3' galų pailginimas oligo-(dc)homopolimerais atliekama bendrame 40 μ l tūryje esant tokioms sąlygoms: 100 mM K kakodilato, pH 7.2, 10 mM CoCl₂, 1 mM DTT, 500 μ M dCTP, 1-2 mg/ml kDNR, 600 V/ml terminalinės deoksinukleotidiltransferazės. Reakcijos mišinys inkubuojamas 50 minučių esant 20°C, reakcija sustabdoma pridedant EDTA iki galutinės koncentracijos 20mM). Išsodinta etanolio iš 0.3 M natrio acetato tirpalo kDNR suspenduojama TE buferyje (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) ir hibridizuojama su PstI suskaldyta 3'-oligo(dg) pailginta plazmide pBR322 (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EDTA, 0.1-0.3 ng/ μ l kDNR, 1.2 ng/ μ l plazmidinės DNR). Šis mišinys hibridizuojamas atitinkamai 5 minutes esant 65°C, 45 minutes esant 56°C ir 15 minučių esant kambario temperatūrai. Po to šis mišinys naudojamas transformacijai (žr. sekcią 9).

35

8. Northern blot analizė

Atliekama RNR gelio elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis ir pernešimas ant nitroceliuliozės filtro pagal Thomas (31). Prehibridizacija ir hibridizacija su 5'-žymėtais oligonukleotidais gali būti atlikta pagal (9) (žr. sekcią 11). Nespecifiškai surišti oligonukleotidai gali būti pašalinti po hibridizacijos plaunant nitroceliuliozės filtrą, pavyzdžiui, plaunant filtrus 15 minučių kambario temperatūroje ir 3 minutes esant 20°C žemesnei už lydymosi tašką temperatūroje SSC buferyje (900 mM NaCl, 90 mM natrio citrate, pH 7.0). Lydymosi temperatūra apskaičiuojama pagal Suggs et al. (32).

9. E. coli transformacija ir plazmidžių išskyrimas

Rekombinantinių plazmidžių, turinčių naujai susintetintas kDNR (žr. Pav.1c), ruošiamos E. coli K12 DH1 ląstelės pagal Hanahan (17). E. coli K12 kamienų JM101, W6 ir Mc1061 ląstelės transformuojamos pagal Mandel ir Higa (33).

DNR plazmidė ruošama iš vieno litro kultūros pagal metodą, aprašytą nuorodoje (34). Plazmidžių ekspres- analizė atliekama pagal Holmes et al. (35).

25

10. Oligonukleotidų sintezė

Oligonukleotidai sintetinami fosfoamiditiniu metodu (36). Oligonukleotidai gryninami, pavyzdžiui, atvirkštinės fazės chromatografijos metodu ant Shandon-Hypersil ODS® (dalelių dydis 5µm, kolonėlės dydis 4.6 x 250 mm). Tritilo grupė pašalinama veikiant 80% acto rūgštimi, produktai vėl valomi chromatografiškai per jau minėtą kolonėlę ir analizuojami 20% poliakrilamido gelyje, pažymėjus 5'gala (žr. sekcią 11). Šiuo metodu sintetinami du oligonukleotidų mišiniai: RH1 ir RH2. Abu šie oligonukleotidų mišiniai naudojami kaip zondai.

Oligonukleotidų molekulių sekos abiejuose mišiniuose nustatytos iš atitinkamų HUSI-I baltymo (žr. Pav.1) triptinių fragmentų amino rūgščių sekų. Šių fragmentų amino rūgščių sekos nustatytos pagal W. Machleidt (50).

- 5 Šiame išradime naudojamus oligonukleotidų mišinius buvo įmanoma gauti tik koreguojant žinomas HUSI-I sekas, analizuojant kelis triptinius fragmentus ir kelis bromciano fragmentus.

- Oligonukleotidų mišiniai yra vadinami " mišriais zondais",
- 10 tai reiškia, kad oligonukleotidai tam tikrose padėtyse skiriasi dėl genetinio kodo išsigimimo. Įprastinių "mišrių zondų" trūkumus galima sumažinti išgryninant nukleotidus HPLC metodais, o taip pat kiekybiniu ³²P fosforiliniu.
- Oligonukleotidų mišinys RH1 atitinka CUSI-I baltymo (žr.
- 15 Pav.1) triptinio fragmento T2 amino rūgščių seką. Taigi oligonukleotidų mišinį sudaro šešiolika skirtingų oligonukleotidų, turinčių po septyniolika bazių. Sekos yra tokios:

20 3' A A G A C G C T T T A C C T G C C 5'
 A A C A

Oligonukleotidų mišinys RH2 atitinka HUSI-I baltymo (žr. Pav.1) triptinio fragmento T3 amino rūgščių seką. Susintetinti 32 skirtingi oligonukleotidai, turintys po septyniolika bazių. Sekos yra tokios:

30 3' A C A A C A T A C C C A T A C A C 5'
 G G G
 C
 T

11. Radioaktyvus DNR žymėjimas

Chemiškai susintetintų oligonukleotidų ir dvigrandės defosforilintos DNR fragmentai fosforilinami veikiant T4-
5 polinukleotidkinaze 20-50 μ l reakcijos tūryje (50 mM Tris-HCl, pH9.5, 20 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10-20 pmol 5'-OH galo substrato, 8 μ l γ -[³²P] -ATP (~8000 Ci/mmol), 0.2 V/ μ l T4-polinukleotidkinazės), po to preparatyvinės gelio elektroforezės metodu atskiriamas nepanaudotas γ -[³²P] -
10 ATP ir chromatografuojama per jonų mainų kolonėlę su DE-52 (diaminodietilceliulioze) (Whatman). DNR restrikcijos fragmentų nevienodi 5' galai gali būti sulyginami naudojant E. coli DNR polimerazės I Klenow fragmentą dalyvaujant komplementariems α -[³²P] -deoksiribonukleozidtrifosfatams
15 pagal Volkert et al. (14). Neįterpti α -[³²P] -deoksiribonukleozidtrifosfatai atskiriami gelfiltracine chromatografija ant Sephadex G-50, o surinktos frakcijos koncentruojamos esant sumažintam slėgiui.

20 12. DNR sekos analizė

DNR molekulių sekos nustatomos pagal Maxam ir Gilbert (22).

25 13. Sulieto β -galaktozidazės baltymo gryninimas

CUSI-I- β -galaktozidazės sulietas baltymas gryninamas afinine chromatografija pagal Ullmann (37).

14. Baltymų perkėlimas ant nitroceliuliozės filtro

Baltymai, atskirti NDS-poliakrilamido gelyje, perkeliami ant nitroceliuliozės filtro pagal Towbin et al. (12).

5

15. CUSI-I inhibavimo testas

Baltymų, pasižyminčių CUSI-I biologiniu aktyvumu, aktyvumas įrodomas matuojant tripsino (38) ir chimotripsino (39) inhibavimą.

10

16. Belastelinė mRNR transliacija

Belastelinė mRNR transliacija į retikulocitų lizatą atliekama pagal Pelham et al. (40), naudojant radioaktyviai žymėtą amino rūgštį - ^{35}S -metioniną, turintį specifinį aktyvumą 1200 Ci/mmol.

15

Pavyzdžiai iliustruoja išradimą.

20

Pavyzdys 1

Dalinio CUSI-I baltymo specifinio kDNR klonavimas ir identifikavimas

25

a) mRNR išskyrimas ir apibūdinimas

Visa RNR arba mRNR yra išskiriama iš žmogaus gimdos kaklelio audinių (biopsinė medžiaga) pagal metodiką, jau aprašytą sekcijoje 6. Maždaug 1.6 -2.2 mg visos RNR gaunama iš 14-17 g gimdos kaklelio audinių. Po afininės chromatografijos su oligo (dT)-celiulioze (Type 9, Pharmacia) sukaupus poli(A⁺)-mRNR, gaunama 20-25 µg mRNR/mg visos RNR. Tai atitinka 2.0-2.5% mRNR išėigą. Gelio elektroforetinė analizė agarozės gelyje denatūruojančiomis sąlygomis rodo, kad RNR skyrimo metu nesuskyla. Panašūs rezultatai taip pat gaunami iš visos

30

35

160
RNR ir poli(A⁺)-mRNR in vitro transliacijos į triušio retikulocitų lizatą.

- b) Išskirtos mRNR Northern blot analizė su sintetiniu
5 oligonukleotidu, siekiant nustatyti CUSI-I baltymui specifines sekas

- Northern blot analizė atliekama, siekiant identifikuoti specifines mRNR sekas gimdos kaklelio mRNR izoliatai.
- 10 Oligonukleotidų mišinys RH1, kuris yra komplementarus mRNR, koduojančiai amino rūgštis Phe-Cys-Glu-Met-Asp-Gly (žr. Pav. 1), naudojamas kaip hibridizacijos zondas. Ekspozuojant rentgeno juostą („Kodak X-omat-AR“) su hibridizacijoje gautu nitroceliuzės filtru, aptinkamas
15 specifinis signalas.
- Naudojant oligonukleotidų mišinį RH2, teigiamas signalas negautas, nors vėliau (po sekvenavimo) pasirodė, kad viena iš mišinio oligonukleotidų sekų yra teisinga. Lyginant hibridizuojamos mRNR ir standartinės DNR molekulės dydį
20 denatūruojančiame gelyje, nustatyta, kad hibridizuojamos RNR ilgis yra maždaug 650-800 bazių.

c) kDNR bibliotekos ruošimas, naudojant plazmidę pBR322

- 25 kDNR sintezei pradinei medžiaga imama 4-6 μg poli(A⁺)-mRNR. Viengrandės kDNR išėiga yra maždaug 280 ng (maždaug 7%). Susintetintų viengrandžių kDNR molekulių dydis yra maždaug 400-2500 nukleotidų. Iš 280 ng vg kDNR sintetinant antrą grandį gaunama maždaug 270 ng dvigrandės kDNR. Todėl
30 dvigrandės kDNR išėiga yra maždaug 50%. kDNR molekulės 3' galus prailgina homopolimeriniais (dC) regionais. Taip gautos kDNR molekulės pridedamos į hibridizavimo reakcijos mišinį kartu su plazmidės pBR322 molekulėmis, kurios suskaldytos PstI ir kurių 3' galai prailginti
35 homopolimeriniais (dG) regionais. Prisijungimo produktai naudojami E. coli K12 DH1 transformacijai. Po to atrenkami transformantai, atsparūs tetraciklinui ir transformantai,

- jautrūs ampicilinui. Vienam ng kDNA gaunama 120 transformantų (12000 transformantų/100 ng dg kDNR). Atsparių tetraciklinui ir jautrių ampicilinui transformantų ar kolonijų dalis yra maždaug 80%. Šie transformantai talpinami į mikrotitravimo lėkšteles (98 šulinėliai lėkštelėje) kaip saugojimo kultūros (terpė: LB terpė, 10 g/l fermentiškai suskaldyto kazeino (Sigma), 8 g/l NaCl, pH 7.5, 5 g/l mielių ekstrakto (Sigma), 20 μg/ml tetraciklino, 20% glicerino) ir laikoma esant -20°C.
- 10 d) Rekombinantinės plazmidės, turinčios CUSI-I baltymo specifinę kDNR, identifikavimas
- 6000 transformantų, gautų pagal aukščiau aprašytas
- 15 metodikas, analizuojami hibridizuojant kolonijas oligonukleotidų mišiniu RH1. Oligonukleotidų mišinio aktyvumas yra maždaug 1×10^6 cpm hibridizacijos tūryje esant aktyvumui 0.8 μCi/pmol. Rentgeno juostos eksponuojamos su filtrais, gautais hibridizuojant
- 20 kiekvieną jų 12 valandų su dviem intensyvumą didinančiais ekranais esant -70°C. Registruojamas teigiamas signalas. Iš atitinkamo transformanto saugojimo kultūros ruošiama rekombinantinė plazmidė pRH31 (0.5 l kultūros, į kurios sudėtį įeina LB terpė, 10 g/l fermentiškai suskaldyto
- 25 kazeino (Sigma), 10 g/l NaCl, pH 7.5, 5 g/l mielių ekstrakto (Sigma), 20 μg/ml tetraciklino). Naudojant restrikcijos endonukleazes Pst I, EcoRI, BamHI ir HindIII paruošiamas rekombinantinės plazmidės pRH31 restrikcijos žemėlapis (žr. Pav. 2). kDNR intarpas yra 500 bp ilgio
- 30 (žr. Pav. 2). Plazmidė pRH31 deponuota DSM, depozito nr. DSM 3634.
- e) kDNR intarpo plazmidėje pRH31 sekos analizė
- 35 Sekvenavimui pagal Maxam ir Gilbert (22) PstI fragmentas (500 bp) iš plazmidės pRH31 perklonuojamas į plazmidę pUC18. 10 μg DNR iš pRH31 skaldoma 30 V restrikcijos

endonukleazės PstI, skiriama preparatyviškai ant agarozės gelio ir gautas 500 bp fragmentas eliuojamas iš gelio. Po to 10 µg plazmidės pUC18 DNR skaldoma restrikcijos endonukleaze PstI, defosforilinama, ekstrahuojama fenoliu ir dietilo eteriu ir išsodinama etanoliu iš 0.3 moliarinio natrio acetato tirpalo. Po to sekančiai T4-DNR ligazės reakcijai naudojama 0.2 pmol plazmidės DNR ir 0.4 pmol PstI fragmento. Taip gautos rekombinantinės DNR molekulės naudojamos E. coli K12 JM 101 transformacijai. Selekcija atliekama LB lėkštelėse su ampicilinu (10 g/l kazeino, 8 g/l NaCl, 5 g mielių ekstrakto, 100 µg/ml ampicilino). Rekombinantinės plazmidės esančios ampicilinui atspariuose transformantuose charakterizuojamos atliekant plazmidžių ekspresinę analizę. Gaunamos rekombinantinės plazmidės pRH181 ir pRH182, kurių sudėtyje yra priešingos orientacijos pRH31 PstI fragmentas. Sekvenavimo strategiją, parodytą Pav. 3, apibrėžia konstrukcija šių plazmidžių, kurios naudojamos tik kaip pagalbinės lengvesniam DNR sekvenavimui.

Plazmidės pRH31 500 bp PstI fragmento nukleotidų seka, nustatyta sekvenuojant (22), parodyta Pav. 4. Sekos pradžioje 5' gale yra 20 (dG) liekanų. Po to eina atviras skaitymo rėmelis, apimantis 273 bp (žr. Pav. 4, padėtys nuo 25 iki 297). Šis atviras skaitymo rėmelis koduoja 90 amino rūgščių ir baigiasi stop kodonu TGA (žr. Pav. 4.). Iš nukleotidų sekos matyti, kad oligonukleotidų mišinio RH1 oligonukleotidai yra komplementarūs nukleotidų sekos pozicijoms nuo 247 iki 263.

Po stop kodono TGA dar yra 178 bp.

Nukleotidų sekos analizė rodo, kad regiono, koduojančio CUSI-I baltymo N galo segmentą, nukleotidų sekoje nėra.

Pavyzdys 2

Rekombinantinės plazmidės, kurios sudėtyje yra kDNR fragmentas, koduojantis visą CUSI-I baltymą, išskyrimas

a) Oligonukleotido RH5 sintezė.

Siekiant išskirti kDNR fragmentą, apimantį visą CUSI-I baltymą koduojantį regioną, fosfoamiditiniu metodu (36) 5 sintetinamas oligonukleotidas RH5. Oligonukleotido RH5 ilgis yra 20 bazių. Jis yra komplementarus koduojančios DNR grandinės padėtimis nuo 31 iki 50, parodytoms Pav. 4 ir turi tokią seką:

10

5' C A C T C A G G T T T C T T G T A T C T 3'

Oligonukleotidas RH5 žymimas radioaktyvia žyme ir naudojamas kaip zondas, identifikuojant naujoje kDNR 15 bibliotekoje transformantus, turinčius plazmidės, kurių kDNR fragmentai savo 5' galuose turi plazmidės pRH31 bent jau 5' galo regioną.

b) Naujos kDNR geno bibliotekos paruošimas, apimančios 20 rekombinantinę plazmidę su visu regionu, koduojančiu CUSI-I baltymą.

Siekiant paruošti naują kDNR biblioteką E. coli, naudojant plazmidę pBR322, išskiriama mRNR, koduojanti CUSI-I 25 baltymą. visos iš Žmogaus gimdos kaklelio audinių RNR (250 µg) frakcionuojama pagal dydį elektroforetiniu metodu denatūruojančiame 1.4 % „žemai besilydančios“ agarozės gelyje, turinčiame 15 mM metilgyvsidabrio hidroksido (žr. 30 sekciją 4). Maždaug 10 µg mRNR, kurios ilgis yra nuo 700 iki 850 bazių, išskiriama ekstrahuojant šį gelį. 4 µg šios mRNR suvartojama kDNR sintezei (žr. sekciją 7) ir 35 įterpiama į E. coli K12 DH1 (žr. sekciją 9). Iš 53 ng dvigrandės kDNR gaunama 4300 transformantų. Transformantai analizuojami kolonijų hibridizacijos metodu su 5' žymėtu oligonukleotidu RH5 (žr. Pavyzdį 2a). Oligonukleotido 35 aktyvumas hibridizacijos tirpale yra 2×10^5 cpm/ml, specifinis aktyvumas - 0.72 µCi/pmol. Išskirta 12

transformantų, kurių plazmidė hibridizuojasi su oligonukleotidu RH5. Iš transformantų saugojamos kultūros mėginių išskiriamos plazmidės ir paruošiami jų restrikcijos žemėlapiai su PstI, BamHI ir Hind III. Rasta, kad 11 šių plazmidžių turi identiškus restrikcijos žemėlapius kaip ir plazmidė pRH31, t.y. kiekviena jų turi vieną BamHI/PstI fragmentą, sudarytą iš 380 bp, ir vieną iš maždaug 125 bp, taip pat vieną HindIII/PstI fragmentą iš maždaug 290 bp ir vieną iš maždaug 200 bp. PstI fragmentų ilgis kiekvienu atveju buvo maždaug 500 bp. Tik vienos plazmidės restrikcijos žemėlapis skirtingas, t.y. jos sudėtyje yra BamHI/PstI fragmentas iš 285 bp ir vienas iš 275 bp bei HindIII/PstI fragmentas iš maždaug 450 bp ir vienas iš maždaug 105 bp. Intarpo ilgis šioje išsiskiriančioje plazmidėje yra maždaug 550 bp. Ši rekombinantinė plazmidė vadinama pRH34. Jos restrikcijos žemėlapis parodytas Pav. 8. Plazmidė pRH34 deponuota DSM, depozito nr. DSM 3635.

c) rekombinantinės plazmidės intarpo pRH34 nukleotidu seka.

pUC18 DNR skaldoma PstI arba PstI ir BamHI ir veikiama šarmine fosfataze, po to į ją subklonuojami PstI -kDNR fragmentas iš pRH34 ir abu BamHI/PstI fragmentai iš pRH34. Taip sukonstruotos rekombinantinės plazmidės, kurios atlieka pagalbinį vaidmenį DNR sekos analizėje, žymimos pRH1807 (PstI fragmentas), pRH1808 (N galinis BamHI/PstI fragmentas), ir pRH1809 (C galinis BamHI/PstI fragmentas). Subklonuotų DNR fragmentų seka analizuojama Maxam-Gilbert metodu (22). Rekombinantinių plazmidžių sekvenavimo strategija matoma Pav. 6.

kDNR fragmento iš pRH34 nukleotidų seka parodyta Pav. 5. Ji identiška kDNR intarpo sekai iš pRH34 nuo 25 iki 308 padėties (žr. Pav. 4). Tačiau kDNR intarpas iš pRH34 184 bp ilgesnis 5' gale. Iš to skaičiaus 143 bp atitinka seką, kuri yra komplementari mRNR ir 41 bp yra iš kDNR

homopolimero prailginimo su dCTP kartu su PstI
restrikcijos saitu.

+1

- 5 Nustatyta, kad amino rūgštys Ser-Gly-Lys-Ser-Phe yra
inhibitoriausias HUSI-I N galas. Kai amino rūgščių kodonai
nustatomi pagal izoliuotos DNR sekos 5' galinius
nukleotidus, šioje skaitymo rėmelio dalyje nerandama stop
kodono. Todėl ATG, kuris atsiranda skaitymo rėmelyje,
10 atsako už iniciaciją ir koduoja CUSI-I baltymo pradžią. Be
to, sekretuojamų baltymų signalinių peptidų sekos retai
būna ilgesnės nei 25 amino rūgštys. Restrikcijos saitai
tarp signalinio peptido ir atitinkamo natyvinio baltymo
dažniausiai būna toliau negu tokios amino rūgštys kaip
15 alaninas, serinas ir glicinas; seka Gly*Ser yra dažnai
sutinkama.

- Taigi žmogaus CUSI-I baltymo iš gimdos kaklelio sekreto
pirminę struktūrą sudaro 107 amino rūgštys. Nustatyta
20 nukleotidų seka koduojama amino rūgščių seka iš esmės
sutampa su bronchinės antileukoproteazės N-galine amino
rūgščių seka, kuri iki šio išradimo buvo nepakankamai
gerai žinoma (41).

25 Pavyzdys 3

CUSI-I baltymo ekspresija E. coli

- a) Ekspresijos plazmidės, apimančios visą CUSI-I kDNR
30 žemiau reguliuojamo λ -p_Lpromotoriaus, konstravimas.

- Pradžioje sintetinami du sintetiniai oligonukleotidai,
kurie žymimi RH6 ir RH7. Jie yra komplementarūs vienas
kitam ir turi sekas, atitinkančias optimalius ribosomų
35 prisijungimo saitus (42), SalI ir EcoRI restrikcijos saitą
ir CUSI-I koduojančio regiono nukleotidų seką nuo
pozicijos 1 iki pozicijos 14. Abu oligonukleotidai yra

fosforilinami nuo 5' galo, veikiant T4-
polinukleotidkinaze, atskiriami preparatyvinės
elektroforezės metodu 12% gelyje, eliuojami iš gelio ir
chromatografuojami ant DE52. Po gel-filtracijos ant.

- 5 Sephadex G-50 sumaišoma po 10 pmol kiekvieno
oligonukleotido, denatūruojama esant 90°C ir
hibridizuojami vienas su kitu, lėtai aušinant iki kambario
temperatūros. Taip gaunami tokie dvigrandės DNR
fragmentai:

10				Met	Lys	Ser	Ser
		10		20		30	
	RH6	5'	AATTCGGAGGTGTCGACTATGAAGTCCAGCGG	3'			
	RH7		GCCTCCACAGCTGATACTTCAGGTCGCC				
15		EcoRI	SD	Sall		HaeIII	

- 20 Antras išskirtas komponentas yra plazmidės pRH34 210 bp
(HaeIII/BamHI) fragmentas, kuris koduoja tolesnį N galo
regioną. Tuo tikslu 10 µg plazmidės pRH34 skaldoma
restrikcijos endonukleazėmis HaeIII ir BamHI ir atskiriama
elektroforezės būdu 5% poliamido gelyje. Plazmidė pRH1807
(Pav. 6) yra trečiasis komponentas, atliekantis vektoriaus
vaidmenį (Pav. 7). Tuo tikslu 10 µg plazmidės skaldoma
25 restrikcijos endonukleazėmis EcoRI ir BamHI. Vektoriaus
fragmentas veikiamas šarmine fosfataze, ekstrahuojamas
fenoliu ir išsodinamas etanoliu. Siekiant liguoti visus
tris komponentus (Pav. 7), hibridizuojama po 1 pmol
kiekvieno sintetinio oligonukleotido, sumaišoma ir
30 liguojama 0.2 pmol N galinio HaeIII-BamHI fragmento ir
0.03 pmol DNR vektoriaus 30 µl tūryje su 5 V T4-DNR
ligaze. Transformacijai naudojamas E. coli K12 kamienas JM
101.

- 35 Transformantų plazmidės tikrinamos hibridizuojant su
radioaktyviai žymėtu oligonukleotidu RH6. Be to,
patikrinami Sall, EcoRI ir BamHI restrikcijos saitai ir

nustatomas atitinkamų fragmentų ilgis. Taisyklingai sukonstruota nauja plazmidė žymima pRH1810 (DSM 3905) (Pav. 7).

- 5 Siekiant sukonstruoti ekspresijos plazmidę, 10μg vektoriaus pWH701 (26) skaldoma EcoRI ir SphI, defosforilinama, ekstrahuojama fenoliu ir išsodinama etanoliu. Siekiant paruošti EcoRI-SphI fragmentą iš plazmidės pRH1810, 10μg DNR skaldoma EcoRI ir SphI. Gautas
10 525 bp fragmentas atskiriamas nuo vektoriaus elektroforezės metodu 5% poliakrilamido gelyje ir eliuojamas iš gelio. Po to 0.3 pmol vektoriaus pWH 701 ir 1 pmol EcoRI-SphI fragmento liguojami vienas su kitu ir įterpiami į E.coli K12 laukinį kamieną W6. Gautų
15 transformantų plazmidės apibūdinamos plazmidžių ekspres- analize bei elektroforeze agarozės gelyje. Rekombinantinės ekspresijos plazmidės yra 280 bp ilgesnės negu ekspresijos plazmidės be intarpo. Naujai sukonstruota rekombinantinė ekspresijos plazmidė yra žymima pRH24 ir naudojama
20 tolesniems eksperimentams. Pav. 7 parodyta rekombinantinės ekspresijos plazmidės pRH24 konstravimo schema.

b) CUSI-I kDNR ekspresija su ekspresijos plazmide pRH24 E.coli K12 MC1061/pRK248 cITs (15, 27):

- 25 Šeimininko bakterijos kamienas nėra λ-lizogeniškas, t.y. neturi λ-cI represoriaus. Genetinė informacija apie temperatūrai jautrų represorių λ-cI 857 lokalizuota plazmidėje pRK248 cITs, kuri taip pat suteikia šeimininko
30 bakterijoms atsparumą tetraciklinui (27). Esant 30°C λ-p_Lpromotoriaus kontroliuojama transkripcija yra visiškai represuota. Esant 42°C, temperatūrai jautrus cI 857 represorius yra neaktyvioje formoje ir transkribuojami genai, esantys žemiau p_L promotoriaus.
35 E.coli K12 MC1061/pRK248 cITs transformuojamas su ekspresijos plazmide pRH24. Norint indukuoti CUSI-I geno, esančio žemiau λ-p_L promotoriaus, 200 ml LB terpės (20μ

g/ml tetraciklino, 50 µg/ml ampicilino) inokuliuojama su 3ml per naktį išlaikytos E. coli K12 MC1061/pRK248 cITs/pRH24 kultūros ir auginama esant 28°C iki ląstelių optinio tankio 0.7 A₅₇₈ V/ml. Po to kultūra purtoma toliau esant 42°C. Norint atlikti baltymų analizę, prieš ekspresijos indukciją ir įvairiais laiko tarpais po indukcijos pradžios imami ląstelių mėginiai, atitinkantys 1 A₅₇₈ vieneta (maždaug 1×10^9 ląstelių), centrifuguojami 3 minutes (12000 g), nuosėdos laikomos užšaldytos iki -20°C iki tolesnės analizės.

Pavyzdys 4

Grubaus baltymo ekstrakto charakterizavimas po CUSI-I baltymo ekspresijos E. coli K12 MC1061/pRK248 cITs/pRH24

a) Imuninės kros-reakcijos testas su triušio anti-HUSI-I antiserumu

Ląstelių nuosėdos resuspenduojamos 60µl ardančio buferio (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 2% Triton-X-100) ir pridedama 40µl redukuojančio buferio (4% NDS, 40% β-merkaptoetanolio, 20% glicerino, 0.1 % bromfenolio mėlynojo). Po to pavyzdžiai inkubuojami 5 minutes esant 100°C, laikomi 5 minutes ultragarso vonioje ir vėl 5 minutes esant 100°C. 20 µl suardytų ląstelių frakcionuojamos elektroforetiškai 13.5% NDS-poliakrilamido gelyje ir perkeliamos ant nitroceliuliozės imuninei analizei. Nitroceliuliozės filtras inkubuojamas 1 valandą esant 37°C su blokuojančiu buferiu (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 200 mM NaCl, 0.05 % Tween 20, 1.5 % želatinos) siekiant prisotinti nespecifinius surišimo saitus ant filtro. Triušio anti-HUSI-I antiserumas (praskiestas blokuojančiu buferiu 1:600) naudojamas reakcijai su pirmais antikūnais (inkubuojama 2 valandas kambario temperatūroje), avies anti-triušio-IgG-peroksidazės konjugatas yra naudojamas kaip antras antikūnas.

Peroksidazės iš krienų substratu naudojamas
diamonobenzidinas.

- b) Proteinazės inhibitoriaus, ekspresuoto E. coli,
5 inhibitorinio aktyvumo testas

Indukuotų (6 val po indukcijos pradžios) ir neindukuotų
ląstelių mėginiai suardomi ir testuojami. Ląstelių
nuosėdos (1 A₅₇₈ ląstelių vienetas) suspenduojamos 50 µl
10 lizozimo ardančiame buferyje (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM
EDTA, 1 mg/ml lizozimo), inkubuojamos 10 minučių kambario
temperatūroje, praskiedžiamos 150 µl 50 mM Tris-HCl, pH
8.0, 1 mM EDTA ir inkubuojamos 5 minutes kambario
temperatūroje ultragarso vonioje. 20 µl ir 80µl,
15 atitinkamai, neindukuotų ir indukuotų ląstelių grubaus
ekstrakto analizuojama chimotripsino inhibavimo testu
(39), siekiant nustatyti inhibitorinį aktyvumą.
Rezultatai pateikti Lentelėje I.

20 Lentelė I

CUSI-I baltymo, ekspresuoto E. coli, inhibitorinio
aktyvumo matavimas

- 25 Inhibuojantis indukuota neindukuota
tirpalas Chimotripsino
E. coli ekstraktas aktyvumas,
µl
2 pmol, %

30

20	-	+	99.2
80	-	+	89.7
20	+	-	91.2
80	+	-	56.4

Lyginant chimotripsino aktyvumą matyti, kad indukuotų ląstelių ekstrakto inhibitorinis aktyvumas yra didesnis negu neindukuotų, atitinkamai, 8 ir 37%.

5 Pavyzdys 5

C galinio CUSI-I domeno, esančio β -galaktozidazės sudėtyje ekspresija E. coli K12 JM 101

- 10 Kaip matyti iš Pav. 9, CUSI inhibitoriaus struktūra gali būti aprašyta kaip baltymo molekulė, sudaryta iš dviejų domenų, susiformavusių intrageninės duplikacijos būdu. Siekiant ekspresuoti C galinį domeną E. coli, DNR seka, koduojanti C galines 59 amino rūgštis yra liguojama į
- 15 teisingą skaitymo rėmelį su DNR seka, koduojančia plazmidės pUR290 β -galaktozidazės C galą (25). Klonavimo schema parodyta Pav. 10.
- 20 10 μ g plazmidės pRH31 skaldoma restrikcijos endonukleaze Sau3A, atskiriama preparatyviai 5% poliakrilamido gelyje ir 320 bp CUSI-I fragmentas eliuojamas iš gelio. pUR290 (10 μ g) skaldoma fermentu BamHI, veikiamą šarmine fosfataze ir liguojama su 320 bp fragmentu. Trečdalis liguotos DNR įterpiama į kalcio chloridu paveiktas E. coli K12 JM 101
- 25 ląsteles. Klonai atrenkami LB-amp agarą lėkštelėse (10 g/l fermentiniu būdu suskaldyto kazeino (Sigma), 8 g/l NaCl, 5 g/l mielių ekstrakto (Sigma), pH 7.5, 100 μ g/ml ampicilino). Kadangi rekombinantinėje plazmidėje galimos dvi CUSI-I fragmento orientacijos, plazmidė analizuojama
- 30 ekspres-metodais ir po to skaldoma HindIII restriktaze. Klonai, kurių plazmidėse yra 165 bp HindIII fragmentai, analizuojami toliau. Viena iš šių plazmidžių žymima pRH21. Siekiant sukelti sulieto baltymo ekspresiją, 100 mg LB terpės, kurioje yra 100 μ g/ml ampicilino,
- 35 inokuliuojama plazmide pRH21 transformuotomis bakterijomis E.coli K12 JM 101 iš kultūros, kuri išlaikyta per naktį. Kultūra inkubuojama esant 37°C ir ląstelių augimas

stebimas prie 578 nm. Kai optinis tankis (578 nm) pasiekia 0.5, IPTG kiekis kultūroje koreguojamas iki 500 μ mol ir kultūra toliau inkubuojama esant 37°C. Sekama sulieto baltymo indukcijos priklausomybė nuo laiko bei

5 analizuojama elektroforezės metodu NDS poliakrilamidiniame gelyje. Po indukcijos iš pradžių susidaro tik CUSI-I- β -galaktozidazės sulietas baltymas, o vėliau - ir galaktozidazė. Siekiant pademonstruoti imuninę reakciją su anti-CUSI-I antikūniais, grubaus E. coli ekstrakto

10 baltymai atskiriami NDS gelyje elektroforezės metodu ir pernešami ant nitroceliuliozės. Atliekama Western blot analizė sulietų baltymų specifiniam nustatymui, kaip parašyta Pav. 4a). Sulietas baltymas išskiriamas ir gryninamas taip:

15

Pagal (37) IPTG analogas TPEG prijungiamas prie CH-Sefarozės. Siekiant išgryninti CUSI-I- β -galaktozidazės sulietą baltymą, kamienas E. coli K12 JM 101, turintis plazmidę pRH21, kultivuojamas viename litre LB terpės su

20 50 μ g/ml ampicilino, ir, esant 0.5 A₅₇₈ vienetų/ml, indukuojamas IPTG, kurio koncentracija terpėje privedama iki 0.5 mmol. Po 1 valandos indukcijos fazė sustabdoma greitai atšaldant kultūrą iki 4°C. Ląstelės išsodinamos (5.5 g drėgno svorio), suspenduojamos lizavimo buferyje

25 (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 20 mM MgCl₂, 20 mM β -merkaptetoetanolio) ir suardomos veikiant ultragarsu. Grubiame ekstrakto baltymo koncentracija koreguojama iki maždaug 20 mg/ml, o NaCl - iki 1.6 mol, ir ekstraktas gryninamas chromatografiniu būdu per TPEG-Sefarozę. Kolona

30 perplaunama 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM β -merkaptetoetanoliu, 10 mM MgCl₂ ir 1.6 M NaCl, po to CUSI-I- β -galaktozidazės sulietas baltymas eliuojamas praleidžiant 100 mM natrio boratą, 10 mM β -merkaptetoetanolio, pH 10. Chromatografinis procesas sekamas matuojant β -

35 galaktozidazės aktyvumą (43). Iš 1 litro kultūros gaunama 8 mg švarios CUSI-I- β -galaktozidazės (90 %). Be to, buvo

parodyta, kad išgrynintas sulietas baltymas reaguoja su anti-HUSI-I antikūnais.

Norint atskelti C galinį CUSI-I domeną, taip išgrynintas
 5 baltymas ištirpinamas 10 arba 30 % acto rūgštyje arba 70%
 skruzdžių rūgštyje. Skylant rūgščiai neatspariai Asp-Pro
 jungčiai (žr. CUSI-I amino rūgščių seką), per 24-36
 valandas susidaro 40-60% C galinio CUSI-I domeno.
 Suskaldžius rūgštimi, CUSI-I domenas gali būti atskirtas
 10 gel-filtracijos būdu per G-75 ir išgrynintas.

C galinio CUSI-I domeno amino rūgščių seka yra tokia:

Pro-Val-Asp-Thr-Pro-Asn-Pro-Thr-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Lys-
 15 Cys-Pro-Val-Thr- Tyr-Gly-Gln-Cys-Leu-Met-Leu-Asn-Pro-Pro-
 Asn-Phe-Cys-Glu-Met-Asp-Gly-Gln- Cys-Lys-Arg-Asp-Leu-Lys-
 Cys-Cys-Met-Gly-Met-Cys-Gly-Lys-Ser-Cys-Val-Ser-Pro-Val-
 Lys-Ala-OH.

20 Ši seka sutampa su baltymo CUSI-I seka nuo 50 iki 107
 padėties.

Pavyzdys 6

25 C galinio CUSI-I domeno ekspresija E. coli K12JM101

Kaip matyti iš Pav. 5, C galinis CUSI-I domenas gali būti
 ekspresuotas E. coli K12JM101 kaip sulietas su β -
 galaktozidaze baltymas. Kaip parodyta Pav. 11, kDNR,
 30 koduojanti 59 C galinės amino rūgštis, yra prijungta
 skaitymo rėmelyje prie plazmidės pSP6 šarminės fosfatazės
 geno, siekiant ekspresuoti C galinį CUSI-I domeną kaip
 natyvinį baltymą. Plazmidė pSP6 deponuota Vokietijos
 mikroorganizmų kolekcijoje (DSM), depozito nr. DSM 3904.

35

30 μ g plazmidės pRH1810 skaldoma reštrikcijos
 endonukleazėmis BamHI ir HinfI. DNR fragmentai atskiriami

8% poliakrilamido gelyje. CUSI-I DNR fragmentas, koduojantis C galinį domeną, eliuojamas iš gelio. Išskisę DNR galai sulyginami panaudojant DNR polimerazės Klenow fragmentą. Gaunama dvigrandė 182 bp DNR molekulė bukais galais.

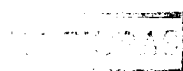
3µg vektoriaus pSP6 skaldoma restrikcijos endonukleaze HindIII. Išsišovę viengrandės DNR galai nuskeliami veikiant nukleaze iš Mung pupų ir 5' galinės fosfatų liekanos pašalinamos veikiant šarmine fosfataze.

0.3 pmol taip apdoroto vektoriaus liguojama su 1 pmol C galinio CUSI-I DNR fragmentu. E. coli kamieno K12DH1 transformuotis galinčios ląstelės (17) transformuojamos su puse gauto ligavimo produkto. Klonai atrenkami LB-amp agaru lėkštelėse. 4 klonai identifikuojami kolonijų hibridizavimo metodu su oligonukleotidu AH12. Klonų plazmidės DNR turi DNR sekas, kurios yra komplementarios panaudotam mėginiui. Oligonukleotidas AH12 yra komplementarus CUSI-I kDNR klono nukleotidų sekai 241-258. Jis turi tokią seką:

5' CCT GTT GAC ACC CCA AAC 3' .

Atlikus plazmidės ekspres-analizę ir suskaldžius DNR restrikcijos endonukleazėmis HindIII ir BamHI, identifikuojamas klonas, turintis kaip intarpą 540 bp fragmentą. Ši DNR fragmentą sudaro promotoriaus regionas p_{tac}, šarminės fosfatazės signalinio peptido seka ir C galinio CUSI-I domeno kDNR seka. Taip sukonstruota plazmidė žymima pBA17.

Po to kompetentingos E. coli K12 JM 101 ląstelės transformuojamos, veikiant jas sukonstruotos ekspresijos plazmidės pBA17 DNR. Siekiant ekspresuoti C galinį CUSI-I domeną, 250 ml LB-Amp terpės inokuliuojama gautais transformantais. Inkubuojama esant 37°C. Ląstelių augimas



stebimas prie 578 nm. Esant optiniam tankiui 0.97, pridedama IPTG iki galutinės koncentracijos 0.5 mM, siekiant indukuoti ekspresiją. Prieš ir po ekspresijos įvairiais laiko tarpais imami mėginiai po 1 A₅₇₈ vieneta
5 (žr. Lentelę II, pateiktą žemiau), centrifuguojami prie 12000 g 3 minutes ir ląstelių nuosėdos laikomos esant - 20°C. Ekspresijos produktas sudarytas iš 59 amino rūgščių, kurių seka yra tokia:

10

Asp-Pro-Val-Asp-Thr-Pro-Asn-Pro-Thr-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-
Lys-Cys-Pro-Val-Thr- Tyr-Gly-Gln-Cys-Leu-Met-Leu-Asn-Pro-
Pro-Asn-Phe-Cys-Glu-Met-Asp-Gly-Gln- Cys-Lys-Arg-Asp-Leu-
Lys-Cys-Cys-Met-Gly-Met-Cys-Gly-Lys-Ser-Cys-Val-Ser-Pro-
15 Val-Lys-Ala-OH.

Bandymas C galinio CUSI-I domeno, ekspresuoto E. coli, inhibitoriniam aktyvumui nustatyti

20 Chimotripsino inhibavimo testas (39) atliekamas kaip aprašyta Pavyzdyje 4. Grubaus E. coli ekstrakto inhibitorinio aktyvumo didėjimas chimotripsino atžvilgiu matuojamas priklausomai nuo laiko. Kiekvienu atveju pusė E. coli lizato (100 μl) testuojama, siekiant nustatyti
25 inhibitorinį aktyvumą. Rezultatai pateikti Lentelėje II.

Lentelė II

C galinio CUSI-I domeno, ekspresuoto E. coli,
inhibitorinio aktyvumo nustatymas

5

	Mėginio paėmimo prieš indukciją laikas (valandos)	m TV/ml kultūros	Chimotripsino aktyvumas (2 pmol, %)
10	2	0.624	90
	2.5	1.88	75
	3	2.00	77
15	Mėginio paėmimo po indukcijos laikas (valandos)		
20	1	4.83	67
	2	6.57	67
	3	7.24	67
	4	9.56	64
	5	8.00	67
25	6	10.66	60
	21	16.98	37

Lentelėje III išvardinti mikroorganizmai, deponuoti pagal
30 Budapešto sutartį.

Lentelė III

	Mikroorganizmas	Kur deponuota	Depozito Nr.
5			
	E. coli K12 MC1061	DSM	3631
	E. coli K12 JM101	ATCC	33876
	E. coli K12 DH1	ATCC	33849
10	E. coli K12 W6	DSM	3632
	pBR322	ATCC	31344
	pUC18	DSM	3424
	pUR290	DSM	3417
	pWH701	DSM	3633
15	pRK248cITs	ATCC	33766
	pRH31	DSM	3634
	pRH34	DSM	3635
	pSP6	DSM	3904
	pRH1810	DSM	3905
20			

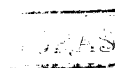
Literatūra

1. Bodmer et al., Schweiz. med. Wschr. 144, 1359-1363 (1984)
2. Lewis, D.A., Biochem. Pharmacol. 33, 1705-1714 (1984)
3. Schiessler, H. et al., Bayer Symp. V, Proteinase Inhibitors, (Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J. Truscheit, E., Eds.), pp. 147-155, Springer Verlag, Berlin (1974)
4. Wallner, O. and Fritz, H., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 709-711 (1974)
5. Fritz, H. et al. (1975) in: Proteases and Biological Control (Reich, E., Rifkin, D. B. and Shaw, E., Eds.), 737-766, Cold Spring Harbor Laboratory
6. Wallner, O. et al. in: Protides of the Biological Fluids (Peters, H., ed.) 23, 177-182, Pergamon Press, Oxford (1975)
7. Chirgwin, J.M. et al., Biochemistry 18, 5294-5299 (1979)
8. Thayer, R. E., Anal. Biochem. 98, 60-63 (1979)
9. Wallace, R. B. et al., Nucl. Acids Res. 9, 879-894 (1981)
10. Clark, L. et al., Meth. Enzymol. 68, 436-442 (1979)
11. Gershoni, J.M. and Palade, G. E., Anal. Biochem. 131, 1-15 (1983)

12. Towbin, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354 (1979)
13. Gubler, U. and Hoffman, B. J., Gene 25, 263-269 (1983)
14. Volkaert, G. et al. in: Advanced Molecular Genetics, Springer Verlag, Berlin, 255-257 (1984)
15. Casadaban, M.J. and Cohen, S.N., J. Mol. Biol. 138, 179-207 (1980)
16. Messing, J. et al., Nucl. Acids Res. 9, 309-321 (1981)
17. Hanahan, D., J. Mol. Biol. 166, 557-580 (1983)
19. McDonnell, M. W. et al., J. Mol. Biol. 110, 119 (1977)
20. Bailey, J.M. and Davidson, N., Anal. Biochem. 70, 75-85 (1976)
21. Laemmli, U. K., Nature 227, 680-685 (1970)
22. Maxam, A. M. and Gilbert, W., Meth. Enzymol. 65, 499-580 (1980)
23. Bolivar, F. et al., Gene 2, 95-113 (1977)
24. Yanish-Perron, C. et al., Gene 33, 103-119 (1985)
25. Rüther, U., Müller-Hill, B., EMBO-J. 2, 1791-1794 (1983)
26. C. Gatz, TH Darmstadt, Dissertation, 89-93 (1985)
27. Bernard, H.U. et al., Gene 5, 59-76 (1979)

- 175
28. Maniatis, T. et al.: Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 194 (1982); Bonner, T.I. et al., J. Mol. Biol., 81, 123 (1973)
 29. Glisin, V. et al., Biochemistry 13, 2633 (1974)
 30. Aviv, H. and Leder, P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408 (1972)
 31. Thomas, P. S., Proc. Natl. Acad. Sci, USA 77, 5201 (1980)
 32. Suggs, S.V. et al., Developmental biology using purified genes (D. Brown, ed.), Academic Press, New York, 683 (1981)
 33. Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol. 53, 159-162 (1970)
 34. Hardies, S. C. et al., J. Biol. Chem. 254, 5527-5534 (1979)
 35. Holmes, D. S. and Quigley, M., Anal. Biochem. 114, 193-197 (1981)
 36. Caruthers, M. H., in Chemical and Enzymatic Gene Synthesis (H. G. Gassen, A. Lang, eds.), 1st ed., Verlag Chemie, Weinheim (1982)
 37. Ullmann, A., Gene 29, 27-31 (1984)
 38. Fritz, H. et al.: Methoden der enzymatischen Analyse (H. U. Bergmeyer, ed.), 3rd ed., 1105, Verlag Chemie, Weinheim (1974)
 39. DelMar, E. G. et al., Anal. Biochem. 99, 316 - 320 (1979)

- 180
40. Pelham, R. B. and Jackson, R. J., Eur. J. Biochem. 67, 247-256 (1976)
 41. Klasen, E. C. and Kramps, J. A., Biochem. Biophys. Res. Comm. 128, 285-289 (1985)
 42. Guarente, L. et al., Science 209, 1428-1430 (1980)
 43. Miller, J. H. Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 433 (1972)
 44. Ohlson, K. et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1241-1244 (1977)
 45. Hochstrasser, K. et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1369-1375 (1981)
 46. Smith, C. E. and Johnson, D. A., Biochem. J. 225, 463-472 (1985)
 47. Schiessler, H. et al., Neutral Proteinases of Human Polymorphnuclear Leukocytes (Havemann, K. and Janoff, A., eds.), 195-207, Urban and Schwarzenberg, Baltimore, Munich (1978)
 48. Fritz, H. in: Protein Degradation in Health and Disease, Ciba Foundation Symposium 75, 351-379, publ. Excerpta Medica, Elsvier, North Holland (1980)
 49. Bernard, H.-U., Methods Enzymol. 68, 482-492 (1979)
 50. Machleidt, W., Modern Methods in Protein Chemistry (Tschesche, H., ed.), 267-302, Walter de Gruyter, Berlin, New York (1983)



Išradimo apibrėžtis

- 5 1. DNR seka, pasižyminti tuo, kad ji:
- kilusi iš žinduolio genomo, ypač iš žmogaus genomo,
 - hibridizuojasi su DNR seka pagal Pav. 4 ir/arba 5,
 - koduoja baltymą, pasižymintį HUSI-I tipo inhibitorių biologiniu aktyvumu.
- 10 2. DNR seka pagal p. 1, pasižyminti tuo, kad ja koduojamam baltymui būdingas HUSI-I tipo inhibitorių biologinis aktyvumas bei CUSI-I baltymo biologinis aktyvumas.
- 15 3. DNR seka pagal p. 2, pasižyminti tuo, kad ji koduoja baltymą, turintį amino rūgščių seką, pateiktą Pav. 5.
4. DNR seka pagal p. 2, pasižyminti tuo, kad ji turi Pav. 4 parodytą seką, kuri yra rekombinantinės plazmidės pRH31
- 20 (DSM 3634) sudėtyje kaip PstI fragmentas.
5. DNR seka pagal p. 2 ir p. 3, pasižyminti tuo, kad ji turi Pav. 3 parodytą seką, kuri yra rekombinantinės plazmidės pRH34 (DSM 3635) sudėtyje kaip PstI fragmentas.
- 25 6. DNR seka, pasižyminti tuo, kad ji hibridizuojasi su DNR seka pagal bet kurią iš p. nuo 1 iki 5, yra natūralios, pusiausintetinės arba sintetinės kilmės, skiriasi nuo DNR sekos pagal vieną iš p. 1-5 mutacijomis, pakeistais
- 30 nukleotidais, nukleotidų delecijomis, įterptais nukleotidais arba nukleotidų segmentų inversija ir koduoja baltymą, pasižymintį HUSI-I tipo inhibitorių biologiniu aktyvumu.

AS

7. DNR fragmentas, turintis tokią seką:

5` AATTCGGAGGTGTCGACTATGAAGTCCAGCGG 3`
GCCTCCACAGCTGATACTTCAGGTCGCC

5

8. Rekombinantinis klonavimo vektorius, pasižymintis tuo, kad jo sudėtyje yra DNR seka pagal bet kurią iš p. 1-7.

9. Rekombinantinis ekspresijos vektorius, pasižymintis tuo, kad jo sudėtyje yra DNR seka pagal bet kurią iš p. 1-7, kuri operatyviai sujungta su ekspresijos kontrolės seka.

10. Rekombinantinis vektorius pagal p. 9, pasižymintis tuo, kad ekspresijos kontrolės seka parinkta iš E. coli lac promotoriaus, E. coli trp promotoriaus, E. coli lipoproteino promotoriaus, λ P_L-promotoriaus, mielių ekspresijos kontrolės sekos ir kitų eukariotinių ekspresijos kontrolės sekų.

20

11. Plazmidė pRH 31 (DSM 3634).

12. Plazmidė pRH 34 (DSM 3635).

25 13. Plazmidė pRH 1810 (DSM 3905).

14. Plazmidė pRH 24.

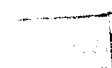
15. Plazmidė pRH 21.

30

16. Plazmidė pBA 17.

17. Šeimininko organizmas, pasižymintis tuo, kad jis transformuotas veikiant vienu iš rekombinantinių vektorių pagal p. 8-16.

35



18. Šeimininko organizmas pagal p.17, pasižymintis tuo, kad tai yra E. coli, B. subtilis ar kitos bakterijos rūšies kamienas, Saccharomyces cerevisiae, kitas mikroskopinis grybas, gyvūno arba žmogaus ląstelė.

5

19. Baltymas, pasižymintis HUSI-I tipo inhibitorių biologiniu aktyvumu.

20. Baltymas, pasižymintis CUSI-I tipo baltymo biologiniu aktyvumu.

10

21. Baltymas pagal p. 20, pasižymintis tuo, kad jis turi amino rūgščių seką, pateiktą Pav. 5.

15 22. Baltymas pagal p. 20, pasižymintis tuo, kad jis turi tokią amino rūgščių seką:

Pro-Val-Asp-Thr-Pro-Asn-Pro-Thr-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Lys-Cys-Pro-Val-Thr- Tyr-Gly-Gln-Cys-Leu-Met-Leu-Asn-Pro-Pro-Asn-Phe-Cys-Glu-Met-Asp-Gly-Gln- Cys-Lys-Arg-Asp-Leu-Lys-Cys-Cys-Met-Gly-Met-Cys-Gly-Lys-Ser-Cys-Val-Ser-Pro-Val-Lys-Ala-OH.

20

23. Baltymas pagal p. 20, pasižymintis tuo, kad jis turi tokią amino rūgščių seką:

25

Asp-Pro-Val-Asp-Thr-Pro-Asn-Pro-Thr-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Lys-Cys-Pro-Val-Thr- Tyr-Gly-Gln-Cys-Leu-Met-Leu-Asn-Pro-Pro-Asn-Phe-Cys-Glu-Met-Asp-Gly-Gln- Cys-Lys-Arg-Asp-Leu-Lys-Cys-Cys-Met-Gly-Met-Cys-Gly-Lys-Ser-Cys-Val-Ser-Pro-Val-Lys-Ala-OH.

30

24. Baltymo pagal vieną iš p. 19-23 gaminimo būdas, pasižymintis tuo, kad šeimininko organizmas kultivuojamas pagal p. 17 arba p. 18 maitinamoje terpėje, indukuojant arba neindukuojant geno produkto ekspresijos, ekspresijos produktas išskiriamas iš kultūros ir gali būti

35

hidrolizuojamas rūgštimi kontroliuojamomis sąlygomis, reikiamas biologiškai aktyvus baltymo fragmentas išskiriamas iš hidrolizato gelio chromatografijos metodu.

- 5 25. Farmacinė kompozicija su standartiniais užpildais, ir/arba skiedikliais ir /arba adjuvantais, pasižyminti tuo, kad į jos sudėtį įeina baltymas, turintis HUSI-I tipo inhibitorių biologinį aktyvumą.
- 10 26. Farmacinė kompozicija pagal p. 25 kaip purškiamas ar inhaliacijai skirtas preparatas.
- 15 27. HUSI-I tipo inhibitorių taikymas lėtinio bronchito, lėtinių gimdos kaklelio uždegimų gydymui, kitų lėtinių uždegiminių procesų, susijusių su pernelyg didele gleivių sekrecija ir dėl to kylančių ūmių pavojingų situacijų, taip pat pooperacinių hemoragijų, kilusių dėl hiperfibrinolizės, gydymui bei ankstyvajam šoko gydymui.

Pav. 1: HUSI-I triptinių fragmentų amino rūgščių seka

1 10 15
T1 Lys-Arg-Cys-Cys-Pro-Asp-Thr-Cys-Gly-Ile-Lys-Cys-Leu-Asp-Pro-
16 23
Val-Asp-Thr-Pro-Asn-Pro-Thr-Arg

1 10 15
T2 Lys-Pro-Gly-Lys-Cys-Pro-Val-Thr-Tyr-Gly-Gln-Cys-Leu-Met-Leu
16 20 29
Asn-Pro-Pro-Asn-Phe-Cys-Glu-Met-Asp-Gly-Gln-Cys-Lys-Arg

3' AAG ACG CTT TAC CTG CC 5'
A A C A
RH1

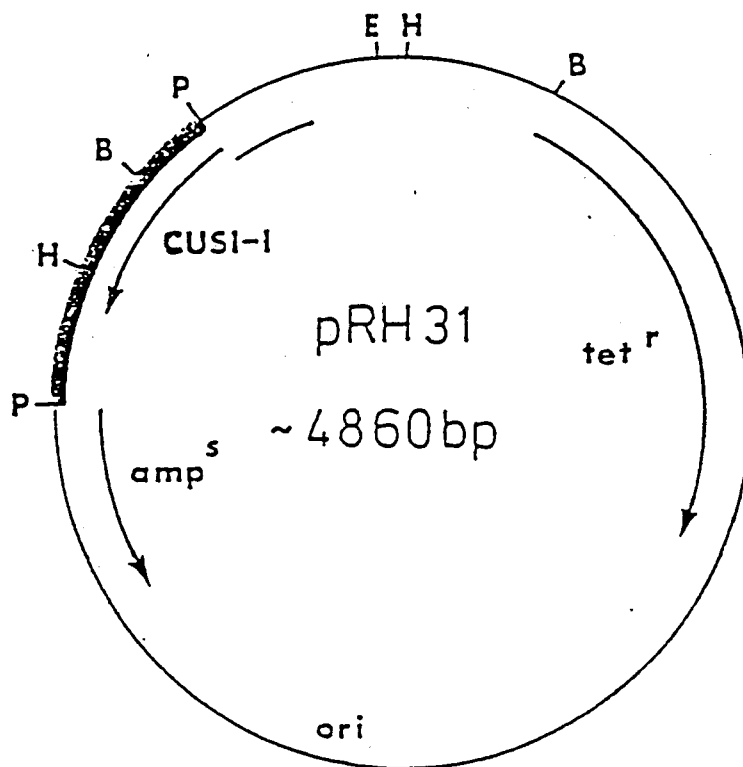
1 11
T3 Asp-Leu-Lys-Cys-Cys-Met-Gly-Met-Cys-Gly-Lys

3' ACG ACG TAC CCA TAC AC 5'
A A G
T
C

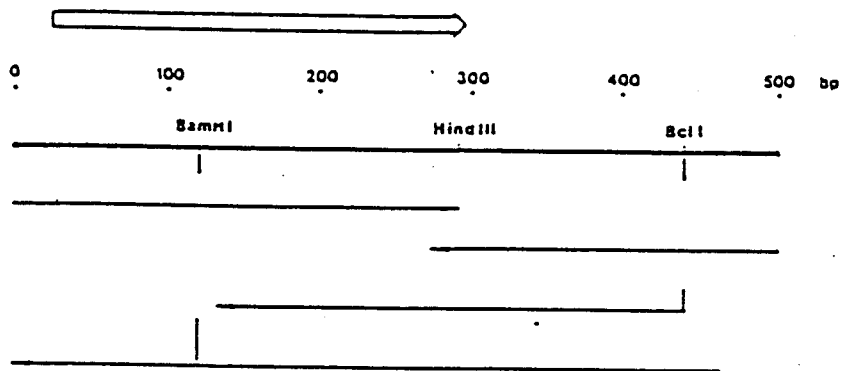
RH2

1 8
T4 Ser-Cys-Val-Ser-Pro-Val-Lys-Ala

Pav. 2: Plazmidės pRH 31 restrikcijos žemėlapis



Pav. 3: kDNR intarpo plazmidėje pRH 31 sekvenavimo strategijos schema



seka

[illegible]

G C
 A T
 C G
 G C
 T A

Pav. 5: Plazmidės pRH 34 CUSI-I-kDNR fragmento nukleotidų

[illegible]

Gly Iys Cys Pro Val Thr Tyr Gly Gln Cys Ieu Met Ieu Asn Pro 361
 G G G A A G T G C C C A G T G A C T T A T G G C C T T A A C C C C
 C C C T T C A C G G G T C A C T G A A T A C G A A T T G G G G

Pro Asn Phe Cys Glu Met Asp Gly Gln Cys Lys Arg Asp Ieu Lys 406
 C C C A A T T T C T G G T G A G A T G G C C A G T G C A C T T G A A G
 G G G T T A A A G A C A C T C T A C C G G T C A C G T T C G A A C T T C

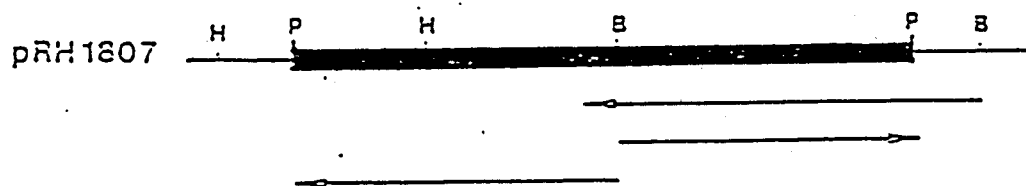
Cys Cys Met Gly Met Cys Gly Lys Ser Val Pro Val Lys 451
 T G T T G C A T G G G C A T G T G G G A A A T C C T T C C C C T G A A A
 A C A A C G T A C C C G T A C A C A C C C T T T A G G A C G C A A C A C T T

Ala Stop 496
 G G T T G A T C C C T G C C A T A T G G A G G C C T C T G C T C T G T
 C G A A C T A A G G A C C G G T A T A C C C T C C G A G A C C T C A G A C A

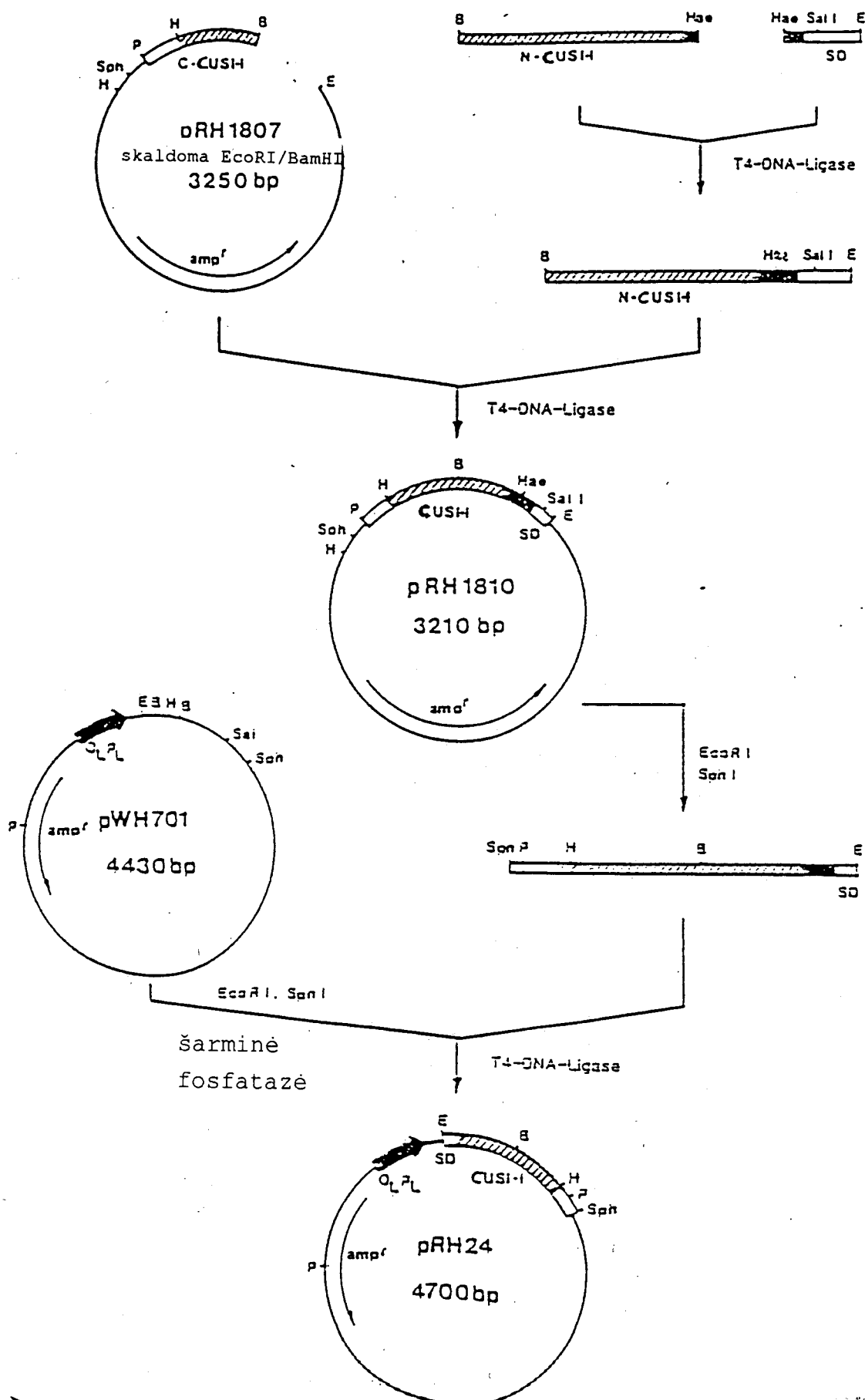
G T G G T C C A G G T C C C T T C C A C C C T G A G A C T T G G C C C C C C 541
 C A C C A G G T C C A G G A A A G G T G G G T G G C C T C C A C C C C C C G G G

C C C C C C C C C C C C C C C C C C T G C A G
 G G G G G G G G G G G G G G G G G G A C G T C

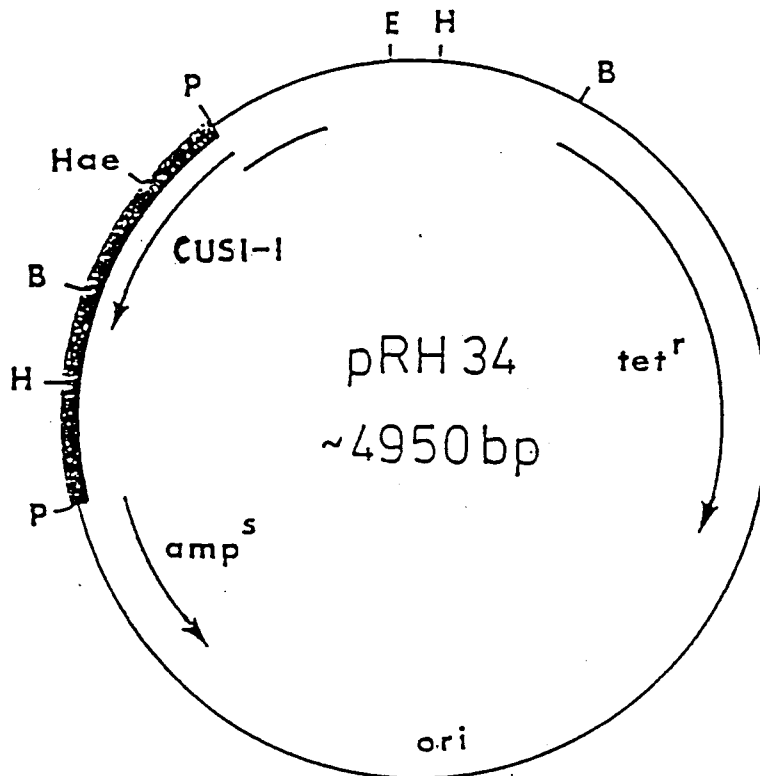
Pav. 6: PstI intarpo plazmidėje pRH 1807 sekvenavimo strategija



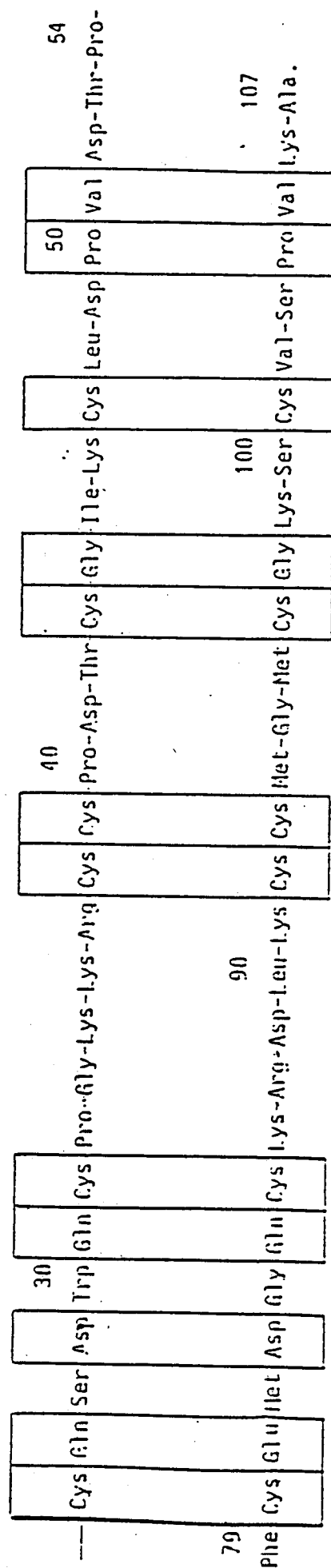
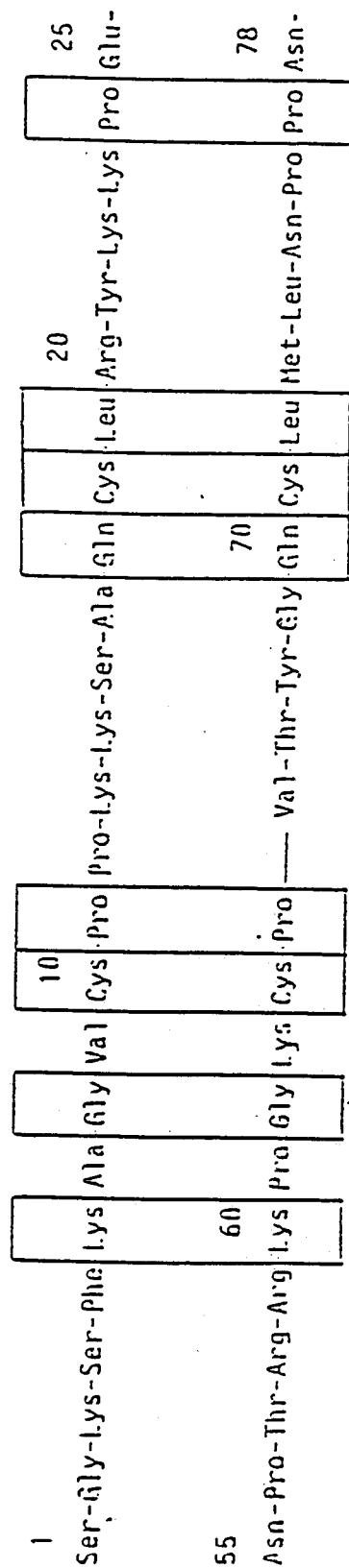
Pav. 7: Ekspresijos vektoriaus pRH 24 konstravimo schema



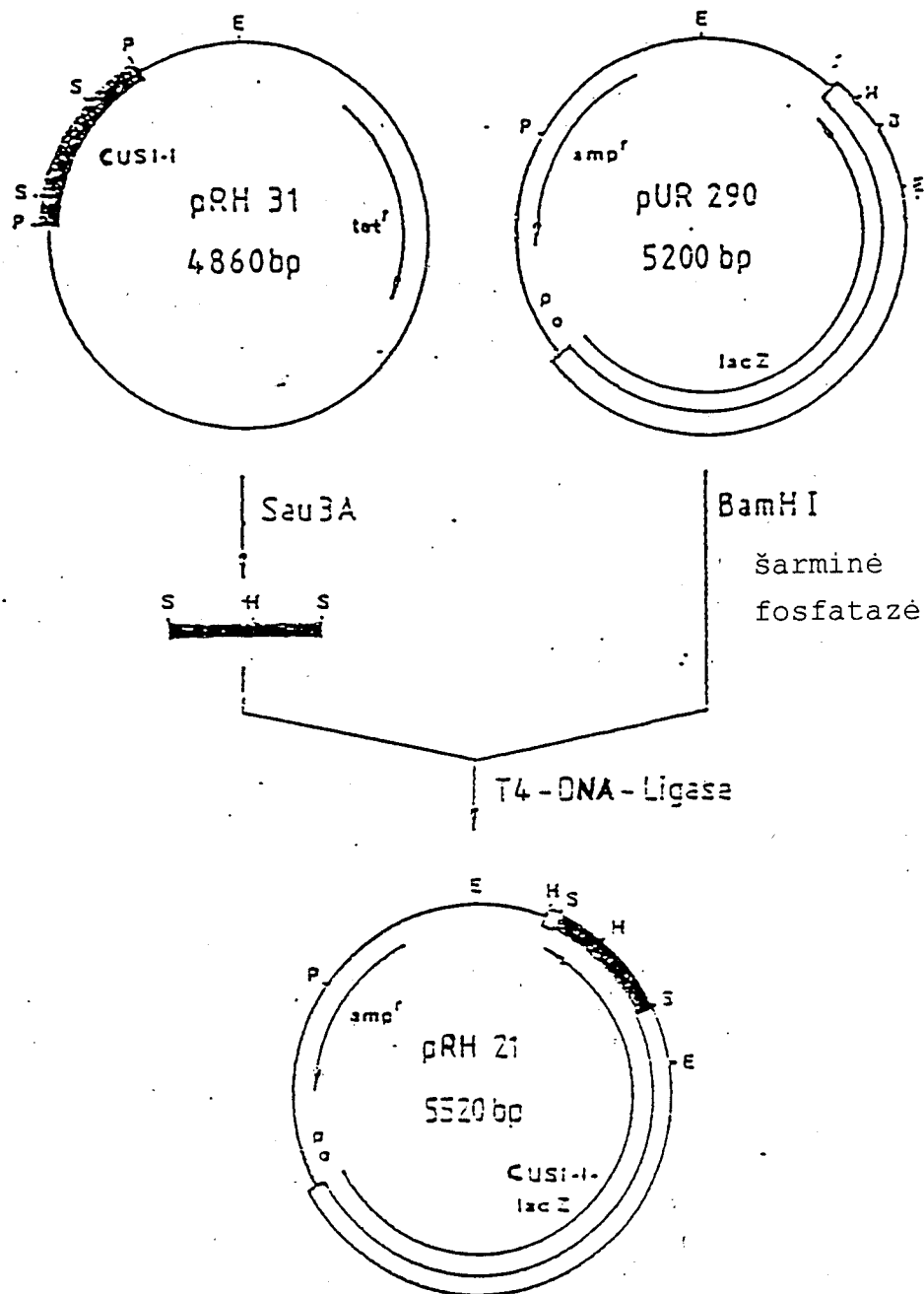
Pav. 8: Plazmidēs pRH 34 restrikcijas žemėlapis



Pav. 9: CUSI-I inhibitoriaus intrageninės duplikacijos
homologinis aspektas



Pav. 10: Dalinių CUSI-I sekų ekspresijos kaip sulieto β -galaktozidazės baltymo klonavimo strategija



Pav. 11: Ekspresijos plazmidės pBA17, skirtos C galinio CUSI-I domeno (= CUSI-I 2-ojo domeno), konstravimo schema

